

HiFi One-Step RT-PCR Mix 说明书

本产品仅供体外研究使用，不得用于临床诊断

描述：

本试剂采用稳定高效的 RT-PCR 预混体系，是以 RNA 为模板进行一步法 RT-PCR 的专用试剂。其原理为用基因特异性引物进行反转录反应，获得第一链 cDNA（不可使用 Oligo (dT) 或 Random Primer 合成第一链 cDNA），再使用基因特异性正向引物和反向引物进行 PCR 扩增，在同一反应体系中一步完成从反转录到 PCR 的全部过程。反应体系中已含有电泳所需的指示剂（蓝色和黄色），反应后可以直接进行电泳。

在本试剂盒中，将耐热 M-MLV 反转录酶、Rnase Inhibitor、Hotstart 高保真 DNA 聚合酶以及稳定剂等配制成 50×One-Step Enzyme Mix 预混液，反应 Buffer、dNTP 以及电泳指示染料配制成 5×HiFi One-Step RT-PCR Buffer，因此使得操作更加简单便，扩增产物可用于平端克隆和 DNA 测序。

主要优势：

耐热 M-MLV 反转录酶可在 55℃ 反应能更好的打开复杂二级结构，只需 10min 即可完成逆转录。DNA 聚合酶为热启动型高保真酶，能够有效的抑制非特异性反应且具有较高的校正活性，酶激活仅需 2min。具有宽泛的模板量兼容性，10 ng~1 μg 都可有效扩增。反应过程中无需开盖，避免了操作过程中的污染危害。

组分

名称	250T
50×One-Step Enzyme Mix	100 μl
5×HiFi One-Step RT-PCR Buffer	1 ml
RNase Free H2O	1 ml×3

储存：请置于 -20° C，可保存 2 年；避免反复冻融。

注意：

- 50×One-Step Enzyme Mix 粘度高，第一次使用之前要离心收集至反应管底部，吸取时应缓慢小心。
- 由于使用了 Hotstart 高保真 DNA 聚合酶，反应配制可在常温进行，但各组分应 -20° C 保存。

实验操作和反应条件：

- 按以下组分配制反应液

RNA(病毒 DNA/RNA 样品直接使用 2~10 μ l)	10 ng~1 μ g
5 \times HiFi One-Step RT-PCR Buffer	4 μ l
50 \times HiFi One-Step RT-PCR Enzyme Mix	0.4 μ l
基因特异性上游引物 (10 μ M)	0.8 μ l
基因特异性下游引物 (10 μ M)	0.8 μ l
Rnase Free H ₂ O	Up to 20 μ l

注意: 超过 1 μ g 的 RNA 模板量会抑制 PCR 反应, 建议第一次可使用 200 ng 的 RNA 模板, 然后根据结果进行优化。

2. 在 PCR 仪上按以下条件进行 RT-PCR 反应:

55 $^{\circ}$ C, 10min	逆转录反应
95 $^{\circ}$ C, 2min	失活 M-MLV, 并激活高保真聚合酶
95 $^{\circ}$ C, 20s	30~40 cycles
T _M $^{\circ}$ C, 20s	
72 $^{\circ}$ C, 2Kb/min	
72 $^{\circ}$ C, 2min	末端延伸

3. PCR 反应结束后, 可取 5 μ l 产物直接进行电泳检测。预混液中已经包含绿色染料, 无需再加入 DNA Loading Buffer。1% Agarose 电泳时, 蓝色指示剂指示 3~5 kb, 黄色指示剂指示 <50 bp。