

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)

Code No. AG11622

包装量: 50 rxns / 50 μ l
保存温度: -20°C

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。

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

产品组成

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

实验操作

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 μ l 体系
2X One-Step Reaction Solution III (dye plus)	1X	25 μ l
One Step Enzyme Mix III	-	2 μ l
Primer F (10 μ M)	0.4 μ M ¹	2 μ l
Primer R (10 μ M)	0.4 μ M ¹	2 μ l
Total RNA	$\leq 1 \mu$ g ²	-
RNase free water	-	Up to 50 μ l

- *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 Tm 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。

➤ 结果检测

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

➤ 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	

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.