

克  
必  
隆  
系  
列

CAT#:80206-50  
低温运输, -20℃保存

**TIANDZ**

# 两管式 RT-PCR 试剂盒

## Two-Tube 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](http://www.tiandz.com); 电话: 400-6765278; 电邮: [order@tiandz.com](mailto:order@tiandz.com)

| 产品及特点                     | <p>本试剂盒是整合 cDNA 第一链合成试剂和即用型 PCR 试剂而得的 RT-PCR 试剂盒。cDNA 第一链合成反应和 PCR 反应分别在两个离心管中进行。本试剂盒具有下列特点：</p> <p>1. 即开即用，足够 50 次 RT 反应（20 uL 体系）和 600 次 PCR 反应（30 uL 体系）。</p> <p>2. cDNA 第一链合成试剂盒可灵活选用随机引物、Oligo dT 引物或基因专一引物，适合各种情况。</p> <p>3. PCR 试剂盒具有即用、简单等优点，PCR mix 中含上样染料，所以 PCR 产物可以直接上样电泳。</p> <p>4. 两管式操作，RT 和 PCR 在不同试管中进行，便于单独优化 RT 反应或 PCR 反应条件。</p> <p>5. 扩增效率高，最长可扩增 5 Kbp 以上的 RNA。</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
|---------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-----|-----------|--------------------|-------|------|---------------------------|-------|------|------|---------|-----|----------|--------|------------------|--------|-------------------|--------|---------------------------|-------|-----------------|-------|--------------|-------|--------------------|---------|------------------|------|------|--------|
| 规格及成分                     | <table><tr><th>成 分</th><th>编 号</th><th>50 次塑料袋包装</th></tr><tr><td>RT 试剂盒（CAT#:60906）</td><td>60906</td><td>50 次</td></tr><tr><td>即用型PCR试剂盒 3.0(CAT#:90805)</td><td>90805</td><td>9 mL</td></tr><tr><td>使用手册</td><td>80206sc</td><td>1 份</td></tr></table> <p>RT 试剂盒（CAT#:60906）成分表：</p> <table><tr><th>RT 试剂盒成分</th><th>50 次包装</th></tr><tr><td>MMLV 逆转录酶 (含 RI)</td><td>100 uL</td></tr><tr><td>RT Buffer（含 dNTP）</td><td>300 uL</td></tr><tr><td>Oligo (dT)18 引物(0.5ug/uL)</td><td>50 uL</td></tr><tr><td>随机引物(0.2 ug/uL)</td><td>50 uL</td></tr><tr><td>RNase-free 水</td><td>10 mL</td></tr></table> <p>即用型 PCR 试剂盒 3.0（CAT#:90805）成分表：</p> <table><tr><th>即用型 PCR 试剂盒 3.0 成分</th><th>600 次包装</th></tr><tr><td>PCR MagicMix 3.0</td><td>9 mL</td></tr><tr><td>专用染料</td><td>360 uL</td></tr></table> | 成 分       | 编 号 | 50 次塑料袋包装 | RT 试剂盒（CAT#:60906） | 60906 | 50 次 | 即用型PCR试剂盒 3.0(CAT#:90805) | 90805 | 9 mL | 使用手册 | 80206sc | 1 份 | RT 试剂盒成分 | 50 次包装 | MMLV 逆转录酶 (含 RI) | 100 uL | RT Buffer（含 dNTP） | 300 uL | Oligo (dT)18 引物(0.5ug/uL) | 50 uL | 随机引物(0.2 ug/uL) | 50 uL | RNase-free 水 | 10 mL | 即用型 PCR 试剂盒 3.0 成分 | 600 次包装 | PCR MagicMix 3.0 | 9 mL | 专用染料 | 360 uL |
| 成 分                       | 编 号                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 50 次塑料袋包装 |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| RT 试剂盒（CAT#:60906）        | 60906                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 50 次      |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| 即用型PCR试剂盒 3.0(CAT#:90805) | 90805                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 9 mL      |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| 使用手册                      | 80206sc                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 1 份       |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| RT 试剂盒成分                  | 50 次包装                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| MMLV 逆转录酶 (含 RI)          | 100 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| RT Buffer（含 dNTP）         | 300 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| Oligo (dT)18 引物(0.5ug/uL) | 50 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| 随机引物(0.2 ug/uL)           | 50 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| RNase-free 水              | 10 mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| 即用型 PCR 试剂盒 3.0 成分        | 600 次包装                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| PCR MagicMix 3.0          | 9 mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| 专用染料                      | 360 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| 运输及保存                     | 低温运输,-20℃保存，有效期一年。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |
| 自备试剂                      | 样品 RNA、模板专一正向和反向引物。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |     |           |                    |       |      |                           |       |      |      |         |     |          |        |                  |        |                   |        |                           |       |                 |       |              |       |                    |         |                  |      |      |        |

