

Version 1

Code No. AG11622

Evo M-MLV 一步法 RT-PCR 试剂盒 III (含染料)

Evo M-MLV One Step RT-PCR Kit III (dye plus)

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.



➤ 产品概述

本产品是具有高效扩增能力的一步法 RT-PCR 试剂盒，整合了反应性能优越的 *Evo M-MLV* 反转录酶和热启动 DNA 聚合酶，配制成 Premix 型的 One Step Enzyme Mix III，搭配优化的 Buffer 体系，可对各种长片段和复杂模板进行良好扩增，对不同模板的适用性广，反应速度快，扩增性能强，检测灵敏度高，更便于对 RNA 样本进行扩增分析。

本产品反转录和 PCR 反应在同一个反应体系中连续完成，操作简便、快捷，反应过程中不需要再添加任何试剂，可有效降低污染风险。同时，2X One-Step Reaction Solution III (dye plus) 中还添加了电泳所需染料，反应后可直接进行电泳检测，使用方便。

➤ 产品组成

组分名称	AG11622 (50 rxns / 50 μ l)
One Step Enzyme Mix III	100 μ l
2X One-Step Reaction Solution III (dye plus)	625 μ l X 2 pcs
RNase free water	1 ml X 2 pcs

➤ 保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输

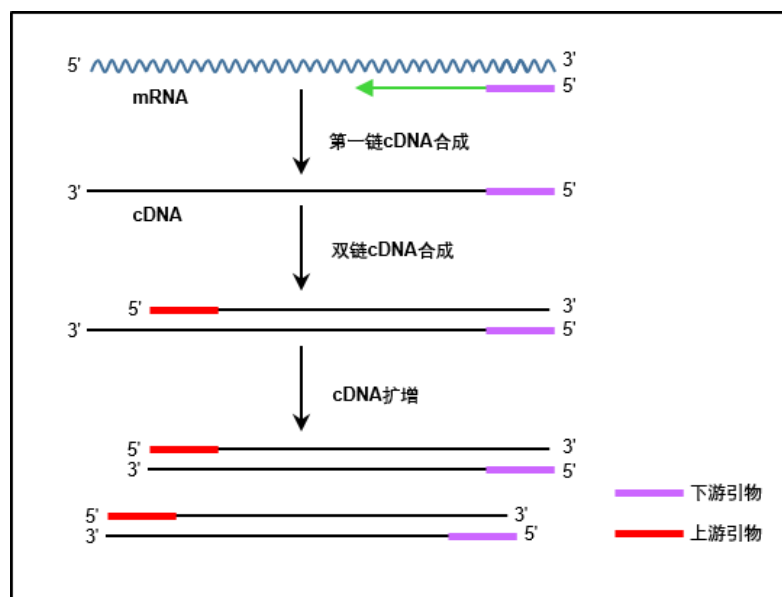
➤ 产品优势

1. 本产品可对各种长片段和复杂模板进行良好扩增，对不同模板的适用性广，扩增性能强，检测灵敏度高。
2. 本产品具有较快的延伸速度（可达 10 ~ 30 sec/kb），在较短时间内即可获得检测结果。
3. 本产品是一步法 RT-PCR 反应试剂盒，可在单管内完成反转录和 PCR 反应，简化操作，提高效率，可有效地降低因多次操作而造成污染的可能性。
4. 本产品中包含电泳指示剂，可在 PCR 反应结束后直接点样进行电泳，电泳时只有一条指示带，指示带呈现浅绿色。

➤ 实验原理

一步法 RT-PCR 反应原理

一步法 RT-PCR 是常用的 RNA 分析技术之一，可在一个反应管中同时进行反转录及后续的 PCR 扩增。与两步法 RT-PCR 相比，一步法 RT-PCR 具有分析简单快速、试剂配制简便、污染风险较低等优点。RT-PCR 过程中，在反转录酶的作用下，以特异性下游引物为反转引物将 RNA 反转录成第一条 cDNA 链。再以第一条 cDNA 链为模板，特异性上游引物与之互补配对，并在 DNA 聚合酶的作用下延伸，形成双链 DNA。在此基础上，DNA 片段经过“高温变性-低温退火-引物延伸”三步反应的多次循环，使得 DNA 片段在数量上呈指数增加，在短时间内获得大量目的基因片段。



