

BioRT Two Step RT-PCR Kit

BioRT 逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒 说明书(两步法)

TECHNICAL SUPPORT:

For technical support, please dial phone number : 0086-571-87774567-5215 or 5211, or fax to
0086-571-87774553

Email to reagent@bioer.com.cn.

Website: www.bioer.com.cn

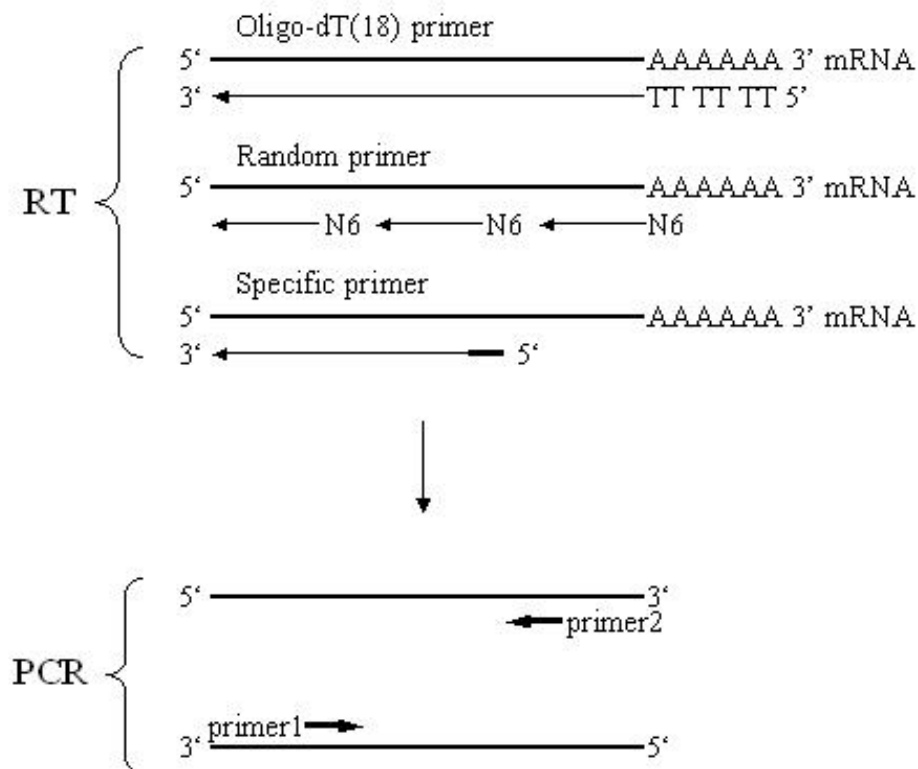
产品说明

RT-PCR 是指利用逆转录酶将 RNA 逆转录 (RT) 成 cDNA (Complementary DNA), 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。

BioRT 逆转录扩增 (RT-PCR) 试剂盒采用美国先进技术生产的高质量逆转录酶 (AMV 酶) 和高保真的 Taq mix DNA 聚合酶, AMV 逆转录酶可逆转录得到高产量的 cDNA, 并可逆转录长达 12kb 的 cDNA, 同时 AMV 逆转录酶有较高的热稳定性, 其反应温度可高达 60°C, 可以逆转录具有复杂二级结构的 RNA 模板, Taq mix DNA 聚合酶同时具有高保真, 高灵敏, 高延伸速度等特点, 可合成长达 6Kb 的 PCR 产物, 两种酶的配合使用保证了 RT-PCR 反应的顺利完成。

本试剂盒采用两步法进行 RT-PCR, 即 RT 和 PCR 分别在两管中进行, 同一次逆转录的 cDNA 能同时检测多个基因, 使得您有限的 RNA 能发挥最大的作用。

RT-PCR 原理



试剂盒组成

货号	BSB05M1
试剂盒组成	100 人份
AMV Reverse Transcriptase(5U/μl)	52 μl
5 x RT Buffer	500 μl
dNTP Mixture(10mM)	52 μl
RNase inhibitor(40U/μl)	52 μl
Oligo-dT(18)	52 μl
Random Primer	52 μl
RNA control (冷冻干燥)	加 20 μl *
RNase free H ₂ O	1 ml×2
Taq mix DNA polymerase(5U/μl)	52 μl
10 x PCR Buffer (include 15mM Mg ²⁺)	500 μl
MgCl ₂ (25mM)	200 μl
RNA control S primer (5μM)	20 μl
RNA control A primer (5μM)	20 μl

保存 -20℃

实验操作 Protocol

1. RT 反应

a、按以下条件配制 RT 反应液

5 x RT Buffer	2 μl
dNTP Mixture(10mM)	1 μl
Oligo-dT 或 Random Hexamer Primer ** 或特异性下游引物	0.5 μl
RNase inhibitor (40U/ul)	0.5 μl
AMV Reverse Transcriptase	0.5 μl
RNA Control 或实验样品 RNA *	x μl
RNase free H ₂ O	5.5-x μl

