

# BioRT One Step RT-PCR Kit

## BioRT 逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒说明书 (一步法)

**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](mailto:reagent@bioer.com.cn).

**Website: [www.bioer.com.cn](http://www.bioer.com.cn)**

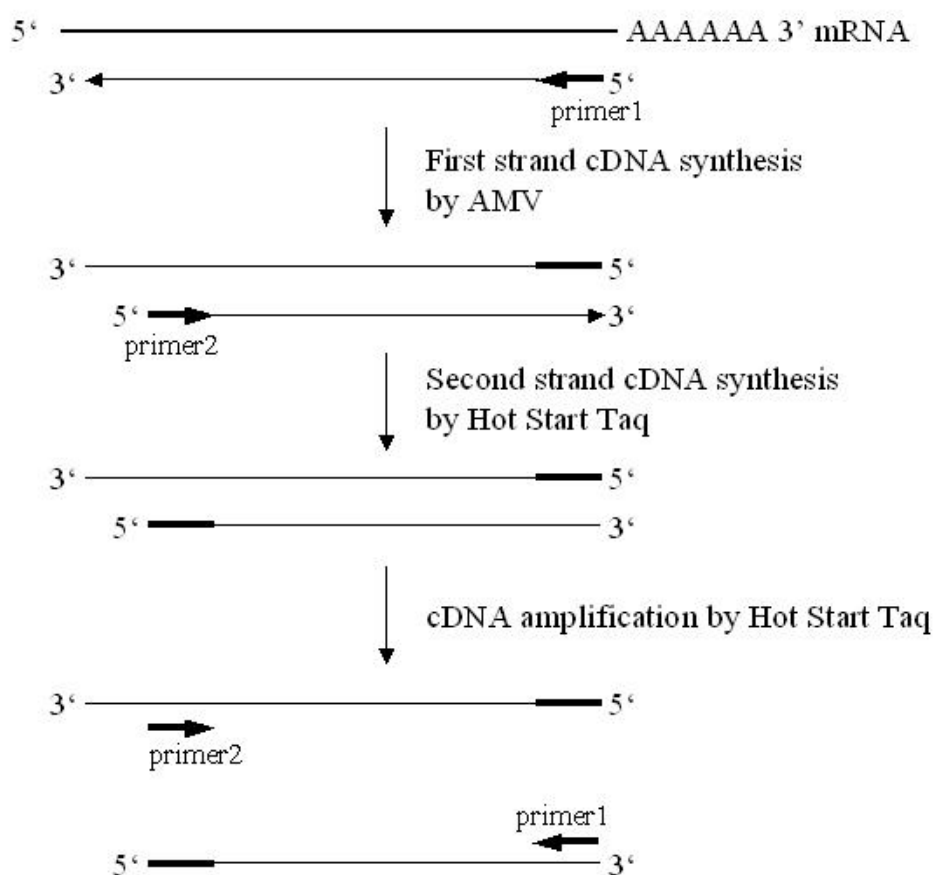
## 产品说明

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。

不同于两步法 RT-PCR 中 RT 和 PCR 分别在两个反应体系中进行的方法, BioRT 逆转录扩增(RT-PCR)试剂盒(一步法)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。本试剂盒采用美国先进技术生产的高质量逆转录酶(AMV 酶)和热启动 Taq 聚合酶, 并采用特殊的反应体系保证 AMV 逆转录酶和热启动 Taq 酶发挥最大功效。AMV 逆转录酶可逆转录得到高产量的 cDNA, 热启动 Taq 聚合酶采用高度纯化的重组 Taq 聚合酶和单克隆抗体相结合, 两者配合使用可得到长达 4kb 的产物。

