

# THERMOscript One Step RT-PCR Kit



北京艾德莱生物科技有限公司  
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：[www.aidlab.cn](http://www.aidlab.cn) 邮箱：[info@aidlab.cn](mailto:info@aidlab.cn)

## 使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
<b>PC4501</b>	25次
<b>PC4502</b>	50次

组成	PC4501	PC4502
2×RT-PCR Mix	625µl	1250 µl
Enzyme Mix (Contains HotMaster DNA Polymerase and RNasin)	25 µl	50 µl
THERMOscript RTase	25 µl	50 µl
RNase free H <sub>2</sub> O	1.5 ml	1.5 ml

### 产品组成、储存、浓度：

储存：-20℃ 保存，有效期 6 个月。

**制品说明：**本试剂盒是专为一步法 RT-PCR 实验配制的，使用该试剂盒能够方便快捷的在同一个反应管内完成逆转录反应和 PCR 扩增反应。反应过程中无需打开管盖添加试剂，避免了污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。本试剂盒包括多点突变改造耐热 M-MuLV H Minus 逆转录酶、热启动 HotMaster Taq DNA 聚合酶和 RNasin 抑制剂 mix、同时包含适用于逆转录和 PCR 扩增的优化独特反应体系。本酶 M-MuLV(RNase H<sup>-</sup>)的 RNase H 活性缺失，与 M-MuLV 相比，具有更强的延伸能力和稳定性，可用于较长的 cDNA 合成以及高比例的全长 cDNA 文库的构建等。同时该酶可以在高达 50-60℃ 反转录，大大提高了复杂二级结构，GC 含量丰富模板反转录效率，产量敏感度和特异性比一般试剂盒显著特高。

**适用范围：**适用于高拷贝、低拷贝基因检测；适用于高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板。

### 建议反应体系（50 µl）：

**注意：**2×RT-PCR Buffer 低温时可能有结晶析出，应手心加热或者涡旋振荡恢复融解后使用。短期使用可放 4℃ 冰箱。

根据下表冰上配制反应液：

Components	Volume	Final Concentration
2×RT-PCR Buffer	25 µl	1×
Forward Primer (10µM)	1 µl	0.2 µM
Reverse Primer (10µM)	1 µl	0.2µM
Enzyme Mix	1 µl	-
THERMOscript RTase	1 µl	-
RNA template	X µl	1pg-2µg-
RNase free H <sub>2</sub> O	To X µl	Not applicable -

注意：引物浓度请以终浓度 **0.2-0.6 $\mu$ M** 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。如果同进行多个反应，先按比例配成混合液，振荡混匀后，按每管 **50-X $\mu$ l** (X 为模板量)分装。

### PCR 扩增：

1. 将配制好的反应体系混匀、离心后。
2. 将热循环仪预热到 50-55 $^{\circ}$ C，将 PCR 管置于热循环仪中，按一下反应条件进行反应。

扩增程序：

	温度	时间	循环数
1	50-55 $^{\circ}$ C	30 分钟	1
2	94 $^{\circ}$ C	2-5 分钟	1
3	94 $^{\circ}$ C	30 秒	30-40
	50-60 $^{\circ}$ C	30 秒	
	72 $^{\circ}$ C	1-2kb/分钟	
4	72 $^{\circ}$ C	5-10 分钟	1
5	4 $^{\circ}$ C	保温	

注意：可根据扩增产物的下游应用设定循环数。循环次数太少，扩增量不足；循环次数多，错配机率会增加，非特异性背景严重。所以，在保证产物得率的前提下，应尽量减少循环次数。

### 注意事项：

- 避免RNase污染。
- 为保证反应成功建议使用高质量的RNA模板
- 不同的片段，所需最佳RNA模板用量不同，过多的RNA会抑制反应，建议根据反应调整模板用量。
- 不能使用 Oligo(dT) 和 Random Primer 合成 cDNA。