

AccessQuick™ RT-PCR 系统操作说明

(目录号 A1700/A1701/A1702/A1703)

保存条件: 将 AccessQuick™ RT-PCR 系统储存于-20℃。避免多次反复冻融和经常性的温度波动。

标准 RT-PCR 操作流程

AccessQuick™ RT-PCR 系统是一种用于建立单管 RT-PCR 反应的简便的预混液系统。为方便 RT-PCR 反应进行,该系统在一个管中混合了以下组分: *Tfi* DNA 聚合酶、dNTPs、硫酸镁和反应缓冲液。AMV 逆转录酶单独放置在另一管中,便于设立无逆转录的对照反应。采用该系统进行 RT-PCR 反应时,只需将 AccessQuick™ Master Mix 加入到含有 RNA 模板的反应管中,然后加入 AMV 逆转录酶和引物即可。

A. 反应组分配制

1. 使用无菌、无核酸酶的 PCR 管。
2. 每个 50μl 逆转录 (RT) 反应体系,混合以下组分:

组分	体积	终浓度
AccessQuick™ Master Mix, 2×	25μl	1×
上游引物, 10 μM	0.5-5.0 μl	0.1-1.0 μM
下游引物, 10 μM	0.5-5.0 μl	0.1-1.0 μM
RNA 模板	1-5 μl	1pg-1 μg
无核酸酶的水补齐至	50 μl	

在分装前,注意确保将 AccessQuick™ Master Mix 充分混匀。

3. 最后加入 1μl (5u) AMV 逆转录酶,轻柔振荡或吹吸混匀。

注意:

- 如果同时操作多个样品,可以在冰上先将适当量的各组分混合成预混液,然后再分装到各个反应管中。加入模板启动反应。每一次加样都要用新的吸头,注意不要使样品发生交叉污染。
- 如需计算寡核苷酸在 AccessQuick™ 反应缓冲液中的解链温度,可使用 www.promega.com/biomath/中的 T_m 计算器 (T_m Calculator) 工具。

B. 逆转录

1. 将反应管置于 45°C 孵育 45 分钟。
2. 继续进行 PCR 循环。

注意：

- 反应条件可能需要优化。我们推荐从 45°C 孵育 45 分钟开始优化；有效的 cDNA 第一链合成可以在 37-45°C 孵育 15-60 分钟完成。

C. PCR 扩增

变性

初始变性步骤通常为 95°C，2 分钟。后续的变性步骤可在 30 秒到 1 分钟之间。

退火

可从低于引物的理论计算解链温度 5°C 左右开始优化退火条件，每次将退火温度增加 1°C。退火步骤通常为 55-65°C，30 秒至 1 分钟。

延伸

延伸反应通常在 *Tfi* DNA 聚合酶的最适温度 68-72°C 下进行。每 1kb 目的 DNA 延伸 30 秒到 1 分钟。当使用适当的模板量来扩增小的目的片段 (<500bp) 时，延伸步骤可以省略。最终的延伸步骤推荐在 68-72°C 延伸 5 分钟。

Soak Cycle

将反应 4°C 保温过夜。长期保存推荐储存于 -20°C。

循环数

通常，25-30 个循环可达到最佳的扩增。某些情况下，尤其是检测低拷贝数的目的基因时，可以将循环数增加到 40 个。