货号：PM504

5×Neoscript RT Premix (RT-PCR)

2023V01

BiOri 宝锐生物

产品概述

Neoscript RT Premix (RT-PCR) 是一步法 RT-PCR 反应的专用试剂，反转录和 PCR 扩增在同一管内连续进行，反应过程中避免开管，能有效防止污染。本品含有去除 RNase H 活性的高温反转录酶 Neoscript RTase 和新型热启动酶，具有更高的反转录和 PCR 扩增效率，采用优化配方的专用 Buffer，适合于低浓度 RNA 模板的高灵敏度扩增。

试剂组成

1. 25×Neoscript RTase Mix (RT-PCR)
2. 5×Neoscript RT Premix Buffer (RT-PCR)

保存条件

-20°C长期保存，4°C可保存 3 个月。使用前应混匀，避免反复冻融。

RT-PCR 反应体系配制

试 剂	25 μL 体系	50 μL 体系	终浓度
5×Neoscript RT Premix Buffer (RT-PCR)	5 μL	10 μL	1×
25×Neoscript RTase Mix (RT-PCR)	1 μL	2 μL	1×
25×Primer Mix [1]	1 μL	2 μL	1×
Template RNA [2]	——	—	——
ddH_2O	To 25 μL	To 50 μL	——

1. 通常引物终浓度为 0.2 μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.2~1 μM 范围内调整引物浓度。
2. 不同种类的模板中含有的靶基因的拷贝数不同，必要时可进行梯度稀释，确定最佳的模板添加量。

反应条件

两步法			
步骤	温度	时长	循环数
逆转录	50°C	10~20 min	1
变性	95°C	1~5 min	1
变性	95°C	10~20 s	30~40
退火延伸	56~64°C	20~60 s	

三步法			
步骤	温度	时长	循环数
逆转录	50°C	10~20 min	1
变性	95°C	1~5 min	1
变性	95°C	10~20 s	30~40
退火	56~64°C	10~30 s	
延伸	72°C	10~60 s	

电泳检测

将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测分析。

质量控制

1. 功能检测：RT-PCR 的敏感性、特异性、可重复性。
2. 无外源核酸酶活性，无外源内切、外切核酸酶污染。

技术说明

1. 该体系常用 50°C进行反转录反应，可以在 42°C~55°C范围内进行反转录温度优化；根据反应特征不同，可以在 5~30 min 内对反转录时间进行优化。
2. 针对复杂模板低丰度的基因，加入终浓度 0.5 μM 的 Oligo dT 能适当提高扩增效率。
3. 该体系具有更好的体系稳定性和适用性，非常适合于病毒类、组织提取 RNA 复杂模板的检测；对极低浓度模板的扩增效果更加稳定。
4. 对于退火温度较低的引物或超过 200 bp 长片段扩增建议采用三步法。
5. 扩增前后请使用专用的区域和移液器，戴手套操作并经常更换；PCR 反应完成后切勿打开反应管，以最大限度地减少 PCR 产物对样品的污染。