本试剂盒采用一步法进行, 即 RT 和 PCR 分别在同一管中进行, 反应过程中无需打开管盖, 避免了交叉污染, 同时具有高特异性, 高灵敏, 使用方便等特点。

## 一步法 RT-PCR 原理



## 试剂盒组成

货号	BSB07M1
试剂盒组成	100 人份
AMV Reverse Transcriptase(5U/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
Taq polymerase(5U/ $\mu$ l)	50 $\mu$ l
10X RT-PCR Buffer (30mM Mg <sup>2+</sup> plus)	500 $\mu$ l
dNTP Mixture(2.5mM)	500 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	500 $\mu$ l
RNase inhibitor(40U/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> O	100 $\mu$ l $\times$ 2
RNA control( 冷冻干燥 )	加 20 $\mu$ l *
RNA control S primer(5 $\mu$ M)	20 $\mu$ l
RNA control A primer(5 $\mu$ M)	20 $\mu$ l

保存 -20 $^{\circ}$ C

## 实验操作 Protocol

### 1、按以下条件配制反应液

10 x RT-PCR Buffer (含 30mM 的 Mg <sup>2+</sup> )	2.5 $\mu$ l
dNTP Mixture (2.5mM)	4 $\mu$ l
RNase inhibitor (40U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
上游特异性引物 (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
下游特异性引物 (5 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
AMV reverse transcriptase	0.5 $\mu$ l
Taq DNA polymerase	0.5 $\mu$ l
RNA control 或实验样品 RNA **	X $\mu$ l
RNase free H <sub>2</sub> O	14.5-X $\mu$ l
总体积	25 $\mu$ l

注: \* RNA Control 使用前加 20ul RNase free H<sub>2</sub>O 水充分溶解, 每次反应加 1ul;

\*\* 总 RNA 最佳使用量 10ng-1 $\mu$ g, mRNA 最佳使用量 100pg-10ng; 实验样品 RNA 体积根据浓度确定, 总

量小于等于 1 $\mu$ g 总 RNA；当实验样品 RNA 的表达数量较少时，可加至 14.5 $\mu$ l，同时在反应体系中相应地减少 RNase free H<sub>2</sub>O 的量。

## 2、实验样品标准反应条件：

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

注

\*\*\* 对于有复杂二级结构的 RNA 模板，反应温度可适当提高，不可高于 60°C ；

\*\*\*\* 当实验样品 RNA 特别稀少时，可将循环数增加至 45-50 循环 ；

\*\*\*\*\* 退火温度根据引物 T<sub>m</sub> 值调整，一般为 T<sub>m</sub>-5°C ；

\*\*\*\*\* 延伸时间根据 PCR 产物大小确定，一般 1kb/min 。

## 3、RNA control 反应条件：

45°C	30min	
94°C	3min	
94°C	30s	} 35cycles
55°C	30s	
72°C	45s	
72°C	5min	

4、反应结束后，取 5  $\mu$ l RT-PCR 反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，确认 RT-PCR 反应产物。如果此 PCR 产物需用于以后实验，应将 PCR 产物-20°C 保存。

RNA control 反应时扩增片段大小为 500bp。

## 使用提示

- 1 适用于所有 RNA 模板，建议使用 Biozol (BSC51M1) 制备高质量 RNA；
- 2 引物设计的好坏直接影响到 RT-PCR 反应的结果，设计引物考虑多种因素，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；

- 3 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 实验相关耗材应使用干热灭菌（180℃，2 小时）或用 0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在 37℃处理 12 小时后在 121℃高压灭菌 30 分钟；
- 4 AMV 逆转录酶，Taq 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℃；
- 5 dNTP 应避免反复冻融以免失效；
- 6 本试剂盒必须使用特异性引物，引物浓度的调整可根据具体情况，我们建议 0.4 μM 作为优化的起始浓度，Oligo-dT 引物和随机引物不适用于本试剂盒；
- 7 反应中 MgCl<sub>2</sub>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<sub>2</sub>浓度，按 0.5mM 一个梯度增加。

## 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 <sub>2</sub> 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.
3. Aatsinki JT, Lakkakorpi JT, Pietila EM, Rajaniemi HJ. *Biotechniques.* 1994; 16(2):282-4, 286-8.
4. F. X. LIMBACH, B. JAULHAC, Y. PIE´ MONT, J. L. KUNTZ, H. MONTEIL, AND J. SIBILIA. *J Clin Microbiol.* 1999. 2037-2039.