总体积 10 μl

注：* RNA Control 使用前加 20ul RNase free H₂O 水充分溶解，每次反应加 2ul；实验样品 RNA 体积根据浓度确定，总量小于等于 1ug 总 RNA；当实验样品 RNA 的表达数量较少时，可加至 5.5ul，同时在反应体系中相应地减少 RNase free H₂O 的量。

b、按以下条件进行逆转录反应

(室温	10min)**
42-60°C ***	45min
95°C ****	5min
冰浴	5min

注：** 对于随机六聚体引物，在室温温育 10 分钟后，再进行逆转录反应。

*** 对于有复杂二级结构的 RNA 模板，逆转录温度可适当提高，不可高于 60°C；也可以加模板和引物后 70°C 10min，再冰浴 5min 后继续后续实验；逆转录长链 RNA (> 2kb) 时，建议在 42°C 左右进行。

**** 95°C 加热使 AMV Reverse Transcriptase 失活并阻止其与 DNA 结合。

2. PCR 反应

a、按以下条件配制 PCR 反应液

10 x PCR Buffer (含 Mg ²⁺)	2.5 μl
dNTP Mixture (10mM)	0.5 μl
上游特异性引物 (5 μM)	0.5 μl
下游特异性引物 (5 μM)	0.5 μl
Taq mix DNA polymerase	0.5 μl
RT 产物 *	2.5 μl
ddH ₂ O	18 μl

总体积	25 μl
-----	-------

b、按以下条件进行 PCR 反应

94°C	3min	} 25-35 循环 ***
94°C	30s	
37°C-65°C **	30s	
72°C ****	45s-7min	
72°C	5min	

注：* RT 产物可增加至 5 μl 。

** 退火温度根据引物 T_m 值调整，一般为 $T_m-5^{\circ}\text{C}$ 。Control 引物退火温度为 55°C 。

*** 当实验样品 RNA 特别稀少时，可将循环数增加至 40-45 循环。

**** 延伸时间根据 PCR 产物大小确定，一般 $1\text{kb}/\text{min}$ 。Control 引物延伸时间 45s。

c、反应结束后，取 3-5 μl PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，确认 PCR 反应产物。如果此 PCR 产物需用于以后实验，应将 PCR 产物冷冻保存。

RNA control 反应时，退火温度 55°C ，30 个循环，扩增片段大小为 500bp。

使用提示

1. RNA 模板可以采用总 RNA 或 mRNA，建议使用 Biozol(BSC51M1)制备高质量 RNA；

a) RT 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) RT 实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作 RNA；

3) RT 实验相关耗材应使用干热灭菌 (180°C ，60 分钟) 或用 0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)

水溶液在 37°C 处理 12 小时后在 121°C 高压灭菌 30 分钟；

b) AMV 逆转录酶，DNA 聚合酶和 RNase 抑制剂在取用之前应离心后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回 -20°C ；

c) dNTP 应避免反复冻融以免失效；

d) 引物的选择可根据具体情况，Oligo-dT 适用于具有 PolyA 尾的 RNA(一般是真核生物的 mRNA)，Random Hexamer Primer 适用于所有 RNA(包括 mRNA, rRNA, tRNA 等)，尤其适用于有复杂二级结构的 RNA，特异性引物适用于已知模板序列的 RNA；

e) PCR 反应中 MgCl_2 浓度可依据不同条件进行调整，当目的片段长度大于 2kb 时，我们建议增加 MgCl_2 浓度，以 0.5mM 间隔梯度增加。

f) PCR 引物的设计的好坏直接影响到 PC 反应的结果, 设计 PCR 引物考虑多种因素, 如 GC 含量, 引物长度, 引物位置等因素, 因此我们建议采用优秀的引物设计软件来设计, 如 Primer Premier 5.0 等。

RT-PCR 实验必需用品

仪器和耗材	试剂
离心机	DEPC(焦碳酸二乙酯)
微量移液器	ddH ₂ O
RNase free 1.5ml 离心管	电泳缓冲液
水浴装置或金属浴装置	上样缓冲液
电泳及 UV 装置	DNA Marker
PCR 管	
移液器吸头	

参考文献

1. Houts, G.E., Miyagi, M., Ellis, C., Beard, D., and Beard, J.W. (1979) *J. Virol.* 29(2):517-522.
2. Guide to Molecular Cloning Techniques. *Methods in Enzymology*, Volume 152. pp 316-325. Edited by Shelby Berger and Alan R. Kimmel. Academic Press, Inc.