

天
净
沙
系
列

CAT#:130957-50
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

兔 RNA 提取 RT-PCR 试剂盒

Cell Lysate RT-PCR Kit

使用手册 V1.1

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506

网址: www.tiandz.com; 电话: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>本产品是一种免 RNA 提取的 RT-PCR 试剂盒,它使用精心优化的细胞裂解液直接裂解培养细胞,然后直接在细胞裂解液中进行 RT,再用 cDNA 进行 PCR 或荧光定量 PCR。本产品特点如下:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 免 RNA 提取,从细胞裂解到 RT-PCR 或实时定量 RT-PCR 结果只需三个步骤,省略了整个 RNA 提取过程。 2. 灵敏度不低于常规方法(先提总 RNA 再进行 RT-PCR),不但可以检测到低拷贝的 RNA,还可用于检测 miRNA。 3. 整合了去除基因组 DNA 的步骤,只检测 RNA,无需担心基因组 DNA 的污染。 4. 每次只需要 10-100000 个培养细胞或含相应细胞数的痕量组织(如 LCM 样品),验证过的细胞包括 HeLa、CHO、293、COS-7 等,但不能用于 U937 细胞系。 5. 两步法 RT-PCR,后续使用灵活。得到的 cDNA 既可用于普通 PCR,也可用于基于 SYBR 的荧光定量 PCR,也可用于其他定量 PCR(如 TaqMan),非常灵活。 6. 即适用于少量样品,也适用于平行处理大量样品及高通量筛查。 7. 本产品足够用于 50 次 20μL 体系的 RT 和 600 次 30μL 体系(或约 200 次 100μL 体系)的 PCR。 																											
<p>规格及成分</p>		<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>溶液 A</td> <td>130957a</td> <td>25 mL</td> </tr> <tr> <td>溶液 B</td> <td>130957b</td> <td>0.5 mL</td> </tr> <tr> <td>MMLV 逆转录酶 (含 RI)</td> <td>60906a</td> <td>100 μL</td> </tr> <tr> <td>RT Buffer (含 dNTP)</td> <td>60906b</td> <td>300 μL</td> </tr> <tr> <td>PCR MagicMix 3.0(含染料)</td> <td>90805</td> <td>9 mL</td> </tr> <tr> <td>RNase-free 水</td> <td>80403</td> <td>10 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>130957sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>	成分	编号	十孔盒包装	溶液 A	130957a	25 mL	溶液 B	130957b	0.5 mL	MMLV 逆转录酶 (含 RI)	60906a	100 μ L	RT Buffer (含 dNTP)	60906b	300 μ L	PCR MagicMix 3.0(含染料)	90805	9 mL	RNase-free 水	80403	10 mL	使用手册	130957sc	1 份		
成分	编号	十孔盒包装																										
溶液 A	130957a	25 mL																										
溶液 B	130957b	0.5 mL																										
MMLV 逆转录酶 (含 RI)	60906a	100 μ L																										
RT Buffer (含 dNTP)	60906b	300 μ L																										
PCR MagicMix 3.0(含染料)	90805	9 mL																										
RNase-free 水	80403	10 mL																										
使用手册	130957sc	1 份																										
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输, -20$^{\circ}$C 保存, 有效期两年。</p>																											
<p>自备试剂</p>	<p>RT 引物、PCR 引物对</p>																											
<p>使用方法</p>	<p>注意: 无 RNase 的环境和使用无 RNase 污染的试剂是本实验成功的关键。强烈建议使用天恩泽的固相 RNase 清除剂去除工作台面的 RNase, 用气相</p>																											

RNase 去除空气中的 RNase。实验前需要将 95%乙醇放-70℃预冷，最好用空枪头盒盛乙醇。

一、细胞培养、裂解

1. 按常规方法培养细胞、胰酶消化并计数。
2. 转移 1×10^5 个细胞到离心管中， $400 \times g$ 离心 4 分钟。
3. 吸弃上清（即培养基），保留细胞沉淀。
4. 用 0.5 mL 溶液 A 重悬细胞，并将细胞浓度调整到 2×10^5 细胞/mL。
5. 转移 10 μ L 的悬浮细胞到 0.2 mL PCR 管中，并加入 10 μ L 的溶液 B，此时细胞终浓度为 10^5 细胞/mL。
6. 迅速将离心管插入浮子中，放入-70℃预冷的、95%乙醇中 1-3 分钟。10 μ L 枪头盒一般能让 0.2 mL 的 PCR 管一半没入到乙醇中。
7. 在室温的水浴锅中快速解冻细胞，涡旋 10 秒后短暂离心数秒，将管中液体（细胞裂解液）转移到新的离心管中，放冰上待用。

二、RT（逆转录）反应合成 cDNA

8. 按下表设置 RT 反应体系（以 20 μ L 体系为例）：

成分	样品管	阴性对照管
细胞裂解液（含 RNA）	2.5 μ L	2.5 μ L
RT Buffer（含 dNTP）	6 μ L	6 μ L
MMLV 逆转录酶（含 RI）	2 μ L	无
RT 引物(100ng/ μ L)	1 μ L	1 μ L
RNase-free 水	补水到 20 μ L	补水到 20 μ L

9. 42℃保温 60 分钟。此步为 RT 反应。
10. 70℃保温 10 分钟以终止反应，然后放冰上待用。合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用，不需要纯化。也可以放置在-20℃长期保存。

三、PCR 方案一（RT 产物全部用于 PCR）

11. 在上步的 RT 反应管中直接按下表加入各成分（以 100 μ L 体系为例）：

成分	每管加入量
PCR MagicMix 3.0（已加染料）	50 μ L
自备正向 PCR 引物 (100 ng/ μ L)	2 μ L
RNase-free 水	补水到 100 μ L

12. 直接进入第 14 步。

四、PCR 方案二（部分 RT 产物用于 PCR）

13. 按下表设置 PCR 反应体系（以 30 μL 体系为例）：

成分	每管加入量
PCR MagicMix 3.0（已加染料）	15 μL
cDNA 样品（RT 反应产物）	1-5 μL
自备正向 PCR 引物 (100 ng/ μL)	1 μL
自备反向 PCR 引物 (100 ng/ μL)	1 μL
RNase-free 水	补水到 30 μL

注意：RT 引物可以用做反向 PCR 引物。

14. PCR 反应参数(需要根据模板和引物 T_m 值决定，下面的参数只做参考)：

过程	温度	时间
预变性	94 $^{\circ}\text{C}$	5 min
PCR 反应 (35 个循环)	94 $^{\circ}\text{C}$	1 min
	55 $^{\circ}\text{C}$	1 min
	72 $^{\circ}\text{C}$	2 min
最后延伸	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min

四、电泳检测

15. 取 5-10 μL PCR 产物直接在琼脂糖凝胶上电泳，跟分子量标准比较估计出扩增产物的大小。注：本试剂盒中的 PCR mix 含有甘油和染料，可以直接上样，不需要额外再加电泳上样液。

关联产品

石蜡包埋组织 RNA_{OUT} (CAT#:81102)