

AFT AFTRT One Step RT-PCR Kit 超强一步法反转录试剂盒

产品名称	单位	货号
AFT AFTRT One Step RT-PCR Kit	100T	AFT2032-01

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

本试剂盒是专为一步法 RT-PCR 实验研制，逆转录和 PCR 在同一反应体系中进行，反应过程中无需添加试剂，无需打开管盖，在避免污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。本试剂盒包括全新高效逆转录酶、快速热启动 DNA 聚合酶，同时包含适用于逆转录和 PCR 扩增的反应缓冲液和实验中所必需的其它组分。AFTRT 逆转录酶 RNase H 活性缺失，减少了逆转录反应中 RNA 的降解。该逆转录酶逆转录效率高，可对少量 RNA 模板进行良好的逆转录反应。PCR 反应使用的快速热启动 DNA 聚合酶具有扩增效率高、特异性强、延伸速度快的优良性能。独特的缓冲体系使逆转录酶和聚合酶同时发挥最大功效。使用本试剂盒扩增得到的目的产物 3'端附有一个“A”碱基，可直接用于 T/A 克隆。

【产品组分】

AFTRT OneStep Enzyme Mix	50 µl
2×AFTRT OneStep Buffer	1.4 ml
RNase-Free Water	1.5 ml

【注意事项】

1. 在操作过程中应避免 RNase 污染，防止 RNA 降解或实验中的交叉污染，建议在专门的区域进行 RNA 操作，使用专门的仪器和耗材，操作人员戴口罩和一次性手套并经常更换手套。
2. 实验尽量使用一次性塑料器皿，若使用玻璃器皿，应使用 0.1%DEPC（焦碳酸二乙酯）水溶液在 37°C处理 12 小时，并在 120°C 下高压灭菌 30 分钟后使用，或者将玻璃器皿在 180°C下干热灭菌 60 分钟后使用。实验中用到的无菌水应使用 0.1%的 DEPC 处理后进行高压灭菌。
3. 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回-20°C，避免反复冻融。
4. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择，引物设计的好坏直接影响到 RT-PCR 反应的结果，设计引物时需考虑 GC 含量，引物长度，引物位置，PCR 产物的二级结构等因素，建议采用专业的引物设计软件来设计。

【操作流程】

1. 将 RNA 模板、引物、OneStep RT-PCR Buffer、AFTRT OneStep RT-PCR Enzyme Mix 和 RNase-Free Water 溶解并置于冰上备用。
2. 向冰浴中预冷的无 RNase 反应管中加入下表中试剂，至终体积 25 μ l:

试剂	25 μ l 反应体系	终浓度
2 \times AFTRT OneStep Buffer	12.5 μ l	1 \times
Forward Primer, 10 μ M	1 μ l	0.4 μ M
Reverse Primer, 10 μ M	1 μ l	0.4 μ M
AFTRT OneStep Enzyme Mix	0.5 μ l	
RNA Template	X μ l	1 pg-1 μ g
RNase-Free Water	up to 25 μ l	

注意：引物浓度请以终浓度 0.1-1.0 μ M 作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，由此优化反应体系。

3. 涡旋震荡混匀，短暂离心，将溶液收集到管底。
4. 将热循环仪预热到 45 $^{\circ}$ C，将 PCR 管置于热循环仪中，进行 RT-PCR 反应。

反应条件：

步骤	温度	时间
反转录	45 $^{\circ}$ C	30 min
PCR 预变性	95 $^{\circ}$ C	2 min
以下 30-40 个循环		
变性	94 $^{\circ}$ C	30 s
退火	55-65 $^{\circ}$ C	30 s
延伸	72 $^{\circ}$ C	30 s
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min

注意：1) 一般 PCR 实验中退火温度比扩增引物的熔解温度 T_m 低 5 $^{\circ}$ C，退火时间一般为 20-30 秒，无法得到理想的扩增效率时，适当降低退火温度；发生非特异性反应时，提高退火温度，由此优化反应条件。

2) 延伸时间根据扩增的片段大小设定，本产品中包含的 DNA Polymerase 扩增效率为 1 kb/30s。

3) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。循环次数太少，扩增量不足；循环次数多，错配机率会增加，非特异性背景严重。所以，在保证产物得率的前提下，应尽量减少循环次数。

5. 反应结束后取 5 μ l 反应产物，加入适量上样缓冲液后进行电泳检测结果。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。