

天
净
沙
系
列

CAT#:130921-50
低温运输, -20℃保存

TIANDZ

两管式 RT-PCR 试剂盒 (AMV-Taq)
Two-Tube RT-PCR Kit (AMV-Taq)

使用手册 V1.0

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>本产品使用重组禽类成髓纤维病毒逆转录酶(Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase, AMV RT), 从总 RNA 或者 Poly(A)⁺ RNA 合成第一链 cDNA 的试剂盒, 含有 cDNA 第一链合成所需的所有试剂。AMV RT 具有 RNA 聚合酶活性和 RNase H 的活性, 能够作用于 GC 含量高, 二级结构复杂的 RNA。合成的第一链 cDNA 可广泛应用于第二链合成、杂交、PCR 扩增、Real-time PCR 反应等。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 即开即用, 足够 50 次 RT 反应 (20μL 体系) 和 600 次 PCR 反应 (30μL 体系)。 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。 3. 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。 4. 全长的第一链 cDNA 产量高, 最长可合成 8 kb 的 cDNA。 																										
<p>规格及成分</p>	<table border="1" data-bbox="427 768 1366 1279"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>十孔盒包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AMV 逆转录酶 (含 RI)</td> <td>130921a</td> <td>50 μL</td> </tr> <tr> <td>AMV RT Buffer (含 dNTP)</td> <td>130921b</td> <td>300 μL</td> </tr> <tr> <td>Oligo (dT)₁₈ 引物(0.5 μg/μL)</td> <td>100814</td> <td>50 μL</td> </tr> <tr> <td>随机引物(0.5 μg/μL)</td> <td>100409</td> <td>50 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>5 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>130921sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	十孔盒包装	AMV 逆转录酶 (含 RI)	130921a	50 μ L	AMV RT Buffer (含 dNTP)	130921b	300 μ L	Oligo (dT) ₁₈ 引物(0.5 μ g/ μ L)	100814	50 μ L	随机引物(0.5 μ g/ μ L)	100409	50 μ L	PCR MagicMix 3.0, 含染料	90805	9 mL	RNase-free 水	80403	5 mL	使用手册	130921sc	1 份
成分	编号	十孔盒包装																									
AMV 逆转录酶 (含 RI)	130921a	50 μ L																									
AMV RT Buffer (含 dNTP)	130921b	300 μ L																									
Oligo (dT) ₁₈ 引物(0.5 μ g/ μ L)	100814	50 μ L																									
随机引物(0.5 μ g/ μ L)	100409	50 μ L																									
PCR MagicMix 3.0, 含染料	90805	9 mL																									
RNase-free 水	80403	5 mL																									
使用手册	130921sc	1 份																									
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输, -20$^{\circ}$C 保存, 有效期一年。</p>																										
<p>自备试剂</p>	<p>样品 RNA、模板专一正向和反向引物。</p>																										
<p>使用方法</p>	<p>一、样品 RNA 的制备 (本试剂盒不提供相关试剂)</p> <ol style="list-style-type: none"> 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。 <p>二: RT (逆转录) 反应合成 cDNA</p> <ol style="list-style-type: none"> 2. 按下表配制 RT 反应体系 (20 μL 体系): <table border="1" data-bbox="427 1760 1281 2134"> <tbody> <tr> <td>RNA 模板</td> <td></td> </tr> <tr> <td>总 RNA</td> <td>< 5 μg</td> </tr> <tr> <td>或 poly(A) mRNA</td> <td>< 1 μg</td> </tr> <tr> <td>或专一的 RNA (如体外转录制备的)</td> <td>< 500ng</td> </tr> <tr> <td>引物</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Oligo (dT)₁₈ 引物(0.5 μg/μL)</td> <td>1 μL</td> </tr> </tbody> </table>			RNA 模板		总 RNA	< 5 μ g	或 poly(A) mRNA	< 1 μ g	或专一的 RNA (如体外转录制备的)	< 500ng	引物		Oligo (dT) ₁₈ 引物(0.5 μ g/ μ L)	1 μ L												
RNA 模板																											
总 RNA	< 5 μ g																										
或 poly(A) mRNA	< 1 μ g																										
或专一的 RNA (如体外转录制备的)	< 500ng																										
引物																											
Oligo (dT) ₁₈ 引物(0.5 μ g/ μ L)	1 μ L																										

