

【注意事项】

1. 严防操作环境、使用的容器耗材和试剂的 RNase 污染。所用器具与耗材进行无 RNase 处理。操作过程中勤换手套。
2. 实验前应检测模板 RNA 的纯度和完整性,避免降解和杂质污染。如果有 DNA 污染而又必须去除,则可以用 RNase-free 的 DNaseI 处理样品。
3. 为了增加反转录的效率和特异性,可以使用从总 RNA 中分离纯化的 poly(A)+ RNA 作为反转录的模板。
4. 反转录时,模板 RNA 的加入量与待扩增基因的表达量有关。
5. 如果使用 Oligo(dT)18 引物,反转录的条件一般不需要优化。但是,使用随机引物反转录时,随机引物与模板 RNA 的比例,可能会影响合成的 cDNA 片段长度。比例越高,片段长度越短。
6. 对于 GC 含量较高的 mRNA,在反转录时可将温度提高到 45℃,但这可能使反转录效率有所下降。
7. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品等用途。

【技术支持信息】

如有任何问题或欲索取更多产品信息,请 Email 至 mylab_sales@163.com 或拨打电话: 010-82893546。美莱博公司还可提供相关的实验技术服务。

MyLab®通用型两步法 RT-PCR 扩增试剂盒

使用说明书

北京美莱博医学科技有限公司

地址: 北京市丰台区海鹰路 8 号金伟凯大厦 1 号楼 103

销售电话: 010-82893546 010-82894339

技术电话: 010-83682978

邮箱: mylab_sales@163.com

网址: <http://www.meilaibo.com>



北京美莱博医学科技有限公司

2018 年

【规格】50T。

【用途与特点】

1. 本试剂盒可用于几乎所有材料来源 RNA 的第一链 cDNA 合成及 PCR 扩增。试剂盒中同时提供了引物 Oligo(dT)18 和随机引物 N6，可根据需要选用，也可以使用基因特异性引物进行反转录反应。
2. 本试剂盒提供的 M-MuLV 反转录酶具有依赖 RNA 的 DNA 聚合酶活性但无 RNase H 活性，反转录最长片断可达 8kb 以上。本试剂盒提供的 RNase 抑制剂可以非竞争性抑制 RNase A、B 和 C 的活性，保护 RNA。
3. 试剂盒中包括了除模板 RNA 和基因特异性引物之外的所有 RT-PCR 反应所需全部试剂。PCR 试剂以 2×PCR TaqMix 形式提供，包含 Taq DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂、反应缓冲液、增强剂、优化剂和稳定剂等，并预混染料，扩增结束后可直接电泳，使用十分方便。所含 Taq DNA 聚合酶的扩增片断长度可达 5Kb，产物可以直接进行 TA 克隆。

【组成及保存条件】

编号	组份名称	浓度	体积 (μl)	保存
1	M-MuLV Reverse Transcriptase	200U/μl	50	-20℃
2	Ribonuclease Inhibitor	40U/μl	25	-20℃
3	5xReaction Buffer	5x	200	-20℃
4	dNTP	10mM	100	-20℃
5	Oligo(dT)18 Primer	0.25μg/μl	100	-20℃
6	Random Hexamer Primer	0.2μg/μl	50	-20℃
7	2×PCR TaqMix	2×	1000	-20℃
8	DEPC-treated Water	/	1000	-20℃

【有效期】大于 12 个月。

【操作步骤】

1. cDNA 合成。

- 1) 在冰上 0.2ml 离心管内加入以下试剂：

total RNA	1ng ~ 2μg
or poly(A) ⁺ mRNA	0.1ng ~ 0.5μg
or specific RNA	0.01pg ~ 0.5μg
oligo(dT)18 primer	2μl (0.5μg)
or random hexamer primer	1μl (0.2μg)
or sequence-specific primer	15~20pmol
DEPC-treated Water	to 12μl

移液器吹打混匀。**70℃保温 10min，立即冰浴 2 分钟。**

- 2) 向管中依次加入以下试剂：

5x Reaction Buffer	4μl
dNTP	2 μl (1 mM final concentration)
Ribonuclease Inhibitor	0.5 μl (20U)
M-MuLV Reverse Transcriptase	1μl
DEPC-treated Water	to 20μl

42℃保温 60min。(注意：如果使用 random hexamer primer，先 25℃ 保温 10min，然后 42℃保温 60min。)

- 3) 70℃保温 10min 终止反应，cDNA 立即用于下游 PCR 扩增或-20℃保存备用。

2. PCR 扩增。0.2ml PCR 管内加入以下试剂：

2×PCR TaqMix	10μl
Primer F (10μM)	1μl
Primer R (10μM)	1μl
Template cDNA	1μl
ddH ₂ O	补至 20μl

按上述比例增加或减少试剂用量，混匀后，置于 PCR 仪中，以反转录的 cDNA 为模板，设计合成的 PCR 引物的退火温度和扩增长度等进行 PCR 反应条件设定扩增程序。反应结束后取 5μl 反应产物，琼脂糖凝胶电泳检测。