



## PreScript HiFi One-Step RT-PCR Kit

货号: S038A/B

- 产品内容

组分	S038A	S038B
Prescript III RT Enzyme Mix	50μL	200μL
PfuMax HiFi DNA Polymerase	200μL	800μL
2× One-Step HiFi 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℃保存。

## ● 产品简介

PreScript HiFi One-Step RT-PCR Kit 是在一个反应管中连续进行反应的 1 step RT-PCR 用试剂盒。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。反转录酶使用延伸性能好且能够合成全长 cDNA 的 PreScript III Reverse Transcriptase，PCR 使用准确性高且适于扩增长链及 GC Rich cDNA 的 PfuMax HiFi DNA Polymerase，这两种酶经优化后可用于 1 step RT-PCR。本试剂盒可用于宽泛浓度 RNA 起始的反应，在反转录反应 30 分钟、PCR 反应延伸时间为 30 秒/kb 的高速条件下，能够扩增难扩增的长链及 GC rich 等各种目的基因，可简便快速且准确地获得 cDNA 产物。

## ● 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 III RT Enzyme Mix 和 PfuMax HiFi DNA Polymerase 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 HiFi 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℃ ~ -80℃。

## 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 HiFi RT-PCR Buffer(Dye Plus)	25 μL
Prescript III RT Enzyme Mix	1 μL
PfuMax HiFi DNA Polymerase	4 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 1μL。

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℃	30 min	1×
预变性	98℃	30 Sec	1×
PCR 反应	98℃	10 Sec	25~35×
	55~65℃☆	30 Sec	
	68℃	2kb/min	

☆ 一般设计为低于引物退火温度3℃即可。