



Super Reverse transcript PCR Kit

| 产品编号 | 产品名称 | 规格 | 价格 |
|-----------|----------------------------------|------|--------|
| TER 017-1 | Super Reverse transcript PCR Kit | 25 T | 450.00 |
| TER 017-2 | Super Reverse transcript PCR Kit | 50 T | 800.00 |

产品概述:

Super Reverse transcript PCR Kit 是我公司新开发的 RT-PCR 试剂盒。专门设计的高效高灵敏度的 cDNA 第一链合成系统，及高效的 PCR 系统组成。试剂盒中的反转录酶是我公司的新品 Super M-MLV Reverse transcriptase (RNase H⁻)，该酶是通过重点突变方法使 RNaseH 活性缺失，并增加了酶和模板及随机引物的结合力，具有更好的稳定型和持续合成能力。且试剂盒中加入了 RNase inhibitor，最大限度的降低总 RNA 或者 mRNA 的降解。

适用仪器:

ABI PRISM®7000,7700 和 7900 系列

LightCycle®系列

模板的要求:

RNA 模板：本品适用于两步法 RT-PCR。对总 RNA 的纯度和质量要求较为严格，建议采用我公司试剂 Trigol(产品编号：NEP019)和 Plant RNAzol (产品编号：NEP056)。

引物设计原则:

- ☞ 引物长度：20~30bp 左右
- ☞ GC 含量：40%~60%
- ☞ 设计好的引物应与模板紧密互补
- ☞ 引物的 3'端应避免连续碱基的出现
- ☞ 扩增目的片段：≤200bp (最佳目的片段 100bp~150 bp)

产品主要组份:

| 名称 | 浓度 |
|--|---------|
| Super M-MLV Reverse transcriptase RNase H ⁻ | 50U/μl |
| 5×First-stand Synthesis Buffer | 5× |
| Ultra-pure Taq DNA Polymerase | 2.5U/μl |
| 10×Ultra-pure Taq Buffer | 10× |
| Oligo(dT) ₁₈ | 10 μM |
| β-actin primer I | 10 μM |
| β-actin primer II | 10 μM |
| 5×First-stand Synthesis Buffer | 5× |
| dNTPs | 10 mM |
| RNase inhibitor | 40U/μl |
| RNase-free ddH ₂ O | -- |
| 溶液 I (Rodom Primers(6 聚体引物)) | 10μmM |

操作方法 (ABI PRISM®7700)

以小鼠组织总 RNA 为模板，扩增 318bp β-actin 的片段。

注：做反应体系时应佩戴一次性 PE 手套，口罩。避免外源 RNase 污染。



1、cDNA 第一链合成

(1) 在 0.2.ml 的离心管 (DEPC 处理) 中加入以下反应体系:

| | |
|---|-------------------------------|
| 总 RNA /mRNA | 1~5 μ g /0.05~0.5 μ g |
| Oligo (dT) ₁₈ 或 6 聚体引物 | 1 μ l |
| dNTPs | 1 μ l |
| 5 \times First-stand Synthesis Buffer | 4 μ l |
| Super M-MLV RTase H- | 1 μ l |
| RNase inhibitor | 2 μ l |
| RNase-free ddH ₂ O | 补足 20 μ l |

(2) 短暂离心, 混匀体系中组份。

(3) 42 $^{\circ}$ C 保温 60 min。

(4) 95 $^{\circ}$ C 5 分钟, 4 $^{\circ}$ C 1-5 分钟, 可接着进行如下操作也可迅速放入-20 $^{\circ}$ C 长期冻存。

2、目的片段的荧光定量 PCR 反应

(1) 在 1.5.ml 的离心管 (DEPC 处理) 中加入以下反应体系:

| | |
|-----------------------------------|---------------|
| cDNA | 2~4 μ l |
| 10 \times Ultra-pure Taq Buffer | 4 μ l |
| dNTPs | 1 μ l |
| β -actin primer MIX | 2 μ l |
| Ultra-pure Taq DNA Polymerase | 1 μ l |
| SYBR Green I | 2 μ l |
| RNase-free ddH ₂ O | 补足 50 μ l |

(2) 短暂离心, 混匀体系中组份。

(3) 按照以下参数上机 PCR 扩增

PCR 循环

| | |
|------------------------|---------------|
| 94 $^{\circ}$ C 3min | } 35-40cycles |
| 94 $^{\circ}$ C 30s | |
| 63 $^{\circ}$ C 30s | |
| 72 $^{\circ}$ C 30s | |
| 4 $^{\circ}$ C forever | |

注意:

- ☞ 退火温度只针对实验例引物及模板。用户需根据实际引物的 T_m 值确定实验退火温度。
- ☞ 72 $^{\circ}$ C 延伸为荧光定量 PCR 仪收集数据步骤, 采用 ABI PRISM[®] 系列仪器时延伸时间应 \geq 30s。
- ☞ 严格采用荧光定量 PCR 仪软件操作。