

# 一步法 RT-PCR 使用说明书

本试剂盒适用于各种动、植物、病毒 RNA 的 PCR 检测，反转录 PCR 反应体系为 50 $\mu$ l，用户在使用此试剂盒之前请详细阅读此说明书。

规格：10 次

试剂盒组成：

名称	浓度	体积
dNTPs	10 mM	50 $\mu$ l
5 $\times$ 反应缓冲液		100 $\mu$ l
AMV 反转录酶	5u/ $\mu$ l	20 $\mu$ l
Taq DNA 聚合酶	5u/ $\mu$ l	20 $\mu$ l
DEPC-ddH <sub>2</sub> O		1.5ml
RNasin	40u/ $\mu$ l	20 $\mu$ l

实验操作：

- 取 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> 拷贝的特异目的模板或 1pg-5 $\mu$ g 的总 RNA 于一支 0.2 或 0.5ml 离心管中，65-70 $^{\circ}$ C 保温 5-10 分钟，离心数秒，放置冰浴中。
- 按照指定的体积将 DEPC-ddH<sub>2</sub>O，5x 反应缓冲液，dNTPs，特异上下游引物及 25mM MgSO<sub>4</sub> 加入到置于冰上的 0.5ml 薄壁反应管中，配制成反应混合物。反复吹吸使混合物中各组分混合均匀。然后向反应体系中加入 AMV 反转录酶和 Taq DNA 聚合酶和 RNasin。将反应管轻柔震荡 10 秒以使该混合物混匀。如需要做多个样品的 RT-PCR 反应，则应在冰上先配制一总的混合物，该混合物由反应体系中各组分按其指定体积的适当倍数组成，然后取该总混合物 48 $\mu$ l 加入到每一反应管中。向各反应管中加入模板以启动反应。每次加样均应使用单独的加样器枪头，小心勿使样品之间相互污染。

	体积	终浓度
DEPC-ddH <sub>2</sub> O (加至终体积为50 $\mu$ l)	X $\mu$ l	
5 $\times$ 反应缓冲液	10 $\mu$ l	1 $\times$
dNTP混合物 (每dNTP 10mM)	1 $\mu$ l	0.2mM
下游引物*	50pmol	1 $\mu$ M
上游引物*	50pmol	1 $\mu$ M
25mM MgCL <sub>2</sub>	2 $\mu$ l	1mM
AMV反转录酶 (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	0.1U/ $\mu$ l
Taq DNA聚合酶 (5U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l	0.1U/ $\mu$ l
RNasin		
RNA样品或对照**	Y $\mu$ l	
终体积	50 $\mu$ l	

\* 计算引物为 50pmol 时所对应的质量 (纳克) 的通用公式为：50pmol=16.3ng $\times$ b；b 为引物碱基数目。对于阳性对照反应，上、下游对照引物均使用 3.3 $\mu$ l (50pmol)。

\*\*103-106 拷贝的特异目的模板或 1pg-1μg 的总 RNA。使用 2μl 带有载体的阳性对照 RNA (2.5 attomole 或 1×10<sup>6</sup> 个拷贝)。

3. (如果热循环仪无热盖功能，则须加入 1 或 2 滴 (20-40μl) 无核酸酶的矿物油覆盖反应体系，以防止反应物浓缩和蒸发。)
4. 将各反应管置于可控温的加热器中，42℃ 孵育 45 分钟。
5. 将各反应管直接进入热循环反应，使反应体系进行第 2 条 cDNA 链的合成及扩增。一般反应条件：(仅供参考)

94℃ 预变性 2 分钟

94℃ 变性 45 秒

50-65℃ 复性 45 秒

72℃ 延伸 1 分

扩增 30 轮

72℃ 延伸加时 5 分钟

4℃ 保存

#### 试剂盒说明：

1. 储存：-20℃ 冻存，至少稳定 6 个月。
2. 用户所使用离心管、吸头均需经过 DEPC 处理并高压灭菌。
3. 总 RNA 若有轻微降解，目的基因同样能扩增出来。



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市北桥吴河路328号A座2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：021-5446 0832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