使用方法

一、样品 RNA 的制备（本试剂盒不提供相关试剂）

1、可用自本公司各种 RNA 提取方法提取样品的 RNA，也可以选用其他供应商的产品，但得到的 RNA 一定要溶解在 RNase-free 的超纯水中。

二：RT（逆转录）反应合成 cDNA

1. 按下表配制 RT 反应体系（20 uL 体系）：

RNA 模板

|                    |                |
|--------------------|----------------|
| 总 RNA              | 100-500 ng     |
| 或 poly(A) mRNA     | 10-500 ng      |
| 或专一的 RNA（如体外转录制备的） | 0.01 pg-500 ng |

引物

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| Oligo (dT) <sub>18</sub> (0.5 ug/uL) | 1 uL   |
| 或随机引物(0.2 ug/uL)                     | 1 uL   |
| 或自备模板专一反向引物(10 pmol/uL)              | 1-2 uL |

|              |           |
|--------------|-----------|
| RNase-free 水 | 补水到 12 uL |
|--------------|-----------|

注意：RNA 样品不能含有基因组 DNA 污染。随机引物与 RNA 模板的比例将决定 cDNA 合成的平均长度（成反比）。一般情况下随机引物效率好于 OligodT 引物，但如果只想转录总 RNA 中的 mRNA（只占 5%左右），则可优先选用 OligodT 引物，这样就可以排除非 mRNA 的干扰。

- 2. 70℃保温 5 分钟变性模板后立即冰浴。
- 3. 按顺序加入 6 uL RT Buffer（含 dNTP）和 2 uLMMLV 逆转录酶（含 RI），反应终体积为 20 uL。
- 4. 42℃保温 60 分钟。此步为 RT 反应。
- 5. 70℃保温 10 分钟以终止反应，然后放置在冰上待用。
- 6. 合成的 cDNA 可以直接作为 PCR 模板使用，不需要纯化。剩余样品可以放置在 -20℃长期保存。

三、PCR（30 uL 体系）

- 1、将全部专用染料加入到 PCR MagicMix 3.0 中，轻柔颠倒混匀即可使用。未用完的部分需要在-20℃。也可以不加专用染料，但在 PCR 结束后，电泳上样前，则需要加入电泳上样液，否则电泳时没法判断电泳速度。
- 2、在 PCR 管中加入下列成分：

|                                                                                                      |                                                | <table><tr><th>成分</th><th>加入量</th></tr><tr><td>PCR MagicMix 3.0（已加染料）</td><td>15 uL</td></tr><tr><td>cDNA 样品（上步的 RT 反应液）</td><td>1-5 uL</td></tr><tr><td>模板专一性正向引物(10 pmol/uL)</td><td>1-2 uL</td></tr><tr><td>模板专一性反向引物(10 pmol/uL)</td><td>1-2 uL</td></tr><tr><td>补水到</td><td>30 uL</td></tr></table>   | 成分 | 加入量 | PCR MagicMix 3.0（已加染料） | 15 uL | cDNA 样品（上步的 RT 反应液） | 1-5 uL | 模板专一性正向引物(10 pmol/uL) | 1-2 uL | 模板专一性反向引物(10 pmol/uL) | 1-2 uL | 补水到   | 30 uL |       |      |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|-----|------------------------|-------|---------------------|--------|-----------------------|--------|-----------------------|--------|-------|-------|-------|------|-----|
|                                                                                                      | 成分                                             | 加入量                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | PCR MagicMix 3.0（已加染料）                         | 15 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | cDNA 样品（上步的 RT 反应液）                            | 1-5 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | 模板专一性正向引物(10 pmol/uL)                          | 1-2 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | 模板专一性反向引物(10 pmol/uL)                          | 1-2 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | 补水到                                            | 30 uL                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | 注意：cDNA 也可以稀释后用作 PCR 模板。是否稀释或稀释多少倍完全取决于靶基因的丰度。 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | 2、PCR 反应参数(需要根据模板和引物决定，下面的只做参考):               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      |                                                | <table><tr><th>过程</th><th>温度</th><th>时间</th></tr><tr><td>预变性</td><td>94℃</td><td>5 min</td></tr><tr><td rowspan="3">PCR 反应<br/>(35 个循环)</td><td>94℃</td><td>1 min</td></tr><tr><td>55℃</td><td>1 min</td></tr><tr><td>72℃</td><td>2 min</td></tr><tr><td>最后延伸</td><td>72℃</td><td>10 min</td></tr></table> | 过程 | 温度  | 时间                     | 预变性   | 94℃                 | 5 min  | PCR 反应<br>(35 个循环)    | 94℃    | 1 min                 | 55℃    | 1 min | 72℃   | 2 min | 最后延伸 | 72℃ |
| 过程                                                                                                   | 温度                                             | 时间                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
| 预变性                                                                                                  | 94℃                                            | 5 min                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
| PCR 反应<br>(35 个循环)                                                                                   | 94℃                                            | 1 min                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | 55℃                                            | 1 min                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
|                                                                                                      | 72℃                                            | 2 min                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
| 最后延伸                                                                                                 | 72℃                                            | 10 min                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
| 四、电泳检测                                                                                               |                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |
| 1、取 5-0 uL PCR 产物直接在 PAGE 或琼脂糖凝胶上电泳，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                                                                                                 | 双酶一管式 RT-PCR 试剂盒（CAT#:91202-50）                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |     |                        |       |                     |        |                       |        |                       |        |       |       |       |      |     |