



## 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<sup>-</sup>)，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 <sup>-</sup>	50U/μl
5×First-stand Synthesis Buffer	5×
Ultra-pure Taq DNA Polymerase	2.5U/μl
10×Ultra-pure Taq Buffer	10×
Oligo(dT) <sub>18</sub>	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 <sub>2</sub> 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 $\mu$ g /0.05~0.5 $\mu$ g
Oligo (dT) <sub>18</sub> 或 6 聚体引物	1 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
5 $\times$ First-stand Synthesis Buffer	4 $\mu$ l
Super M-MLV RTase H-	1 $\mu$ l
RNase inhibitor	2 $\mu$ l
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	补足 20 $\mu$ 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 $\mu$ l
10 $\times$ Ultra-pure Taq Buffer	4 $\mu$ l
dNTPs	1 $\mu$ l
$\beta$ -actin primer MIX	2 $\mu$ l
Ultra-pure Taq DNA Polymerase	1 $\mu$ l
SYBR Green I	2 $\mu$ l
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	补足 50 $\mu$ 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	
94 $^{\circ}$ C	30s	} 35-40cycles
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<sub>m</sub> 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<sup>®</sup> 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。