

产品概述

One step RT PCR Mix 针对 RNA 样本开发的一步法逆转录&多重 PCR 扩增试剂。逆转录和 PCR 反应在一管内完成，不需要额外的开管和移液操作，提高了实验效率，降低实验污染的风险。One step RT PCR Mix 以 RNA 为模板，搭配多种高效无核酸残留的逆转录酶和扩增酶，可直接使用多重 PCR 扩增特异性引物组对 RNA 模板进行逆转录并做 PCR 扩增。PCR 产物可直接进行凝胶电泳或 qPCR 分析。PCR 产物也可以使用磁珠纯化后进行文库扩增和测序接头转换。

产品信息

产品名称	货号	规格
One step RT PCR Mix	BR3M301-03	24T
(一步法逆转录多重 PCR 扩增试剂)	BR3M301-06	96T

产品组分

组分名称	组分编号	24T	96T
2x RT PCR Buffer	3M301-A	300μL	1200μL
RP Enzyme Mix	3M301-B	72μL	288μL

保存条件

-20°C保存。使用前请先混匀，并避免反复冻融。

使用方法

1. RNA 一步法逆转录和扩增

1.1 将 2x RT PCR Buffer 室温或冰面上解冻后，轻微震荡混匀后瞬时离心。RP Enzyme Mix 用手指轻弹混匀瞬时离心后置于冰上备用。按照表 1 在 RNase-free 离心管中配制反应液：

表 1 RT PCR 反应体系

组分名称	体积 (μL)	终浓度
2x RT PCR Buffer	12.5	
RP Enzyme Mix	3	
Primer F ^a (10μM)	0.5	0.2μM
Primer R ^a (10μM)	0.5	0.2μM
RNase-free ddH2O	8.5-X	
RNA 模板 ^b	X	
Total	25 ^c	

注：a 引物推荐使用特异性引物进行逆转录和扩增，引物浓度根据实际应用在 0.1μM~0.5μM 之间优化

b RNA 总量按照实验实际需要添加，如模板浓度过低，可将体系放大到 50μL(组分按比例放大)

c 一步法逆转录和扩增产物如后续使用磁珠回收再扩增，建议使用 50μL 体系。如使用 25μL 体系扩增，需将产物补水至 50μL 体积再进行纯化。

1.2 使用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心将管壁反应液离心至管底，在 PCR 仪上进行如下反应：

程序	温度	时间	循环数
热盖	105°C	/	/
1	25°C	1min	1
2	50°C	15min	1
3	95°C	5min	1
4	95°C	30s	
5	60°C ^d	1.5min	15-30 ^e
6	72°C	30s ^f	
7	72°C	1min	1
8	4°C	∞	1

注：^d 根据引物 Tm 值适当调整退火温度（常规设置成低于引物退火温度 1~2°C 即可），如引物 Tm 值差异较大可尝试梯度退火。

^e 扩增循环数根据模板投入量和应用进行调整：如 PCR 结束后产物进行琼脂凝胶电泳分析可适当增大扩增循环数（25-30cycle）；如产物需进一步进行 qPCR 分析，推荐使用 15-25cycle；如产物需进行磁珠纯化回收再进行文库扩增，推荐第一轮扩增使用 15cycle，总扩增循环数不超 30cycle。

^f 扩增产物小于 1kb，建议使用 30s 延伸时间，大于 1kb 产物建议按 1min/kb 设置。

1.3 扩增产物可直接用于琼脂糖凝胶电泳检测、qPCR 荧光定量分析或经磁珠纯化后用于测序文库构建。产物置于-20°C保存。

注意事项

- 1.请使用无 RNase 污染的耗材，并对实验区域定期进行清理。
- 2.文库构建所需要的其他试剂需自备或另外购买。
- 3.本产品仅用作科研用途。