➤ 使用注意事项

1. 请保持实验区域洁净，实验所用的离心管、枪头等耗材均需 RNase-free 级别，以避免 RNase 污染。
2. One Step Enzyme Mix III 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失，并用移液器轻柔吹打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
3. 2X One-Step Reaction Solution III (dye plus) 使用前请于冰上充分融化，轻柔混匀，短暂离心后再使用。
4. 反应体系建议在冰上配制，配制完成后立即放入 PCR 仪中进行反应。
5. 使用本产品进行反转录反应时必须使用特异性引物，不能使用 Random Primer、Oligo dT Primer。

➤ 实验前准备

1. 试剂 & 耗材:

Primer、RNA 模板、PCR 管 (RNase-free)、枪头 (RNase-free)。

2. 仪器:

PCR 仪、移液器、涡旋振荡仪、小型桌面离心机、电泳仪、凝胶成像仪。

➤ 操作方法

1. 配制反应体系

按照下表在冰上配制反应液:

组分名称	反应终浓度	50 μl 体系
2X One-Step Reaction Solution III (dye plus)	1X	25 μl
One Step Enzyme Mix III	-	2 μl
Primer F (10 μM)	0.4 μM ^{*1}	2 μl
Primer R (10 μM)	0.4 μM ^{*1}	2 μl
Total RNA	≤1 μg ^{*2}	-
RNase free water	-	Up to 50 μl

*1: 引物通常使用终浓度为 0.4 μM, 可根据实际情况在 0.2 ~ 1.0 μM 范围内调整。

*2: 在 50 μl 反转录体系中, 建议 Total RNA 用量不超过 1 μg。

2. 反应条件 (以三步法扩增为例^{*1、*2})

将含有反应液的 PCR 管放置于 PCR 仪中, 然后按照下表条件进行 PCR 反应:

步骤	温度	时间	循环数
反转录	50°C ^{*3}	30 min ^{*4}	1
预变性	94°C	2 min	1
变性	98°C	10 sec	} 30 ~ 40 ^{*6}
退火	56°C	15 sec	
延伸	68°C	30 sec/kb ^{*5}	

*1: 建议首先采用上表中推荐的三步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果, 再优化反应条件。

*2: 当引物 T_m 值较高或三步法 PCR 扩增结果不好时, 可尝试两步法 PCR 扩增 (两步法 PCR 反应程序可参考附录)。

*3: 通常反转录反应温度为 50°C 时可以提高反应特异性, 也可根据实际情况在 37 ~ 50°C 范围内调整。

*4: 通常反转录反应时间为 30 min 时可以得到较好的结果, 也可根据实际情况在 15 ~ 45 min

范围内调整。

- *5: 延伸速度一般设置为 30 sec/kb, 如扩增过程中特异性不好, 可在 10 sec ~ 30 sec/kb 内进行调整; 如扩增条带较弱或扩增较复杂片段, 可适当增加延伸时间, 在 30 sec ~ 1 min/kb 内进行调整。
- *6: 扩增条带较弱或模板量较低时, 可适当增加循环数, 但不建议超过 40 个循环。

3. 结果检测

反应结束后, 取 2 ~ 5 μ l PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测产物浓度及特异性。

