



## Two Step qRT-PCR Kit (SYBR Green)

### 使用说明书

#### 【产品简介】

Two Step Real-Time PCR Kit (SYBR Green)是专为两步法荧光定量 PCR 实验配制的,具有高灵敏度的 RT-PCR 反应系统,可以从极低量的总 RNA 或 poly(A)+ RNA 合成第一链 cDNA。与 PCR 反应相结合,可用于检测稀有基因的表达、从极少量细胞中定量检测特定 mRNA 的表达水平、克隆特定基因的 cDNA 片段等。

#### 【注意】

- 1.用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理,并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时,首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后,再将溶液进行过滤除菌处理。
- 2.RNA 样品要避免基因组 DNA 污染。
- 3.避免多次反复冻融 RNA。
- 4.试剂盒的各组成成分应在-20℃保存。
- 5.cDNA 产物应置于-20℃保存

#### 【试剂盒组成】

##### A: 反转录反应部分

试剂盒组成	LK-0113A (20 $\mu$ l $\times$ 50 次)	LK-0113B (20 $\mu$ l $\times$ 100 次)
RT Master Mix(2 $\times$ )	500 $\mu$ l $\times$ 1 支	1ml $\times$ 1 支
RT Enzyme Mix	50 $\mu$ l $\times$ 1 支	100 $\mu$ l $\times$ 1 支
oligo (dT) <sub>15</sub> (20 $\mu$ M)	50 $\mu$ l $\times$ 1 支	100 $\mu$ l $\times$ 1 支
Random (20 $\mu$ M)	50 $\mu$ l $\times$ 1 支	100 $\mu$ l $\times$ 1 支
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	1ml $\times$ 1 支	1ml $\times$ 1 支
说明书	1 份	1 份

##### B: PCR 反应部分

试剂盒组成	20 $\mu$ l $\times$ 50 次	20 $\mu$ l $\times$ 100 次
PCR Master Mix(2 $\times$ )	0.5ml $\times$ 1 支	1ml $\times$ 1 支
PCR Enzyme Mix	50 $\mu$ l $\times$ 1 支	100 $\mu$ l $\times$ 1 支
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	1ml $\times$ 1 支	1ml $\times$ 2 支
说明书	1 份	1 份

#### 【试剂运输及储存条件】

试剂盒运输可在2-8℃环境下进行。储存时,须置-20℃避光保存。有效期为12个月,请在有效期内使用。

#### 【适用荧光 PCR 仪器】

以下机型需要另购 Rox Reference Dye(25mM)货号: LK-0114。

注意: ABI Prism7500, ABI Prism7500 Fast, MJ Research Chromo4, Corbett Rotor Gene 3000 机型,添加 ROX Reference Dye 0.4 $\mu$ l/反应 (0.1X)。

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One, ABI Step One Plus 机型,添加 ROX Reference Dye 0.4 $\mu$ l/反应(1X)。

#### 【操作步骤】

注意: 下列操作步骤适用于模板量为 50ng-2 $\mu$ g 的总 RNA, 如果总 RNA 量大于 2 $\mu$ g, 请按比例扩大反应体系。

1. 将模板 RNA 完全融化并至于冰浴中, 将特异性引物、RT Master Mix、RT Enzyme Mix、Standard Dilution、oligo (dT)<sub>15</sub>、Random、RNase Free ddH<sub>2</sub>O 溶解后, 稍微震荡混匀, 离心后置于冰浴中。



## 2. PCR 试剂准备: 在冰浴条件下按下表配制反应液

反应成分	体积/反应	终浓度
RT Master Mix(2×)	10μl	1×
RT Enzyme Mix	1μl	
oligo (dT) <sub>15</sub> 或 Random(20μM)	1μl	1μM
或特异性引物(1μM)	1.2μl	60nM
RNA 模板	5-8μl	
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	补水至 20μl	

**注意:** 当同时需要进行多次 RT 反应时, 将各组分加倍混合后再分装到每个反应管中, 可以减少实验操作产生的误差, 使所取的试剂体积更准确, 减少试剂损失。

## 3. 逆转录反应 (在扩增检测区进行)

循环参数设定: (请参照各类仪器的操作软件进行设置)

步骤	温度	时间	循环数
1 反转录反应	42-50 °C	30-45分钟	1
2 预变性	85°C	10分钟	1

**注意:** RT后的cDNA如需要进行稀释后的梯度试验, 可以用试剂盒中的Standard Dilution进行稀释, 也可以用RNase Free ddH<sub>2</sub>O。

将逆转录的 cDNA 取出 2μl 作为模板进行 PCR 反应

## 4. PCR 反应:

反应成分	体积/反应	终浓度
PCR Master Mix(2×)	10μl	1×
PCR Enzyme Mix	1μl	
Forward PCR primer(10μM)	0.2μl	0.1μM
Reverse PCR primer(10μM)	0.2μl	0.1μM
模板 cDNA	2μl	
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	补水至 30μl	

## 5. PCR 反应循环参数设定: (请参照各类仪器的操作软件进行设置)

步骤	温度	时间	循环数
1 反转录反应	50°C	10分钟	1
2 预变性	94°C	3分钟	1
3 变性 延伸及检测荧光	94°C	10秒	40
	60°C	40秒	
步骤3中进行荧光检测			

结果检测: 反应结束后取 10μl 反应产物, 琼脂糖凝胶电泳检测。

**注意:** 实际反应条件因模板、引物等的结构不同而各异, 需根据实际情况, 设定最佳反应条件。

**注:** 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。