

## Livning™ One-step RT-PCR Kit

**一步法反转录试剂盒使用说明书**

产品名称	规格/单位	货号
Livning™ One-step RT-PCR Kit	50T/盒	B1069-1
Livning™ One-step RT-PCR Kit	50T*10支/盒	B1069-2

**【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。SuperRT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】**

	B1069-1	B1069-2
SuperRT OneStep EnzymeMix	25 $\mu$ l	25 $\mu$ l*10 (液量很少, 使用前务必离心)
2 $\times$ SuperRT OneStep Buffer	0.7ml	0.7ml*10
RNase-Free Water	0.75ml	0.75ml*10

**【操作流程】**

1. 将RNA模板、引物、OneStep RT-PCR Buffer、SuperRT 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  $\mu$ l:

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

**注意:** 引物浓度请以终浓度0.1-1.0  $\mu$ 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。

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°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°C	30 min
PCR预变性	95°C	2 min
以下30-40个循环		
变性	94°C	30 s
退火	55-65°C	30 s



延伸 72°C 30 s  
终延伸 72°C 5 min

北京利维宁生物科技有限公司 电话：010-5858435458

注意：1) 一般PCR实验中退火温度比扩增引物的溶解温度 $T_m$ 低5°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。

4) 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  $\mu$ l反应产物，加入适量上样缓冲液后进行电泳检测结果。

## 【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，  
2. 操作人员带口罩和一次性手套并经常更换手套。

3. 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。

4 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。

5. 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。

## 【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。

---

。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。