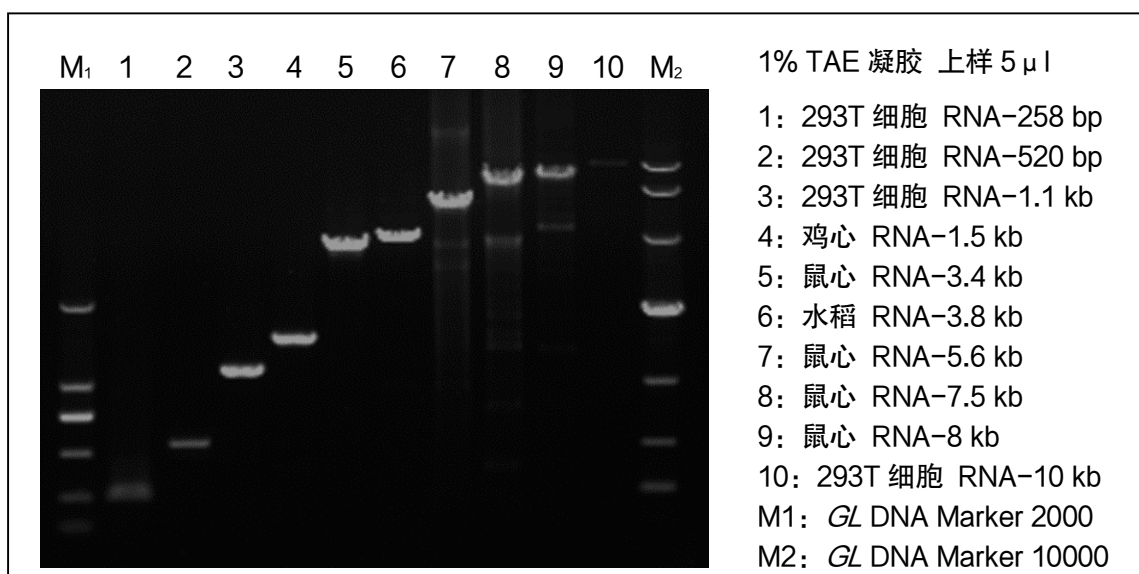
➤ 实验例

1. 以不同物种 RNA (包括 293T 细胞、鸡心、鼠心、水稻等 Total RNA) 为模板, 使用本产品进行一步法 RT-PCR 扩增不同长度的片段 (258 bp-GC 59.0%、520 bp-GC 73.3%、1.1 kb-GC 38.2%、1.5 kb-GC 43.0%、3.4 kb-GC 48.8%、3.8 kb-GC 38.9%、5.6 kb-GC 41.4%、7.5 kb-GC 42.8%、8 kb-GC 42.9%、10 kb-GC 52.6%)。

反应程序如下:

温度	时间	循环数
50°C	30 min	1
94°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 30
56°C	15 sec	
68°C	30 sec/kb	

电泳结果如下:

