

NovoScript® Two-Step RT-PCR Kit

目录号: E046

产品描述:

NovoScript® Two-Step RT-PCR Kit 两步法 RT-PCR 试剂盒是基于本公司 NovoScript® Reverse Transcriptase 反转录酶 (Cato: E123) 和 HotStart Taq DNA 聚合酶 (Cat.No: E017), 具有高效合成能力和高扩增效率。该试剂盒能以动物、植物和微生物的总 RNA 或 mRNA 为模板, 用 2×NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix 进行反转录, 然后用 2×HotStart Taq Master Mix (Cat.No: E027) 进行扩增。本试剂盒含有从 RNA 到 cDNA, 以 cDNA 为模板进行扩增的全部试剂。

产品特点:

- 操作简单: 操作步骤少, 降低污染。
- 特异性高: 使用 HotStart Taq 酶进行扩增, 减少非特异性反应。

操作方法:

I. 第一链 cDNA 合成

试剂融化后, 将试剂盒中各组分混匀并稍微离心后置于冰上。

1) 按顺序加入以下反应物:

模板 RNA	总RNA(0.1 ng -5µg)
	poly(A) mRNA(10 pg)
	特异性 RNA(0.01 pg)
2×NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	10µl
RNase Free Water	至20µl

可选步骤: 如果 RNA 模板 GC 含量高或者含有二级结构, 可先将 RNA 模板和 RNase Free Water 混匀后, 65°C 孵育 5 分钟 (有助于打开高级结构, 便于下一步反应的进行), 迅速置于冰上冷却, 再加入其它组分。

2) 轻轻混匀, 离心。

3) 42°C 孵育 15-30 分钟 (如果 RNA 模板中不含 poly A 结构, 25°C 先孵育 5 分钟, 随后 42°C 孵育 15-30 分钟)。

4) 产物可直接用于下一步反应。如果不立即使用, 可于 -20°C 保存一周, 长时间保存建议 -70°C 放置。

保存温度: -20°C。

产品包装:

产品组成	E046-01A
2×NovoScript® 1st Strand cDNA Synthesis SuperMix	500µl
2×HotStart Taq Master Mix (Quick Load)	1ml×2
RNase Free Water	1ml

注意事项:

1) 本试剂盒进行 PCR 扩增时延伸时间为 1kb/min, 客户可根据具体片段长度进行延伸时间的调整。

2) 如果同时操作多个样品, 建议先在冰上先配制预混液, 然后再分装到各个反应管中, 加入模板启动反应。

3) 反应扩增时出现目标条带拖带, 系模板浓度过高或特异引物浓度不适等原因所致, 可对模板及引物浓度等进行调整; 反应出现杂带, 可对退火温度进行调整, 或重新设计特异性高的引物。

4) 为了保证反应的正常进行, 需使用高质量的 RNA 模板。

II. 第一链 cDNA 的 PCR 扩增

合成的第一链cDNA可直接用于PCR。

常用反应体系 (20µl):

2×HotStart Taq Master Mix*	10µl
上游引物	0.2-1.0µM (终浓度)
下游引物	0.2-1.0µM (终浓度)
模板	1-2µl
ddH ₂ O	至 20µl

常用 PCR 循环:

当扩增片段 < 3K:

94°C,	5 分钟
30 次循环:	{ 94°C, 20 秒 50-60°C, 20 秒 72°C, 60 秒/kb
72°C	5 分钟
4°C	保温

当扩增片段 ≥ 3K (推荐引物长度 ≥ 30bp):

94°C,	5 分钟
30 次循环:	{ 94°C, 5 秒 68°C, 60 秒/kb
72°C	5 分钟
4°C	保温

仅供科研或生产使用, 不可直接应用于人体

近岸蛋白

Novoprotein Scientific Inc.

技术咨询电话: 400-600-0940; (021)5079-8060

官方网站: www.novoprotein.com.cn

邮箱: product@novoprotein.com.cn

地址: 上海市浦东新区张江高科技园区伽利略路11号1号楼