



ZOMANBIO

本产品仅供科研使用. 请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

版本 2021-05

QKRT One Step RT-PCR Kit

QKRT一步法RT-PCR试剂盒

目录号: ZR103-1 200T

保存条件: -20℃保存一年。

组分说明:

Cat. No. ZR103-1	
Kit Size	200T
2×OneStep RT-PCR Mix	2×1ml
RNase-Free Water	2×1ml

产品简介:

QKRT一步法RT-PCR试剂盒是专为一步法RT-PCR实验研制, 逆转录和PCR在同一反应体系中进行, 反应过程中无需添加试剂, 无需打开管盖, 在避免污染的同时提高了检测灵敏度和实验效率。本试剂盒巧妙的将RT酶和PCR用的DNA聚合酶及其buffer揉合为一; 可以以总RNA为模板, 反向基因特异性引物 (GSP) 为反转录引物合成cDNA; 反向基因特异性引物 (GSP) 又可做为PCR的反向引物与正向引物共同快速PCR。即实现直接使用总RNA为模板进行PCR。使用本试剂盒扩增得到的目的产物3'端附有一个"A"碱基, 可直接用于T/A克隆; 但需要纯化。

产品特点:

- 1、操作简单, 降低操作过程中的污染几率。
- 2、灵敏度高, 总RNA可以低到pg级。即使电泳看不到明显的RNA, 依然扩增良好。
- 3、扩增片段最大达到4kb。

注意事项:

1. 在操作过程中应避免RNase污染, 防止RNA降解或实验中的交叉污染, 建议在专门的区域进行RNA操作, 使用专门的仪器和耗材, 操作人员带口罩和一次性手套并经常更换手套。
2. 本试剂盒中的所有试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。所涉及的酶类使用后应尽快放回-20℃, 避免反复冻融。
3. 本试剂盒必须使用特异性引物, 不能使用Oligo (dT) 和Random Primer。引物设计的好坏直接影响到RT-PCR 反应的结果, 设计引物时需考虑GC含量, 引物长度, 引物位置, PCR产物的二级结构等因素, 建议采用专业的引物设计软件来设计。



使用方法:

1. 将RNA模板、引物、OneStep RT-PCR Mix、和RNase-Free Water溶解并置于冰上备用。
2. 根据以下表格配制反应体系:

试 剂	20 μ l反应体系	终浓度
2 $\times$ One Step RT-PCR Mix	10 μ l	1 $\times$
Forward Primer, 10 μ M	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse Primer, 10 μ M	0.4 μ l	0.2 μ M
RNA Template	X μ l	1 pg - 1 μ g
RNase-Free water	up to 20 μ l	

注意: 引物浓度请以终浓度0.1-1.0 μ M作为设定范围的参考。扩增效率不高的情况下, 可提高引物的浓度; 发生非特异性反应时, 可降低引物浓度, 由此优化反应体系。

3. 涡旋震荡混匀, 短暂离心, 将溶液收集到管底。
4. 将PCR仪预热到45 $^{\circ}$ C, 将PCR管置于热循环仪中, 进行RT-PCR反应。

反应条件:

步骤	温度	时间
反转录	45 $^{\circ}$ C	10 min
PCR预变性	94 $^{\circ}$ C	2 min
变性	94 $^{\circ}$ C	30 s
退火	55-65 $^{\circ}$ C	30 s
延伸	72 $^{\circ}$ C	1-2kb/min
终延伸	72 $^{\circ}$ C	5 min

30-40 个循环

注意: 1) 若扩增效果不好可适当延长反转录时间, 最长不超过30分钟。

- 2) 一般PCR实验中退火温度比扩增引物的熔解温度 T_m 低5 $^{\circ}$ C, 退火时间一般为20-30秒, 无法得到理想的扩增效率时, 适当降低退火温度; 发生非特异性反应时, 提高退火温度, 由此优化反应条件。
- 3) 延伸时间根据扩增的片段大小设定, 本产品中包含的DNA Polymerase扩增效率为1kb/30s。
- 4) 可根据扩增产物的下游应用设定循环数。循环次数太少, 扩增量不足; 循环次数多, 错配机率会增加, 非特异性背景严重。所以, 在保证产物得率的前提下, 应尽量减少循环次数。
5. 反应结束后取5 μ l反应产物, 加入适量上样缓冲液后进行电泳检测结果。