

Evo M-MLV RT-PCR 试剂盒

Evo M-MLV RT-PCR Kit

Code No. AG11602

包装量: 100 rxns
保存温度: -20 °C

产品概述

本制品是应用反转录和 PCR 原理对 RNA 进行扩增解析的试剂盒。本制品是两步法 RT-PCR 试剂盒，具有较好的延伸性能以及高扩增效率。反转录使用了本公司特别研发的M-MLV由来的新型反转录酶 *Evo M-MLV* RTase，具有较强的 cDNA 延伸能力；PCR 反应使用了扩增性能较好的 *Exp Taq* HS DNA Polymerase 体系，其中混有 Taq 单克隆抗体，可进行 Hot Start 反应。

本制品配有反转录以及 PCR 扩增需要的所有试剂，方便使用。

保存

保存温度: -20°C

运输温度: 干冰运输或者 -20°C 冰袋运输

活性定义

以 Poly (A) 为模板，Oligo (dT) 为引物，在 37°C 条件下，10 分钟内催化掺入 1 nmol 的 dTTP 所需酶量定义为 1 个活性单位(U)。

产品组成

<i>Evo M-MLV</i> RTase (200 U/ μ l)	50 μ l
5X RTase Reaction Buffer	400 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	50 μ l
dNTP Mix (10 mM each)	300 μ l
Oligo dT (18T) Primer (2.5 μ M)	100 μ l
Random 6 mers Primer (20 μ M)	100 μ l
<i>Exp Taq</i> HS DNA polymerase (5 U/ μ l)	50 μ l
5X <i>Exp Taq</i> PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	1 ml
RNase free water	1 ml x 5 pcs

实验操作

RT-PCR 实验分为两部分，反转录反应和 PCR 反应。操作如下：

1) 配制 RNA 模板溶液，置于 PCR 仪进行变性、退火反应。(此过程利于模板 RNA 变性性及引物和模板特异性退火，可提高反转录效率。)

组分名称	用量
dNTP Mix (10 mM each)	1 μ l
Oligo dT (18T) Primer (2.5 μ M) or Random 6 mers Primer (20 μ M) or Specific Primer (2 μ M)	1 μ l
Template RNA*	
RNase free water	Up to 10 μ l

*: Total RNA 推荐用量: 100 pg ~ 1 μ g; 最多可加至 5 μ g。

变性、退火反应条件:

65°C	5 min
4°C	-

2) 配制反转录反应体系, 合成cDNA:

组分名称	用量
上述变性、退火后反应液	10 μ l
5X RTase Reaction Buffer	4 μ l
RNase Inhibitor (40U/ μ l)	0.5 μ l
Evo M-MLV RTase (200 U/ μ l)	0.5 μ l
RNase free water	Up to 20 μ l

合成 cDNA 反应条件*1:

42 (or 50°C)*2	15 ~ 30 min
95°C*3	5 min
4°C	-

*1: 如果使用 Random 引物进行反转录, 需要在反应开始前进行 30 °C 反应 10 min 处理, 可使 Random 引物与模板充分退火、延伸, 增加反转录效率。

*2: 使用特异性下游引物进行反转录时, 有时会因为错配而产生非特异性扩增, 此时可将反应温度升高到 50 °C, 以提高反应特异性。

*3: 如果进行长片段 DNA 扩增时, 为保证 1st cDNA 链完整, 可进行 70 °C、15 min 失活反应。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

3) PCR 扩增

组分名称	反应终浓度	加入量
Exp Taq HS DNA Polymerase	2.5 U	0.5 μ l
5X Exp Taq PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	1 x	10 μ l
dNTP Mix (10mM each)	0.4 mM	2 μ l
Primer F (10 μ M)	0.2 ~ 1.0 μ M	-
Primer R (10 μ M)	0.2 ~ 1.0 μ M	-
上述反转录反应液	-	$\leq$ 5 μ l
RNase free water	-	Up to 50 μ l

反应条件 (以扩增 1 kb DNA 片段为例)

步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	30 sec	1
变性	98°C	10 sec	} 25 ~ 35
退火	55°C	30 sec	
延伸	72°C	1 min	
最终延伸	72°C	2 min	1

注: 变性条件的设定可根据设备进行调整, 一般 94°C 20 ~ 30 sec, 98°C 5 ~ 10 sec。退火温度主要取决于上下游引物的 Tm 值, 通常可按照 Tm $\pm$ 5°C 设定。

➤ 结果检测

反应结束后, 取适量反应产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。