

Seebio® One Step RT- PCR 试剂盒说明书

1. 产品说明

Seebio® One Step RT-PCR 预混液 (2×) 是一种用于一步 RT-PCR、染料法 RT-qPCR 的基础试剂。本 2×预混液可以简单地通过添加 RNA 模板、特异引物来快速地在同一管中进行逆转录和 PCR 反应。逆转录反应使用耐热性 (高达 60°C) Seebio®逆转录酶 (DAA0309B), 允许从具有复杂二级结构的 RNA 合成 cDNA。cDNA 合成后, 热启动的 Seebio®sTaq (DAA0100B) 进行高特异性和高效的 PCR 扩增。在反应体系中加入 SYBR Green I 即可实现 RT-qPCR 扩增。One Step RT-PCR 预混液 (2×) 对肝素和腐殖酸等多种抑制物质具有高度抗性, 能够在广泛的样品上进行 RT-PCR。该产品可用于各种应用, 如基因表达分析、cDNA 扩增、RNA 病毒检测等。

2. 货号: EDM0206B

3. 组分及规格

组分	规格
One Step RT-PCR Mix (2×)	1.0ml × 1
RT/RI Enzyme Mix	50μL × 1
RNase Free H ₂ O	1.0ml × 1

4. 储存条件: -20°C

5. 产品特点

- (1) One Step RT-PCR 试剂盒可用于 SYBR Green I 染料法 RT-qPCR, 但不能用于探针法;
- (2) 即使在 -20°C 的储存温度下也不会冻结的 2×预混物, 使用时简单快速方便;
- (3) 通过使用耐热逆转录酶, 可以在高温 (高达 60°C) 下进行逆转录;
- (4) sTaq 对抑制物质具有高度耐受性, 扩增结果有更高的再现性。

6. 注意事项

- (1) 使用前, 轻轻混合后, 旋转混匀 One Step RT-PCR Mix(2×), 使用后立即储存在 -20°C 下。
- (2) 当分装试剂时, 始终使用新的一次性枪头, 以避免样品之间的污染。
- (3) 对于反应混合物, 方便地制备所需量的主混合物。通过分配具有均匀组成的主混合物所需的最小数量的等分试样, 可以较大限度地减少试剂配制时间和检测数据的分散。
- (4) 用特定引物进行的逆转录反应, 不能使用随机引物和 Oligo-dT 引物。

(5) 在 PCR 反应之前，不要在 95℃ 下进行 5-15 分钟的激活步骤。不必要的热处理会降低酶活性，并可能影响扩增效率和定量准确性。通常，在 PCR 反应之前，95℃ 持续 10 秒就足以使逆转录酶热失活。

7. 使用方法举例

(1) 普通 RT-PCR

在冰上制备如下所示的 PCR 反应混合物：

组分	体积
One Step RT-PCR Mix (2×)	10 μl
RT/RI Enzyme Mix	1μl
PCR Forward Primer (10 μM)	0.4μl
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.4μl
RNA sample	≤2.5 μl
RNase Free H ₂ O	x μl
Total	20μl

RT-PCR 反应条件：

55℃ 10 min

95℃ 10 sec

PCR 反应：40 个循环

95℃ 5 sec

60℃ 30 sec

反应完成后，通过凝胶电泳检测 PCR 产物。

(2) 荧光定量 PCR

以 Applied Biosystems 7500 为例：

在冰上制备如下所示的 PCR 反应混合物。

组分	染料法
One Step RT-PCR Mix (2×)	25.0 μl
RT/RI Enzyme Mix	2.5μl
PCR Forward Primer (10 μM)	1.0μl
PCR Reverse Primer (10 μM)	1.0μl
SYBR green I (20×)	1.0μl
ROX Reference Dye or Dye (50×)	1.0μl

RNA sample	≤5.0 μl
RNase Free H ₂ O	x μl
Total	50μl

RT-PCR 反应条件:

55°C 10 min

95°C 10 sec

Amplification: 40 个循环

95°C 5 sec

60°C 30 sec

反应完成后，评估扩增曲线，如果要进行定量测定，则创建标准曲线。有关分析方法，请参阅所用实时 PCR 仪器的手册。

8. RT-PCR 反应条件优化

(1) 逆转录反应

步骤	温度	时间	建议
逆转录	45~60°C	5~30 min	根据目标优化温度
变性	95°C	10 Sec	95°C 持续 10 秒就足以使逆转录酶失活。

(2) PCR 反应

步骤	温度	时间	建议
变性	95°C	3 - 5 sec	扩增产物大小不超过 300bp。95°C 持续 3-5 秒通常就足够了。
变性/延伸	56 - 64°C	20 - 30 sec	热处理/延伸的温度范围为 56°C 至 64°C。如果反应性差，增加该步骤的培养时间可能会改善结果。

(3) 其它建议:

- A. 0.2μM 的最终引物浓度在大多数情况下效果良好。然而，如果需要进一步优化，请尝试将引物浓度调整在 0.1 至 1.0μM 的范围内。
- B. 优选的样品量为反应体积的 1/10 或更少的 10pg 至 1μg RNA。尽管 1/10 或更多的反应体积可以用于低靶 RNA 浓度，但在某些情况下这可能抑制 RT-PCR 反应。
- C. 根据所用实时 PCR 仪器的建议调整反应体积。

【技术支持服务】

您若有疑问或反馈，请联系 [Tel:+0086-21-50272981x6217](tel:+0086-21-50272981x6217) 或 Email: market@seebio.cn

西宝生物二维码

