

## 一步法高温RT-PCR 2×SuperMix 目录号: AM0451 AM0452

Component	AM0451A	AM0451B	AM0451C	AM0451D
一步法高温RT-PCR 2×SuperMix	1ml	1ml×5	5ml×4	50ml
Nuclease-free Water	1ml	5ml	20ml	50ml
Component	AM0452A	AM0452B	AM0452C	AM0452D
一步法高温RT-PCR 2×SuperMix(Dye+)	1ml	1ml×5	5ml×4	50ml
Nuclease-free Water	1ml	5ml	20ml	50ml

注：分为是否含有电泳染料两种规格，内含染料规格 PCR 结束后直接上样。

### 产品说明：

本产品一步法RT-PCR 2×SuperMix为RT-PCR反应的专用预混液。可用于RNA分子的扩增和定性分析，样本类型可以是总RNA、mRNA、核糖体RNA、tRNA等。本产品包含MMLV反转录酶2.0、RNase Inhibitor、热启动型 Taq DNA聚合酶、dNTPs和优化的反应缓冲液，浓度为2×。核心组分之一MMLV RTase2.0经基因工程改造，热稳定性显著提高，可以耐受55-60度，使得反转录反应可以在50-55度进行，从而消除了RNA二级结构对反转录的抑制作用。MMLV2.0把RNA链转化成cDNA链后，另一关键酶组分热启动Taq DNA聚合酶以cDNA链为模板，合成双链DNA。Buffer专门针对RT-PCR进行了优化，非常适合于一步法进行RT-PCR反应，RT-PCR 反应时，只需加入RNA模板、引物和水，使2×SuperMix溶液的浓度为1×即可进行反应。

### 特点：

- 一步法高温下进行RT-PCR反应，操作简单，避免开盖造成污染；
- 含有核酸酶抑制剂，可以防止RNA分子的降解；
- 反应Buffer经过优化，同时满足RNase和Taq DNA聚合酶的反应条件；
- 反转录反应可以在50-55度进行，从而消除了RNA二级结构对反转录的抑制作用。

### 适用范围：

目的RNA的RT-PCR扩增，制备mRNA及其它RNA分子的双链DNA。

### 保存：

4度保存1个月；-20℃保存1年。

### 注意事项：

- 本品在4度保存1个月内稳定，尽量避免反复冻融，以免造成酶活下降。如每次使用量较少，推荐小份分装使用。
- 使用前请上下颠倒以混匀Master Mix，短暂低速离心后即可使用。请勿vortex以免酶失活，影响定量结果。
- 加样过程中轻柔吹打，如果操作不慎导致SuperMix起泡，需离心方可使用。

## 应用举例：一步法高温RT-PCR

一步法 RT-PCR 将 RNA 反转录合成 cDNA、目标 cDNA 的 PCR 反应合二为一。以下反应举例为 50  $\mu$ l 标准一步法RT-PCR 体系，仅供参考。实际 RT-PCR 条件应根据模板、引物、目的片段大小加以优化，确定最佳反应条件。

1. 在无RNase A污染的PCR管中配制如下混合液

Component	Volume	Final Concentration
一步法高温RT-PCR 2 $\times$ SuperMix	25 $\mu$ l	1 $\times$
Forward Primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1.5 $\mu$ l	0.3 $\mu$ M
RNA Template*	Variable	as required
dd H <sub>2</sub> O	Variable	-
Total volume	50 $\mu$ l	-

\* Total RNA 的使用量一般为 10 ng~1  $\mu$ g； mRNA 的使用量一般为 1ng~1  $\mu$ g

2. 按下列条件进行RT-PCR反应

### RT-PCR 反应条件

50°C	30 min	} 30-40 Cycles
95°C	3 min	
95°C	15 sec	
55~72°C	20 sec	
72°C	1-2kb/min	
72°C	3 min	

### RT-PCR 反应注意事项

- 本反转录反应条件适合绝大多数RNA，如RNA模板结构复杂，可将反转录温度提高到55度，以提高反转录效果。
- 常规扩增条件的退火温度可以根据引物的T<sub>m</sub>值进行调整，当T<sub>m</sub>较高时可以提高退火温度，增加扩增条带的特异性
- 对于短于300bp的扩增片段，常规扩增条件下72度延伸15秒即可；退火延伸一步法扩增条件下60-68度衍生30秒即可。
- 一般来说反应体系中引物终浓度为0.2 $\mu$ M即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度0.1 - 1.0  $\mu$ M范围内调整引物浓度。