

# 二步法 RT-PCR 试剂盒

## 一、试剂盒组成：

Material Provided	ZK00305 (50 次)
2X First-Strand Buffer	500 $\mu$ l
RT-mix	50 $\mu$ l
Random primer (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
Oligo(dT) <sub>18</sub> primer (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
DEPC-treated Water	1ml
Hotstart E-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 $\mu$ l, 200 $\mu$ 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 $\mu$ g 左右 总 RNA 或者 25-50ng 左右的 mRNA。RNA 溶于 DEPC-H<sub>2</sub>O，体积不大于 8 $\mu$ 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 $\mu$ g 总 RNA，或 25-50ng poly(A)+ mRNA。加入 DEPC-H<sub>2</sub>O 使总体积为 8 $\mu$ l。
2. 加入 1 $\mu$ l Random primers，或 1 $\mu$ l Oligo(dT)<sub>18</sub> primer，或者 1ul 的特异性下游引物 (25pmol/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

6. 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)<sub>18</sub> 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。
7. 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。
8. 反转录好的cDNA可以用于PCR扩增、荧光定量PCR检测或cDNA的 2<sup>nd</sup>链的合成。

## 五、PCR 反应

### 反应液配制

反应液组份	加量 (μl)	终浓度	备注
Hotstart E-PCR mix	25	1×	
上游引物(25pmol/ul)	0.8	30~900nM	用户提供
下游引物(25pmol/ul)	0.8	30~900nM	用户提供
cDNA(ul)	4	10~100ng	用户提供
无菌去离子水(ul)	19.4	-	用户提供
总体积(ul)	50	-	

## 六、扩增条件

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 → 55℃ 30 秒 → 72℃ 1 分钟  
└──────────────────┘  
35 个循环

注：

- 1、用户可根据引物设计的具体情况确定适合的退火温度、退火时间和循环数或者适当降低引物浓度。
- 2、客户可按比例缩小成 25ul 或者 20ul 体系。
- 3、如果客户需要调整 $Mg^{2+}$ 浓度，可自己适当加入，本试剂盒提供的 $Mg^{2+}$ 终浓度为 2.0mM。
- 4、通常 1OD，20 个碱基的引物加入 200ul 的双蒸水溶解后，引物浓度是 25pmol/ul。



## 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：5446 0832 800-988-1995

E-mail:master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

