



产品描述

HiPro™ (H-) One Step RT-PCR Kit 专为一步法 RT-PCR 实验配制, 使用该试剂盒能够方便快捷的在同一个反应管内完成逆转录反应和 PCR 扩增反应。反应过程中无需打开管盖添加试剂, 避免了污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。本试剂盒整合了 HiPro™ (H-) Reverse Transcriptase 以及热启动 HotPro™ Taq DNA 聚合酶的优越性能, 配合经过优化的缓冲体系, HiPro™ (H-) One Step RT-PCR Kit 的检测灵敏度可达到 0.1 pg 总 RNA, 并可扩增长达 12 kb 的片段。试剂盒以便捷的 Master Mix 形式提供。2×One Step Mix 包含优化的缓冲体系和 dNTP; One Step Enzyme Mix 包含比例优化的 HiPro™ (H-) Reverse Transcriptase、RNase inhibitor 以及 HotPro™ Taq DNA 聚合酶等。

产品应用

用于一步法反转录 PCR 实验。

产品组成

组份	PC411-01 50 rxn (50 µl/rxn)
2×One Step Mix	625 µl×2
One Step Enzyme Mix	125 µl
RNase free ddH ₂ O	1 ml×2
10 × Loading buffer	1.25 ml

产品储存

-20°C保存。

质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶, 核酸内切酶, RNase 残留。

功能检测 1 : 以 1 µg HeLa cell total RNA 为模板, 扩增 UTRN 基因。琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 可见 12.1 kb 目的条带。

功能检测 2 : 以 0.1 pg HeLa cell total RNA 为模板, 扩增 GAPDH 基因。琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 可见有单一的 550 bp 条带。

注意事项

- 避免 RNase 污染。请保持实验区域洁净, 操作时需要戴干净的手套、口罩, 实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证 RNase free。
- 为保证反应成功建议使用高质量的 RNA 模板
- 不同的片段, 所需最佳 RNA 模板用量不同, 过多的 RNA 会抑制反应, 建议根据反应调整模板用量。



应用实例

1. 在 RNase free 离心管中配制如下混合液:

RNase free ddH ₂ O	to 50µl
2×One Step Mix	25 µl
One Step Enzyme Mix	2.5 µl
Forward Primer (10 µM)	2 µl
Reverse Primer (10 µM)	2 µl
RNA template	0.1 pg-1 µg

注意: 可根据实验需要, 调整反应体积, 各组分用量只需按比例做相应调整即可。

2. 按下列条件进行 One Step RT-PCR 反应:

目的片段 < 5 kb:

50 °C	30 min	} 30-35 cycles	★ 如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域, 可将反应温度提高至 55°C, 有助于提高产量。
94 °C	3 min		
94 °C	30 sec		
50-72 °C ^①	30 sec		
72 °C	0.5-1 min/ kb ^②		
72 °C	7 min		
4 °C	Hold		

目的片段 > 5 kb:

50 °C	30 min	} 30-35 cycles	★ 如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域, 可将反应温度提高至 55°C, 有助于提高产量。
94 °C	3 min		
94 °C	10 sec		
68 °C ^①	1 min/ kb ^②		
72 °C	7 min		
4 °C	Hold		

①退火温度需要根据引物退火温度调整, 一般设置成低于引物退火温度 1-2°C 即可。对于 > 5 kb 的片段, 推荐使用长引物, T_m 值在 68-70°C, 把退火/延伸温度合并为 68°C。

这样可以显著提高扩增特异性。

②对于 < 5 kb 的片段, 延伸时间最少设置为 0.5 min/ kb ; 对于 > 5 kb 的片段, 延伸时间最少设置为 1 min/ kb。一般来说, 延伸时间的延长有利于提高扩增产量。

3. 产物用琼脂糖凝胶电泳检测。