



荧光定量 PCR 两步法 RT-PCR 试剂盒

一、试剂盒组成：

Material Provided	ZK00302 (50 次)
2X First-Strand Buffer	500 μ l
RT-mix	50 μ l
Random primer (0.1 μ g/ μ l)	50 μ l
Oligo(dT) ₁₈ primer (0.1 μ g/ μ l)	50 μ l
DEPC-treated Water	1ml
hotstart fluo-PCR mix (2X)	1250ul
Protocol	1 份

注意：所有试剂必须在-20℃保存。 有效期 6 个月

二、简介：

本试剂盒提供的试剂能从微量的 mRNA 或总 RNA 中高效率的合成出 cDNA 第一链。采用的是高效 Reverse Transcriptase，它能非常有效地以 RNA 为模板，在 Oligo(dT) primer, Random Primers 或其它特定的引物与 RNA 退火后，从引物的 3'-末端合成与 RNA 互补的 DNA (cDNA 第一链)。

本试剂盒中荧光定量 PCR 核心 mix，对体系进行了优化，增加了扩增效率，同时使用更简单，提高工作效率。

三、准备工作：

- 1) 用 0.1%DEPC 水过夜室温或 37C 处理 1.5 ml Eppendorf 管和取液用 10 μ l, 200 μ l 和 1 ml Tip, 高温蒸气灭菌，80℃烘干备用。
- 2) 制备 RNA 模板。总 RNA 和 mRNA 均可以作为 First-Strand cDNA 合成的模板材料。本试剂盒每次反应需要 500ng-2 μ g 左右 总 RNA 或者 25-50ng 左右的 mRNA。RNA 溶于 DEPC-H₂O，体积不大于 8 μ l。

四、First-Strand cDNA 合成：

注意：戴手套进行以下操作，严防 RNase 污染。

1. 在 1.5ml Eppendorf 管中加入 500ng-2 μ g 总 RNA，或 25-50ng poly(A)+ mRNA。加入 DEPC-H₂O 使总体积为 8 μ l。
2. 加入 1 μ l Random primers，或 1 μ l Oligo(dT)₁₈ primer，或者 1ul 的特异性下游引物 (25 μ mol/ul)。小心混匀。
3. 65℃ 保温 5 分钟。
4. 室温放置 10 分钟。室温高速离心 5 秒钟，将所有溶液收集到管底。
5. 按次序分别加入下列试剂：

2X First-Strand Buffer	10ul
RT-mix	1ul
Total:	20ul

- 小心混匀，如果是用Random primers，建议 25℃ 10 分钟，40℃ 50 分钟；如果是用 Oligo(dT)₁₈ primer，建议 42℃ 50 分钟；如果是用特异性的下游引物，建议 48℃ 50 分钟。
- 然后 90℃ 处理 5 分钟。冰上冷却，室温高速离心 5 秒钟，将所有溶液收集到管底。
- 反转录好的cDNA可以用于PCR扩增、荧光定量PCR检测或cDNA的 2nd链的合成。

五、荧光 PCR 反应

反应液配制

反应液组份	加量 (μl)	终浓度	备注
Hotstart Fluo-PCR mix	25	1×	
上游引物(25pmol/ul)	1	30~900nM	用户提供
下游引物(25pmol/ul)	1	30~900nM	用户提供
探针(25pmol/ul)	0.5	200nM	用户提供
cDNA(ul)	2	10~100ng	用户提供
无菌去离子水(ul)	20.5	-	用户提供
总体积(ul)	50	-	

六、扩增条件

使用 taqman 探针，用 0.2ml 薄壁管做反应的仪器建议使用如下程序：

94℃ 4 分钟 → 94℃ 30 秒 → 60℃ 1 分钟

 40 个循环

使用 taqman 探针，用毛细管做反应的仪器建议使用如下程序：

93℃ 2 分钟 → 93℃ 15 秒 → 60℃ 30 秒

 40 个循环

七、注意事项：

- 引物如何选用取决RNA模板的类型。Oligo(dT)₁₈引物用于RNA 3'-末端有poly(A)⁺结构的cDNA合成，合成效率高，特异性好。Random primer则适用各种RNA,合成效率高，通用性好，但特异性较差，对RNA模板的质量要求较高，通常要求RNA模板无DNA污染。如果合成的cDNA仅仅用于扩增特定的基因，合成cDNA第一链的

引物也可以是用户特定的引物，序列与RNA互补。

- 制备的cDNA可以不纯化直接用作PCR模板，用量为 1-5 μ l。如使用过量，1st strand cDNA合成反应体系中的盐和Random primers将会抑制Taq DNA聚合酶的活性。
- 如果有必要cDNA 1st strand纯化，可按下列方式纯化：cDNA合成反应结束后（步骤6），在反应体系中加入RNase A, 37 $^{\circ}$ C保温 10 分钟，用柱子回收cDNA。
- 如果后续操作对 cDNA 的用量不是很多，可以相应减少用，整个体系可以缩小到 10 μ l，各试剂的用量相应减半；荧光定量 PCR 反应体系也可以减半使用。
- 如果是用 beacon 等其它杂交探针，建议扩增程序用三步法。
- 本试剂盒不建议用 sybr green I 染料法检测。
- **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

