

Version: AG 3.2 (2021.04.01修订)

## SPARKscript II One Step RT-PCR Kit

目录号: AG0402

### 01/产品组分

序号	组分	AG0402 50 rxn(50μL/ rxn)
1	2×One Step Mix	625 μL×2
2	One Step Enzyme Mix	125 μL
3	RNase Free H <sub>2</sub> O	1 mL×2
4	10×Loading buffer	1.25 mL

### 02/保存条件

本产品所有组分-20℃保存。

### 03/产品概述

本试剂盒专为以 RNA 为模板（如 RNA 病毒）的终点法 PCR 检测而设计。试剂盒以便捷的 Master Mix 形式提供，使用基因特异引物（GSP），逆转录和 PCR 反应在一管内完成，不需要额外的开管/移液操作，提高了检测通量，并降低了污染的风险。2×One Step Mix 包含优化的缓冲体系及 dNTP；One Step Enzyme Mix 整合比例优化的 SPARKscript II H<sup>-</sup> Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 和专为长片段扩增设计的 Spark HotMaster Taq Plus DNA Polymerase 的优越性能，配合经过优化的缓冲体系以及 RNase Inhibitor，检测灵敏度可达到 1 pg 总 RNA，并可扩增长达 10 kb 的片段。

### 04/质量控制

所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶及 RNase 残留。

功能检测 1: 以 1 μg HeLa cell total RNA 为模板，扩增 FBN1 基因。琼脂糖凝胶电泳，EB 染色，可见 10 kb 目的条带。

功能检测 2: 以 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。

## 05/注意事项

### 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 防止 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。
- ◇ 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<sub>m</sub> 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。
- ◇ 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。

## 06/建议反应体系

### 以 50 μL 反应体系为例

1. 将模板 RNA 在冰上解冻，RNase Free H<sub>2</sub>O 在室温（15-25°C）解冻，解冻后迅速置于冰上，所有组分置于冰上备用。使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 在 RNase Free 管里面加入以下成分，建议使用 PCR 管冰上配制。

Components	Volume
RNase Free H <sub>2</sub> O	up to 50 μL
2×One Step Mix	25 μL
One Step Enzyme Mix	2.5 μL
Gene Specific Forward Primer (10 μM)	2 μL
Gene Specific Reverse Primer (10 μM)	2 μL
模板 RNA	Total RNA: 1 pg-1 μg

▲ 可根据实验需要，调整反应体积，各组分量只需等比例做相应调整即可。

3. 按下列条件进行 One Step RT-PCR 反应。

目的片段 <5 kb:

50°C	30 min	1 cycle
94°C	3 min	1 cycle
94°C	30 sec	30-35 cycles
55-72°C	30 sec	
72°C	0.5-1 min/kb	
72°C	7 min	1 cycle
4°C	Hold	1 cycle

目的片段>5 kb:

50°C	30 min	1 cycle
94°C	3 min	1 cycle
94°C	10 sec	30-35 cycles
68°C	1 min/kb	
72°C	5 min	1 cycle
4°C	Hold	1 cycle

▲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。

产物直接用琼脂糖凝胶电泳检测。

## 07/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC0601 SPARKeasy 病毒RNA快速提取试剂盒

AC0602 SPARKeasy 病毒DNA/RNA快速提取试剂盒

AC1705 高效固体表面RNase清除剂

AC1708 RNA酶抑制剂

AC1709 RNase Free and DNase Free纯水

本产品仅用于科学研究！

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: [support@sparkjade.com](mailto:support@sparkjade.com)

