

版本号: KR161107

# FastKing One Step RT-PCR Kit

## FastKing一步法RT-PCR试剂盒

目录号: KR123

### 产品内容

产品组成	KR123 50 $\mu$ l $\times$ 50 rxn
2 $\times$ FastKing One Step RT-PCR MasterMix	1.25 ml
25 $\times$ RT-PCR Enzyme Mix	100 $\mu$ l
RNase-free H <sub>2</sub> O	2 $\times$ 1 ml

### 储存条件

该试剂盒请置于-20 $^{\circ}$ C保存。-20 $^{\circ}$ C下保质期一年。

---

## 产品简介

本试剂盒采用一步法使RT和PCR在同一反应体系中进行,反应过程中不需要添加试剂,无需打开管盖,避免了样品间交叉污染的同时也提高了检测的灵敏度。

本试剂盒中的25×RT-PCR Enzyme Mix为TIANGEN新型逆转录酶(King RTase)、抗体修饰的热启动Taq DNA聚合酶和RNase Inhibitor的预混Mix形式,其中的King RTase是分子改造后的新型逆转录酶,特别增加了疏水motif,具有更强的RNA亲和性和热稳定性,提高了该酶的逆转录效率和对具有复杂二级结构RNA模板的延伸能力;PCR过程中采用了性能优良的抗体修饰Taq DNA聚合酶,其中高亲和力抗体可以保证在常温条件下完全封闭Taq酶活性,使得逆转录后的PCR反应具更高的扩增效率和特异性。另外,本产品中的2×FastKing One Step RT-PCR MasterMix为专门为上述两种关键酶而优化的新型反应体系,其中包含必要离子组分、dNTPs以及PCR稳定剂和增强剂,可保证King RTase和Taq聚合酶在整个一步法反应过程中发挥最大功效。

## 产品特点

**反应灵敏高效:** 性能优良的逆转录酶和Taq酶保证了极高的反应效率;

**操作简单快速:** 双组分的产品形式使得操作过程变得简单快速;

**解决复杂模板:** 通读GC含量高,二级结构复杂的RNA模板;

**样品普适性好:** 对不同物种来源及杂质较多的RNA模板的适用性高。

## 需自备的试剂

1. 特异性PCR引物;
2. RNA模板。

## 适用范围

RT-PCR技术可用于检测细胞和组织中的基因表达水平,克隆特定基因的cDNA序列和检测RNA病毒。

---

## 实验操作步骤

1. 完全融化模板RNA，特异性引物，2×FastKing One Step RT-PCR MasterMix和RNase-Free ddH<sub>2</sub>O，短暂离心后置于冰浴上。
2. 按下表在冰浴条件下配制反应液：

组成成分	体积 / 反应
2×FastKing One Step RT-PCR MasterMix	25 μl
25×RT-PCR Enzyme Mix	2 μl
上游特异性引物(10 μM)	1.25 μl
下游特异性引物(10 μM)	1.25 μl
RNA模板	10 ng-1 μg total RNA
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	补水至50 μl
总体系	50 μl

注意：当同时需要进行多次RT-PCR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. 按下表设置PCR反应条件：

反应温度	反应时间	反应循环数	说明
42°C <sup>*1</sup>	30 min	1	逆转录
95°C	3 min	1	预变性
94°C	30 sec	35-40	PCR循环步骤
55-65°C <sup>*2</sup>	30 sec		
72°C	30 sec		
72°C	5 min	1	补充延伸步骤

<sup>\*1</sup> 为避免非特异扩增，一步法反应液的配制应始终在冰浴中进行，待PCR仪器温度达42°C时再将反应管放到仪器中。

<sup>\*2</sup> 退火温度可根据实际引物的不同而进行调整。

4. 将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测分析。

---

## 使用注意事项

1. RNA 模板可以采用总RNA或mRNA，建议使用TIANGEN公司生产的TRNzol或RNAprep Pure系列制备高质量的总RNA。
  2. 一步法RT-PCR 实验应避免RNase污染，可采用以下措施：
    - 1) 因人的皮肤表面和唾液都有RNase，因此实验中应佩戴一次性手套和口罩；
    - 2) 一步法RT-PCR实验应使用专门的仪器和耗材，建议在专门区域操作RNA；
    - 3) 一步法RT-PCR实验相关耗材应用0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在37℃处理12 h, 并高压灭菌30 min后使用。
  3. 25×RT-PCR Enzyme Mix在取用之前应短暂离心收集溶液后再吸取，吸取时动作要慢，使用后应尽快放回-20℃。
  4. 2×FastKing One Step RT-PCR Master Mix在取用前应充分混匀并离心后使用。
  5. 本试剂盒必须使用特异性引物，引物的选择可根据具体实验来选择。
-