



## PreScript One-Step RT-PCR Kit(Dye Plus)

货号: S036A/B

### ● 产品内容

组分	S036A	S036B
Prescript One-Step Enzyme Mix	100μL	400μL
2× One-Step RT-PCR Buffer(Dye Plus)	625μL× 2	1.25mL× 2
Control F-1 Primer(20μM)	20μL	80μL
Control R-1 Primer(20μM)	20μL	80μL
Positive Control RNA	20μL	80μL
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	625μL× 2	1.25mL× 2

### ● 储存条件

收到本产品后, 请立即置于-20°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，降低污染风险。同时反应液中已含有电泳时所必需的色素试剂（二甲苯蓝和橙黄 G），反应后可以直接进行电泳。反应液为鲜艳的绿色，电泳时指示效果明显，容易观察样品的电泳位置。反转录反应使用了英赞特别开发的新型反转录酶 PreScript III Reverse Transcriptase。该反转录酶对具有复杂二级结构的 RNA 模板也具有很强的延伸能力；PCR 反应使用了扩增性能优越的 Hot Start 型 DNA 聚合酶 C-SsoRobust Taq DNA Polymerase，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 PreScript III Reverse Transcriptase、C-SsoRobust Taq DNA Polymerase、RNase Inhibitor 以及 One Step RT-PCR 用稳定剂等配制成了预混型的 Prescript One-Step Enzyme Mix；同时把反应用 Buffer、dNTP 以及 Enhancer Solution 配制成了预混型的 2× One-Step RT-PCR Buffer(Dye Plus)的形式，使实验操作时的反应液配制更为简单方便。使用本试剂盒可进行高效的 RT-PCR 扩增。反转录温度可以设定为 50°C，能够有效抑制非特异性扩增。另外，本试剂盒可减少由于错配和引物二聚体造成的非特异性反应。

## ● 使用注意事项

- ❖ 当同时需要进行数次 One Step RT-PCR 反应时，应先配制各种试剂的混合液，然后再分装到每个反应管中。这样，可使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失，避免重复分取同一试剂。同时也可以减少实验操作或实验样品之间产生的误差。
- ❖ 使用 Prescript One-Step Enzyme Mix 时，应轻轻混匀，避免起泡；分取之前要小心地离心收集到反应管底部；由于酶保存液中含有 50% 的甘油，粘度高，分取时应慢慢吸取。
- ❖ 2× One-Step RT-PCR Buffer(Dye Plus)使用前用 vortex 充分混匀，离心后使用。
- ❖ 使用本试剂盒进行反转录反应时必须使用特异性的反转录引物，Random Primer、Oligo dT Primer 不能使用。
- ❖ 本试剂盒是把 RNA 合成 cDNA，然后再对此 cDNA 进行扩增的试剂盒。RNA 的纯度会影响 cDNA 的合成量，而制备 RNA 的关键是要抑制细胞中的 RNA 分解酶和防止所用器具及试剂中的 RNA 分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用 RNA 操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的 RNA 分解酶的污染。
- ❖ 为了防止 Positive Control RNA 分解，应尽量避免反复冻融，建议将其分成小包装后冻存。有条件的实验室最好保存于-70°C ~ -80°C。

## 操作方法

### 1. 反应体系准备

- 1) 建议在冰上进行 RT-PCR 反应液的配制，反应体系如下所示。

Add RNase Free ddH <sub>2</sub> O	To 50 μL
2× One-Step RT-PCR Buffer (Dye Plus)	25 μL
Prescript One-Step Enzyme Mix	2 μL
Forward Primer ( 20μM )	1 μL
Reverse Primer ( 20μM )	1 μL
Total RNA☆	X μL

☆ 推荐 Total RNA 的使用量范围在 10~1,000 ng 之间。Positive Control RNA 为模板时使用量为 1 μL。

- 2) 盖上反应管，轻柔混匀。可短暂离心，确保所有组分均在管底。

### 2. 按以下条件进行 RT-PCR 反应。

标准反应程序：

阶段	温度	时间	循环
反转录	50°C	30 min	1×
预变性	95°C	10 min	1×
PCR 反应	95°C	15 Sec	25~35×
	55~65°C☆	30 Sec	
	72°C	1kb/min	

☆ 一般设计为低于引物退火温度 3°C 即可。