

天
净
沙
系
列

CAT#:101219-50
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

荧光定量 RT-PCR 试剂盒 (两步法) Two-Step qRT-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

产品及特点	本试剂盒是整合 cDNA 第一链合成试剂（RT 试剂盒）和即用型 qPCR 试剂而得的 qRT-PCR 试剂盒。cDNA 第一链合成反应和 qPCR 反应分别在两个离心管中进行。本试剂盒具有下列特点： 1. 即开即用，足够 50 次 RT 反应（10uL 体系）和 50 次 qPCR 反应（20 uL 体系）。 2. RT 和 PCR 分开进行，方便优化 RT 和 qPCR 条件，也方便一个 RT 反应用于多个不同引物的 qPCR 扩增。 3. RT mix 中含除酶、模板和引物以外的 RT 成分，简化了反应设置步骤。 4. qPCR mix 是 2×预配液，也简化了反应设置步骤。 5. qPCR mix 含 qPCR 染料，无需另外加入相关荧光 PCR 染料。 6. 扩增效率高，最长可扩增 5 Kbp 以上的 RNA。 7. 提供定量 PCR 专用模板稀释液，保证在制作标准曲线时低浓度样品的准确性。					
规格及成分		成 分	编 号	十孔盒包装		
		2×RT Mix	60906a	40 uL（黄盖）		
		MMLV 逆转录酶（含 RI）	60906b	10 uL（红盖）		
		2×qPCR MagicMix	90805	1 mL（棕色管）		
		定量 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL（绿盖）		
		RNase-free 水	80403	1 mL（蓝盖）		
		使用手册	101219sc	1 份		
运输及保存	低温运输,-20℃保存，有效期一年。					
自备试剂	样品 RNA、PCR 引物、ROX 染料					
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。 2、如果需要用 RNA 制备标准曲线，则需在此步用定量 PCR 专用模板稀释液将 RNA 样品稀释不同梯度，并分别作为下步 RT 反应的模板。 3、由于污染的 gDNA 会严重影响 RNA 的定量，因必须彻底去除 RNA 样品中的 gDNA 污染。用户可以另购 RNase-free DNase 来消化 RNA 样品，也可以合成只识别外显子的引物。 二：RT（逆转录）反应合成 cDNA 4、按下表配制 RT 反应体系（10 uL 体系），在每个管中加入下列成分： <table><tr><td>成分</td><td>加入量</td></tr></table>				成分	加入量
成分	加入量					

	总 RNA	100-500 ng
	2×RT mix	4 uL
	MMLV 逆转录酶	1 uL
	RNase-free 水	补到 10 uL

5、42℃保温 60 分钟。此步为 RT 反应。

6、85℃保温 5 秒以终止反应，然后放置在冰上待用。

7、合成的 cDNA 可以直接作为下步 qPCR 模板使用，不需要纯化。剩余样品可以放置在 -20℃长期保存。如果需要用 cDNA 制备标准曲线，则需在此步用定量 PCR 专用模板稀释液将 cDNA 样品稀释不同梯度，并分别作为下步 qPCR 反应的模板。

三、qPCR (20 uL 体系)

8、在每个 PCR 管中加入下列成分：

成分	加入量
qPCR MagicMix	10 uL
cDNA 样品（来于上步的 RT 反应）	2 uL
PCR 正向引物(10 pmol/uL)	1 uL
PCR 反向引物(10 pmol/uL)	1 uL
自备 ROX 染料 I 或 II（见注）	2 uL
RNase-free 水	4 uL

注意：如果使用 ABI 公司的 7500，7700 和 7900 三种型号的荧光 PCR 仪器，则需用自备的 ROX 进行 Ct 值校正。对 ABI 7700 和 7900，ROX 的最佳浓度为 1×（即在每 20 uL 反应体系中加 2 uL 10×ROX）。对 ABI 7500，ROX 的最佳浓度为 0.05-0.1×（每 20 uL 反应体系加 0.1-0.2 uL 10×ROX；也可将 10×ROX 稀释到 1×，然后每个反应体系加入 1-2 uL 1×ROX）。ROX 会在溶解曲线中产生噪音，因此，如果出现了杂峰，将软件中“Passive Reference Dye”中的“ROX”选项取消打勾，然后重新分析数据。

对于 iCycler IQ, MJ Opticon, MJ Chromo4, MX3000, MX4000, RotorGene3000, RotorGene 6000 和 LightCycler 480 等型号的荧光 PCR 仪器，ROX 不是必须的，但加入的话也不会影响整个 PCR 分析。

9、PCR 反应参数(需要用户根据模板和引物决定，下面参数的只做参考)：

过程	温度	时间
预变性	94℃	5 min

	PCR 反应 (40 个循环)	94℃	1 min
		55℃	1 min
		72℃	2 min
		最后延伸	72℃
	10、实验结果分析：反应结束后确认扩增曲线和溶解曲线，制作标准曲线。具体方法随仪器不同而不同，请参考 qPCR 仪器手册。		
关联产品	双酶一管式 RT-PCR 试剂盒（CAT#:91202-50）		