



# 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仔细阅读此说明书。

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

