

版本号: KR121221

Quant One Step RT-PCR Kit

Quant一步法RT-PCR试剂盒

目录号: KR113

产品内容

产品组成	KR113 50 μ l \times 50 rxn
Hotmaster Taq Polymerase(2.5 U/ μ l)	130 μ l
Quant RTase(for one step)	30 μ l
RNasin (40 U/ μ l)	30 μ l
10xRT-PCR Buffer	300 μ l
Super Pure dNTPs (10 mM each)	120 μ l
RNase -Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml
5xRT-PCR Enhancer	600 μ l

储存条件

试剂盒请置于-20 $^{\circ}$ C 保存。

产品简介

RT-PCR是指利用逆转录酶将RNA逆转录（RT）成cDNA，然后以cDNA为模板，通过聚合酶链式反应(PCR)扩增目的片段的技术。RT-PCR技术可用于检测细胞和组织中基因表达水平，克隆特定基因的cDNA序列和检测RNA病毒。

本试剂盒采用一步法使RT和PCR在同一反应体系中进行,反应过程中不需要添加试剂，无需打开管盖，避免了污染，同时提高了检测的灵敏度。Quant One Step RT-PCR Kit(一步法试剂盒)采用高质量逆转录酶(Quant RTase)和热启动HotMaster Taq DNA聚合酶，并采用我公司研发的反应体系保证Quant RTase和Hotmaster Taq发挥最大功效。

需自备的试剂

- 1 分子生物学实验级别的水（无核酸酶）
- 2 RNA模板
- 3 特异性PCR引物

使用注意事项

1. RNA 模板可以采用总RNA 或mRNA，建议使用TIANGEN公司生产的TRNzol或RNAprep Pure系列制备高质量的总RNA。
 2. 经实验证明：针对复杂模板低丰度的基因，50 μ l体系加入终浓度为0.5 μ M Oligo dT能够适当提高扩增效率。
 3. 经试验证明：针对某些复杂模板或高GC含量低丰度的基因片段的扩增可以通过调整反转录温度来达到很好的扩增效果。
 4. 一步法RT-PCR 实验应避免RNase污染，可采用以下措施：
 - 1) 因人的皮肤表面和唾液都有RNase，因此实验中应戴一次性手套和口罩；
 - 2) 一步法RT-PCR 实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作RNA；
 - 3) 一步法RT-PCR 实验相关耗材应用0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在37 $^{\circ}$ C处理12 h,并高压灭菌30 min后使用。
 5. Quant RTase、RNasin 和 Hotmaster Taq聚合酶在取用之前应短暂离心收集溶液后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回-20 $^{\circ}$ C。
 6. dNTPs 应避免反复冻融以免失效。
 7. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择。
 8. 为避免非特异扩增，一步法反应液的配制应始终在冰浴中进行，待PCR仪器温度达50 $^{\circ}$ C时再将反应管放到仪器中。
 9. 引物设计的好坏直接影响到RT-PCR 反应的结果，设计引物时需考虑GC含量，引物长度，引物位置等因素，建议采用专业的引物设计软件来设计。
-

实验操作步骤

1. 完全融化模板RNA，特异性引物，Super Pure dNTPs, 10×RT-PCR Buffer, RNase-Free ddH₂O和5×RT-PCR Enhancer，短暂离心后置于冰浴上。
2. 按下表在冰浴条件下配制反应液：

组成成分	体积 / 反应
10×RT-PCR Buffer	5 μl
Super Pure dNTPs (10 mM each)	2 μl
5×RT-PCR Enhancer	10 μl
RNasin (40 U/μl)	0.5 μl
Hotmaster Taq Polymerase (2.5 U/μl)	2.5 μl
Quant RTase (for one step)	0.5 μl
上游特异性引物(10 μM)	3 μl
下游特异性引物(10 μM)	3 μl
RNA模板	10 ng-1 μg total RNA
RNase-Free ddH ₂ O	补水至50 μl
总体系	50 μl

注意：当同时需要进行多次RT-PCR反应时，将各组分加倍混合后再分装到每个反应管中，可以减少实验操作产生的误差，使所取的试剂体积更准确，减少试剂损失。

3. 启动PCR仪器直到温度上升至50℃时，将反应管放入PCR仪器中。
4. 按下表设置PCR反应条件：

步骤	反应	时间	温度
1	反转录反应	30 min	50℃
2	PCR初始变性	2 min	94℃
3	变性	0.5-1 min	94℃
4	退火	0.5-1 min	50-60℃
5	延伸	0.5-2 min	65℃
6	从3-5步进行30-40个循环		
7	最终延伸	10 min	65℃

5. 将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测分析。
-