或随机引物(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	1 μL
或自备模板专一反向引物(20 pmol/ μL)	1-2 μL
RNase-free 水	补水到 13 μL

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。

3. 轻轻混匀后离心 3-5 sec, 反应混合物在 65°C 温浴 5 min 后冰浴 30 sec, 离心 3-5 sec。

将试管冰浴，再加入如下组分：

AMV RT Buffer (含 dNTP)	6 μL
AMV 逆转录酶 (含 RI)	1 μL

轻轻混匀后离心 3-5 sec。

在 PCR 仪上按下列条件进行反转录反应：

cDNA 合成 42°C 30-60 min；

终止反应 85°C 5 min（酶失活），处理后，置于冰上放置。

注意：若使用 Oligo dT 引物或序列特异性引物，进行 42°C，30-60 min 反应；若使用随机引物，应先进行 25°C，10min 反应，然后进行 42°C，30-60 min 反应。

三、PCR (30 μL 体系)

4. 在 PCR 管中加入下列成分：

成分	加入量
PCR MagicMix 3.0, 含染料	15 μL
cDNA 样品（上步的 RT 反应液）	1-5 μL
模板专一性正向引物(10 pmol/ μL)	1-2 μL
模板专一性反向引物(10 pmol/ μL)	1-2 μL
补水到	30 μL

注意：cDNA 也可以稀释后作 PCR 模板。是否稀释或稀释倍数取决于靶基因的丰度。

5. PCR 反应参数(需要根据模板和引物决定，下面的只做参考)：

过程	温度	时间
预变性	94°C	5 min
PCR 反应 (35 个循环)	94°C	1 min
	55°C	1 min

	72℃	2 min
最后延伸	72℃	10 min

四、电泳检测

取 5-10 μ L 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。

注意事项

1. RNA 样品要避免基因组 DNA 污染。用于 cDNA 合成的器具须用 0.1% DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液 37℃ 浸泡 12 h; 然后在 120℃ 高压灭菌 30 min 去除残留的 DEPC。
2. 用于 RNA 实验的试剂,须使用干热灭菌(180℃, 60 min)或者上述 DEPC 处理的器具盛装,使用的无菌水须用 0.1% DEPC 处理后进行高温高压灭菌。建议 RNA 实验使用的器具、试剂和无菌水专用。
3. 不必从总 RNA 中分离 Poly(A)+ mRNA,但以 Poly(A)+ mRNA 为模板可以提高终产物得率和纯度。
4. 尽管以 Oligo dT 作引物无需优化,但随机六合引物和 RNA 的比例对于 cDNA 合成产物的平均长度非常关键,提高随机六合引物/RNA 的比值将导致短链 cDNA (500 bp)产量升高而减少,此比值则有利于长链 cDNA 的合成。
5. 提高反应温度到 50℃ 有利于解决富含 GC 二级结构的 mRNA 问题。AMV RT 的热稳定性相对于 M-MuLV 较好,在 37-50℃ 有较高活性。
6. cDNA 产物应置于 -20℃ 保存。实验操作时应将酶置于冰上,实验结束后于 -20℃ 保存。

常见问题

1. 反转录引物的选择
 - a. 用于第一链 cDNA 合成的引物, oligo dT 有利于长链 cDNA 的合成,使用该引物只需 42℃ 进行反转录即可,无需 25℃ 预热。
 - b. 随机引物适合于 500 bp 以下的短链 cDNA 的合成,所转录的 RNA 模板无需 poly(A) 尾,可转录 5'端区域。使用该引物前须将引物进行 25℃ 温浴。
 - c. 基因特异性引物主要用于合成特定基因片段长度的 cDNA。
2. 第一链 cDNA 合成原理及产物检测
 - a. cDNA 的合成是以 mRNA 为模板,以随机引物或者基因特异性引物或者 oligo dT 为引物,在反转录酶的催化下从 5'→3'合成第一链 cDNA。

关联产品

双酶一管式 RT-PCR 试剂盒 (CAT#:91202-50)