

QIAGEN 一步法 RT-PCR 试剂盒 (OneStep RT- PCR kit) (Cat. 210210, 210212,210215) 需置于-20°C 保存, 请在收到产品后立即放入冰箱冷冻室。

此手册为简易说明书, 如果需要更多详细产品信息请至 www.qiagen.com/handbooks 下载本产品的操作手册 QIAGEN OneStep RT- PCR Kit Handbook。

如需要技术支持可拨打免费技术服务热线 800 988 0325 或 400-880-0325 咨询。

实验前注意事项

■ 反转录和 PCR 在同一试管内依次进行。在实验预备阶段将加入两个反应所需要的所有试剂, 在反应开始后就不必再加入其它组分了。

■ 本流程已为初始反应物在 1 pg – 2 µg 范围内的总 RNA 进行了优化。

■ QIAGEN OneStep RT-PCR 酶混合液中含有热启动 DNA Taq 聚合酶, 它需要一个 95°C 15 min 的孵育过程激活, 这个过程同时也会使反转录酶失活。在反转录结束前不要进行热激活步骤。

■ 本试剂盒使用终浓度为 0.6 µM 的基因特异引物, 反应中不推荐使用随机引物或 oligo-dT 引物。

■ 反应准备阶段请在冰上操作。

■ 请先将热循环仪加热至 50°C 再放入样品。

■ QIAGEN 一步法 RT-PCR 缓冲液中含有终浓度为 2.5 mM 的 MgCl₂, 此浓度 Mg²⁺ 对于大部分反应都能得到满意的结果。

■ 本试剂盒内提供了 Q-Solution, 对于具有复杂二级结构或高 GC 含量的模板 Q-Solution 通常可以提高扩增效率。如果您在特定引物—模板体系中第一次使用 Q-Solution, 请做一份不使用 Q-Solution 的平行对照。

1. 将模板 RNA, 引物, dNTP 混合液, 5× QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 无 RNA 酶水以及 5×Q-Solution (可选) 解冻并置于冰上。使用前混合均匀。
2. 根据表 1 准备反应混合液。此混合液包含了除模板 RNA 外所有反应需要的成分。在准备反应混合液时为了应对移液枪吸头粘附液体的误差, 请在总量基础上再多准备 10%。

注: 每个实验都必须包括一个阴性对照 (不加模板 RNA)。

表 1. 一步法 RT-PCR 反应体系设置

组分	体积/反应	终浓度
反应混合液		
QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5×	10 μ l	1×; 2.5 mM Mg ²⁺
dNTP 混合液 (每种 10 mM)	2 μ l	每种 dNTP 400 μ M
引物 A	可变	0.6 μ M
引物 B	可变	0.6 μ M
无 RNA 酶水	可变	—
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2 μ l	
可选: 5× Q-Solution*	10 μ l	1×
可选: RNA 酶抑制剂 (需自备)	可变	每反应 5-10 单位
模板 RNA	可变	
总反应体积	50 μ l	每反应 1 pg -2 μ g

***富含 GC 或有复杂二级结构模板用**

- 轻轻吹打反应混合液数次以彻底混匀，将适当体积的反应液分装至 PCR 反应管。
- 将模板 RNA (每个反应不要超过 2 μ g)。本试剂盒适用于总 RNA，信使 RNA(mRNA)以及病毒 RNA 等。
- 按表 2 条件设置热循环仪。这个流程中反转录和 PCR 反应条件在大部分反应中都能得到满意的结果。如果希望得到最大的 PCR 产量及特异性，针对每个新的模板—引物体系都应该对温度和循环次数进行优化。

表 2. 一步法 RT-PCR 循环条件

步骤	时间	温度	注释
反转录反应	30 min	50 °C	如果 50 °C 反应结果不佳，可提高反应温度，最高不超过 60 °C
PCR 初始激活	15 min	95 °C	此热激活步骤可激活热启动 Taq DNA 聚合酶，并使反转录酶失活，同时也能使 cDNA 模板变性。
3 步法循环:			
变性	0.5-1 min	94 °C	勿超过此温度
退火	0.5-1 min	50-68 °C	大约比引物 T _m 低 5 °C
延伸	1 min	72 °C	对于长度为 1-2 kb 的 RT-PCR 产物可将延伸时间增加 30-60 s
循环次数	25-40		最佳循环数取决于模板 RNA 的丰度
最后延伸	10 min	72 °C	

6. 开始运行设定好的热循环程序，待热循环仪达到 50°C 后将 PCR 管从冰上转移到热循环仪内。
注：扩增后，产物可在 2-8°C 放置过夜或在 -20°C 长期保存。
7. 表 3 中列出了我们对一些特殊的应用提供了特别的工作流程。请浏览 www.qiagen.com/handbooks 下载 QIAGEN OneStep RT-PCR Kit Handbook 浏览相应章节。

表 3. 特殊操作流程

特殊操作流程	QIAGEN OneStep RT-PCR Kit Handbook 手册附录位置
使用兼并 RT-PCR 引物	B
根据目标丰度决定循环数	C
用巢式 PCR 增加灵敏度	D
大于 2 kb 长片段 RT-PCR	F
多重 RT-PCR	G
与内参一起扩增	H