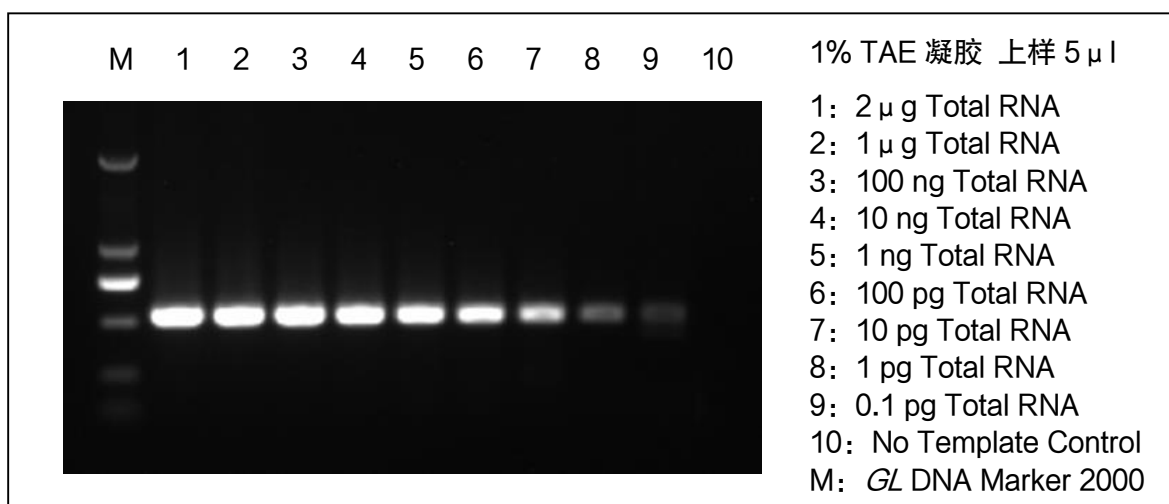


2. 以 293T 细胞 Total RNA 为模板，使用本产品进行一步法 RT-PCR 扩增 537 bp 片段。模板添加量为 2 μ g、1 μ g、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、0.1 pg，检测模板量可达到 0.1 pg。

反应程序如下：

温度	时间	循环数
50°C	30 min	1
94°C	2 min	1
98°C	10 sec	} 40
56°C	15 sec	
68°C	30 sec	

电泳结果如下：



➤ 产品注意事项

1. 合适的模板加入量及浓度

- ❖ 模板加入量降低时，可能会导致扩增效率降低，产物量减少，扩增特异性高；模板加入量升高时，可能会导致扩增效率升高，扩增特异性降低；可根据实际情况调整模板加入量。
- ❖ 模板浓度高，模板取液量体积较小，可能会导致模板加样体积不准，实验重复性差；可将模板适当稀释后加样。
- ❖ 模板的纯度及完整性影响 PCR 反应，采用高质量高纯度的 RNA 模板，可提高 RT-PCR 反应的成功率，降低外源污染。模板降解或模板中含有抑制 RT-PCR 反应的物质等，都可能会导致 RT-PCR 反应扩增效率降低，RT-PCR 反应产物产量减少，建议更换模板，重新实验。

2. 合适的引物

- ❖ 引物完整性不好：可能会导致无扩增产物。
- ❖ 引物设计的原则：
 - ① 引物一般是 15 ~ 30 个碱基的寡核苷酸，GC 含量在 40 ~ 60 % 之间。
 - ② 建议正反向引物 T_m 值在 50 ~ 70°C，尽量减小两者的 T_m 值差，并使差值不超过 5°C。
 - ③ 引物 A、G、C、T 整体分布要尽量均匀，避免使用 GC 或者 AT 含量高的区域。
 - ④ 引物 3' 端避免出现发夹结构。
 - ⑤ 减少引物之间的互补序列，一般不要超过 4 个碱基连续互补序列，尤其是 3' 端，否则可能会形成引物二聚体而产生非特异性的扩增条带。
- ❖ 合适的引物浓度为 0.2 ~ 1.0 μM。引物浓度降低时，扩增效率降低，反应特异性升高。引物浓度升高时，扩增效率升高，反应特异性降低。

3. 合适的变性温度及时间

- ❖ 变性时间过长或温度过高，可能会导致酶活性降低。
- ❖ 变性时间过短或温度过低，可能会导致扩增效率低，电泳条带弥散。

4. 合适的退火温度

- ❖ 退火温度越高，扩增特异性越高，但一定程度上扩增效率会降低。
- ❖ 退火温度过低，可能导致反应特异性不好，或可能出现引物二聚体。

5. 扩增循环数

- ❖ 扩增循环数取决于模板的初始浓度。当模板浓度较低时，则需要大约 40 个循环。对于初始浓度较高的模板，一般推荐 30 ~ 35 个循环。

6. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 反应时需要使用已灭菌的器具，操作过程中避免说话，且需穿戴好实验服、一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。
- ❖ 检查反应程序，确保反应程序设置正确。

➤ 附录：两步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
反转录	50°C	30 min	1
预变性	94°C	2 min	1
变性	98°C	10 sec	} 30 ~ 40
退火和延伸	68°C	30 sec/kb	