



# QKRT One Step RT-PCR Kit

## QKRT一步法RT-PCR试剂盒

目录号:ZR103-1

保存条件:-20°C保存一年。

### 组分说明:

Cat. No. ZR103-1	
Kit Size	200T
QKRT OneStep RT-PCR EnzymeMix	80μl
2×OneStep RT-PCR Buffer	2ml
RNase-Free Water	2ml

### 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;但需要纯化去除染料。

### 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,操作人员戴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°C,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 Buffer、QKRT OneStep RT-PCR EnzymeMix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 $\mu$ l反应体系	终浓度
2 $\times$ One Step RT-PCR Buffer	10 $\mu$ l	1 $\times$
Forward Primer, 10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
Reverse Primer, 10 $\mu$ M	0.4 $\mu$ l	0.2 $\mu$ M
QKRT OneStep RT-PCR EnzymeMix	0.4 $\mu$ l	
RNA Template	X $\mu$ l	1 pg - 1 $\mu$ g
RNase-Free water	up to 20 $\mu$ l	

注意：引物浓度请以终浓度0.1-1.0  $\mu$ 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	30 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) 一般PCR实验中退火温度比扩增引物的溶解温度 $T_m$ 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。

2) 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。

3) 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  $\mu$ l反应产物，加入适量上样缓冲液后进行电泳检测结果。