



荧光定量 PCR 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 的荧光定量 PCR 检测，反转录 PCR 反应体系为 30 μ l，用户在使用此试剂盒之前请仔细阅读此说明书。

本试剂盒主要有两个部分组成：RT-PCR MIX 和 2 \times 反应缓冲液。RT-PCR MIX 由反转录酶和 Taq DNA 聚合酶组成的混合酶，既可 cDNA 合成又可 PCR 扩增。2 \times 反应缓冲液对其主要成分 Mg²⁺、dNTPs 及稳定剂都已经优化，直接用于荧光定量 PCR 的检测，用户只需加入引物探针和一定的模板即可，适用各种荧光定量 PCR 仪如：lightcycler、ABI7000、icycler 等。（本试剂盒不适合做 sybr green 染料法）

编号：ZK00101

规格：10 次

试剂盒组成：

名称	浓度	体积
2 \times 反应缓冲液		300 μ l
RT-PCR MIX		20 μ l

实验操作：

1. 取 10³-10⁶拷贝的特异目的模板或 1pg-1 μ g的总RNA或 1-10ng纯化的mRNA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。（此步骤是为了变性RNA，建议保留）
2. 反应体系的配制：

组分	体积	终浓度
2 \times 反应缓冲液	15 μ l	1 \times
下游引物*(25pmol/ul)	1ul	0.5-1 μ M
上游引物*(25pmol/ul)	1ul	0.5-1 μ M
荧光探针*(25pmol/ul)	0.3ul	0.2-0.5 μ M
RT-PCR MIX	2 μ l	
RNA样品或对照**	Y μ l	
DEPC-ddH ₂ O（加至终体积为30 μ l）	X μ l	
终体积	30 μ l	

按照指定的体积将 DEPC-ddH₂O、2x 反应缓冲液、RT-PCR MIX、特异上下游引物探针加入到置于冰上的 0.2ml 薄壁反应管中，配制成反应混合物，将反应管轻柔震荡 10 秒以使该



混合物混匀。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。

* 计算引物为 50pmol 时所对应的质量（纳克）的通用公式为： $50\text{pmol}=16.3\text{ng}\times b$ ；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 μl （50pmol）。

** 10^3 - 10^6 拷贝的特异目的模板或 1pg-1 μg 的总RNA。使用 2 μl 带有载体的阳性对照RNA（2.5 attomole或 1×10^6 个拷贝）。

3. 如果热循环仪无热盖功能，则须加入 1 或 2 滴（20-40 μl ）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。

1) FTC2000、PE5700、7700、7300、icycler、Rotogene 等荧光仪的程序设置

48 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 分钟，然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 保温 5 分钟，再按 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒循环 40 次。

2) lightcycler 荧光仪的程序设置

反应管置于 LightCycler 自动荧光 PCR 仪上，48 $^{\circ}\text{C}$ 反应 20 分钟，94 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟，再按 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒循环 40 次，每个循环的升降温速率为 20 $^{\circ}\text{C}/\text{S}$ ，每个循环在 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 秒处进行荧光检测设置。

试剂盒说明：

1. 储存：-20 $^{\circ}\text{C}$ 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。
4. 如果不是用 taqman 探针，如 beacon 探针，可以使用三步法的扩增程序。
5. 第一步的反转录温度可以根据下游引物的退火温度在 42 度到 48 度之间调整。
6. 用户可以根据引物探针的 Tm 值，适当地调整退火温度
7. Only for Research!



上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市闵行区北桥镇吴河路328号A栋2楼

邮编：201109

联系：市场部

电话：54460832 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

