

ThermoScript One Step RT-PCR Kit

Linktopcy

北京联拓创盈科技有限公司

地址：北京市海淀区上地安宁庄西路25号 IMOMA 三单元 217 室

电话：010-67142179 传真：010-61190570

网址：www.linktopcy.com 邮箱：linktopcy@vip.163.com

使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位	组成	LTPC4501	LTPC4502
LTPC4501	25次	2×RT-PCR Mix	625µl	1250 µl
LTPC4502	50次	Enzyme Mix (Contains HotMaster DNA Polymerase and RNasin)	25 µl	50 µl
		THERMOscript RTase	25 µl	50 µl
		RNase free H ₂ 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：本试剂盒是专为一歩法 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⁻)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	Volumn	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 ₂ O	To X µl	Not applicable -

注意：引物浓度请以终浓度 0.2-0.6 μ 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 μ 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 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	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。