

天
净
沙
系
列

CAT#:91202-50
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

双酶一管式 RT-PCR 试剂盒

Two-Enzyme One-Tube RT-PCR Kit

使用手册 V1.2

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>本产品是经过精心优化的、基于 MMLV 逆转录酶和 Taq DNA 聚合酶的双酶一管式 RT-PCR 试剂盒，它含有除模版 RNA 和其专一性引物以外的所有 RT-PCR 试剂，包括 MMLV 逆转录酶、Taq DNA 聚合酶、RT-PCR 缓冲液等，可以在同一反应管内完成 RNA →cDNA→PCR 反应 (RT-PCR 反应)，本产品特点如下：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 一管式完成 RT-PCR 反应，避免样品交叉污染。而常规的 RT-PCR 需要先进行 RT 再进行 PCR。 2. 主要成分只有两个 (RT-PCR buffer 和 MMLV-Taq Mix)，将加样步骤减少到最低，极大降低了加样误差，增加了可重复性。 3. 使用范围广，适用于从病毒 RNA、总 RNA 和 mRNA 样品。 4. 高灵敏度，每个 RT-PCR 体系最低可以检测 200 拷贝的 RNA 分子(靶分子在 200bp 以下时)。 5. 所得 RT-PCR 产物可以直接用于 AT 克隆、克隆等后续分析。 6. 本试剂盒足够 50 次 30uL 体系的 RT-PCR，只能用于科研目的。 																		
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="469 954 975 1021">成份</th> <th data-bbox="975 954 1142 1021">编号</th> <th data-bbox="1142 954 1390 1021">十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="469 1021 975 1081">双酶一管式 RT-PCR Buffer (2×)</td> <td data-bbox="975 1021 1142 1081">91202a</td> <td data-bbox="1142 1021 1390 1081">750 uL(黄色盖)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="469 1081 975 1149">MMLV-Taq Mix</td> <td data-bbox="975 1081 1142 1149">91202b</td> <td data-bbox="1142 1081 1390 1149">50 uL(本色盖)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="469 1149 975 1211">RNase-free 水</td> <td data-bbox="975 1149 1142 1211">80403</td> <td data-bbox="1142 1149 1390 1211">1 mL(蓝色盖)</td> </tr> <tr> <td data-bbox="469 1211 975 1274">使用手册</td> <td data-bbox="975 1211 1142 1274">91202sc</td> <td data-bbox="1142 1211 1390 1274">1 份</td> </tr> </tbody> </table>				成份	编号	十孔盒包装	双酶一管式 RT-PCR Buffer (2×)	91202a	750 uL(黄色盖)	MMLV-Taq Mix	91202b	50 uL(本色盖)	RNase-free 水	80403	1 mL(蓝色盖)	使用手册	91202sc	1 份
成份	编号	十孔盒包装																	
双酶一管式 RT-PCR Buffer (2×)	91202a	750 uL(黄色盖)																	
MMLV-Taq Mix	91202b	50 uL(本色盖)																	
RNase-free 水	80403	1 mL(蓝色盖)																	
使用手册	91202sc	1 份																	
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期一年。</p>																		
<p>自备试剂</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. RNA 模板：总 RNA，mRNA。 2. 专一性引物和探针（引物、探针应用 HPLC 或 PAGE 纯化）。 3. RNase-free & DNase-free 的 tip 头，离心管，薄壁 PCR 管等。 4. 各种规格的移液器。 5. 常规或 Real-time PCR 仪。本产品适用于下列 Realtime PCR 仪：ABI PRISM 7700、ABI PRISM 7500、ABI PRISM 7300、ABI PRISM 7000、MJ Opticon 、BIORAD iCycler 、Roch LightCycler 等，具体使用方法请参照相应仪器的说明书。 																		

使用方法

一、样品 RNA 的制备

1. 用自选方法纯化样品的 RNA，本试剂盒跟市场上大多数 RNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的 RNAout 相关产品。

二、引物的制备

2. 收到合成引物后，按引物标签提示在装引物干粉的管中直接加入适量的超纯水（加入量见引物试管上的标签），使得两条引物的浓度均为 10 μ M（10 pmol/ μ L），然后各取 110 μ L 混合在一起得 220 μ L，标注为引物混合物，放冰上待用。220 μ L 足够 100 次双酶一管式 RT-PCR 反应。

三、设置一管式 RT-PCR 反应（30 μ L 体系）

3. 在 N+1 个干净的无 RNase 的 PCR 管中（N=样品数，另外一个为阴性对照。用户可以设置其他对照，样品数需相应增加），按下表加入各成分：

成分	阴性对照管	样品管
RNA 模板（自备，分下面三种情况）	无	见下
总 RNA	无	100-500 ng
或 poly(A) mRNA	无	10-500 ng
或体外转录得到的专一 RNA	无	0.01 pg-500ng
引物混合物（第 2 步）	2 μ L	2 μ L
RNase-free 水	补到 14 μ L	补到 14 μ L
双酶一管式 RT-PCR Buffer（2 \times ）	15 μ L	15 μ L
MMLV-Taq Mix	1 μ L	1 μ L

4. 轻柔混合均匀后放入 PCR 仪中进行 RT-PCR。
5. 设定 RT-PCR 反应条件时，一般将 RT 的条件设定成 42 $^{\circ}$ C 30 分钟，后接 94 $^{\circ}$ C 变性 5 分钟，然后进入 PCR 循环。PCR 参数需要用户根据自备引物的 Tm 值和靶分子长度决定。PCR 产物的长度最好不要超过 200bp)、最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟。
6. RT-PCR 结束后取 5-10 μ L 电泳检查。

注意事项

1. 使用已校准的移液器，选用一次性 PCR 反应管、离心管、tip 头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
2. 引物应尽可能避免发夹结构、二聚体等现象的发生，PCR 目标片段最好小于 200bp，尽可能在 150bp 以内。
3. 实验样品尽可能新鲜，提取过程应严防 RNA 酶污染及操作不当导致的 RNA 降解。
4. 使用本产品时建议对 RT-PCR 扩增条件、引物浓度和样品用量进行调整，选择最适当的引物浓度、样品浓度和 PCR 扩增条件。

	<ol style="list-style-type: none">5. 本产品使用前应在室温充分融解，并用漩涡震荡器充分混匀。6. 统一配液后分装以减少加样误差，每次实验应设置阴性对照。7. PCR 反应管中不能有气泡。若有气泡，可先用手指将气泡弹破，然后再低速离心消除。8. 实验室应严格分区，避免 PCR 产物污染。
关联产品	两管式 RT-PCR 试剂盒(CAT#:80206)