

版本号: SD121221

Super One-step RT-PCR Kit for Virus Detection

增强型 病毒检测用一步法 RT-PCR试剂盒

目录号: SD103

产品内容

产品组成	SD103 50 μ l \times 50 rxn
5 \times One-step RT-PCR Buffer	550 μ l
One-step Enzyme Mix	220 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml

储存条件

该试剂盒请置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

产品简介

本试剂盒采用了一步 (One-Step) RT-PCR法。RNA→cDNA→PCR反应操作在同一反应体系中连续进行，反应中途不需添加任何试剂。反转录反应使用了新型反转录酶Quant RTase。该反转录酶对具有复杂二级结构的RNA模板具有超强的亲和延伸能力；PCR反应使用了扩增性能优越的化学修饰型的HotStart DNA聚合酶，大大提高了本试剂盒的扩增性能和反应特异性。

在本试剂盒中，已将Quant RTase、HotStart DNA聚合酶、RNase Inhibitor以及One-step RT-PCR用稳定剂等配制成了Premix型的One-step Enzyme Mix；同时把反应用Buffer、dNTP以及One-step Enhancer Solution配制成了Premix型的5× One-step RT-PCR Buffer的形式，使实验操作时的反应液配制更为简单方便。

需自备的试剂

1. RNA模板
2. 特异性PCR引物

使用注意事项

1. 建议使用TIANGEN公司生产的病毒检测用RNA提取试剂盒（SD101）来制备高质量的病毒RNA，以做为RT-PCR模板。
 2. 经试验证明：针对某些复杂模板或高GC含量低丰度的基因片段的扩增可以通过调整反转录温度来达到很好的扩增效果。
 3. 一步法RT-PCR 实验应避免RNase污染，可采用以下措施：
 - 1) 因人的皮肤表面和唾液都有RNase，因此实验中应戴一次性手套和口罩；
 - 2) 一步法RT-PCR 实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作RNA；
 - 3) 一步法RT-PCR 实验相关耗材应用0.1% DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在37℃处理12 h，并高压灭菌30 min后使用。
 4. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择。
 5. 为避免非特异扩增，一步法反应液的配制应始终在冰浴中进行，待PCR仪器温度达50℃时再将反应管放到仪器中。
 6. 引物设计的好坏直接影响到RT-PCR 反应的结果，设计引物时需考虑GC含量，引物长度，引物位置等因素，建议采用专业的引物设计软件来设计。
-

实验操作步骤

1. 完全融化模板RNA，特异性引物，5×One-step RT-PCR Buffer，RNase-Free ddH₂O,短暂离心后置于冰浴上。
2. 按下表在冰浴条件下配制反应液：

反应成分	体积
5×One-step RT-PCR Buffer	10 μl
One-step Enzyme Mix	4 μl
上游特异性引物(10 μM)	2 μl
下游特异性引物(10 μM)	2 μl
RNA模板	10 ng-1 μg total RNA
RNase-Free ddH ₂ O	补水至50 μl
总体系	50 μl

注意：当同时需要进行多次RT-PCR反应时，将各组分加倍混合后再分装到每个反应管中，可以减少实验操作产生的误差，使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失。

3. 启动PCR仪器直到温度上升至50℃时，将反应管放入PCR仪器中。
4. 按下表设置PCR反应条件：

步骤	反应	时间	温度
1	反转录反应	30 min	50℃
2	PCR初始变性	15 min	95℃
3	变性	0.5 min	94℃
4	退火	0.5-1 min	50-60℃
5	延伸	0.5-1 min	72℃
6	从3-5步进行35-40个循环		

5. 将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测分析。
-