

Mix 2

5X <i>Tth</i> RT-PCR Buffer	10 μ l
50 mM Mn(OAc) ₂	2.5 μ l
<i>TaKaRa Tth</i> HS(5 U/ μ l) *	1 μ l
RNase free water	up to 25 μ l

* 推荐每个反应添加 5 U。对于有些引物和基因，添加 5 U~15 U 可能会得到更好的效果。

将 Mix1 和 Mix 2 添加至 PCR tube 中，并轻轻的混匀（冰上操作），离心后将反应液收集于管底，放入 thermal cycler 中进行反应，条件如下：

90°C	30 sec	} 30~40 cycles
60~70°C*	30 min	
94°C	1 min	
94°C	30 sec	
50~70°C**	30 sec	
72°C	45 sec***	
72°C	7 min	

*温度取决于下游Primer的融解温度；70°C是最适反应温度，但是温度的升高会加速RNA的降解。

**退火温度取决于引物的融解温度；

***扩增1 kb以下的片段，延伸时间为45 sec。

使用1%~3%的琼脂糖凝胶对产物进行电泳分析。

2-2. Two-step RT-PCR 操作流程

TaKaRa Tth HS 也可以用于 Two-step RT-PCR。其中使用的 Buffers 不是制品中的组分。

Master Mix 的准备

将试剂轻轻混匀并离心，在冰上按下列组分配制 RT 反应液，为了保证反应液配制的准确性，减少分装时造成的误差，应按照比实际用量稍大的体积配制 Master Mix（通常配制反应数+1 的量），取配制好的 Master Mix 分装到反应管中，最后加入 RNA 样品开始反应。

10X RT Buffer	2 μ l
(100 mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 900 mM KCl)	
9 mM MnCl ₂	2 μ l
dNTP Mixture (10 mM each)	0.4 μ l
下游Primer	0.75 μ M (final conc.)
Total RNA	< 200 ng
<i>TaKaRa Tth</i> HS(5 U/ μ l)	0.8 μ l
RNase free water	up to 20 μ l

将 RT 反应液按如下条件进行反应：

90°C, 30 sec (抗体失活)

60~70°C, 10~30 min (RT 反应)

(温度取决于下游 Primer 的融解温度；70°C是最适反应温度，但是温度的升高会加速 RNA 的降解。)

添加 80 μ l 现调制的 PCR Mix (如下) 至 RT 反应液中 (总体积为 100 μ l)

10X <i>Tth</i> PCR Buffer (Mg ²⁺ plus)	8 μ l
EGTA, 7.5 mM	10 μ l
上游Primer	0.15 μ M (final conc.)
RNase free water	up to 80 μ l

混匀并轻轻离心将反应液收集于管底。放入 thermal cycler 中进行反应，条件如下：

94°C	1 min	} 30~40 cycles	
94°C	30 sec		
50~70°C*	30 sec		
72°C	45 sec**		
72°C	7 min		

*退火温度取决于引物的融解温度；

**扩增1 kb以下的片段，延伸时间为45 sec。

使用1%~3%的琼脂糖凝胶对产物进行电泳分析。

附录

RNA 样品制备

要制备高质量的RNA，关键是要抑制细胞中的RNA分解酶和防止所用器具及试剂中的RNA分解酶的污染。因此，在实验中必须采取以下措施：戴一次性干净手套；使用RNA操作专用实验台；在操作过程中避免讲话等等。通过以上办法可以防止实验者的汗液、唾液中的RNA分解酶的污染。

【使用器具】

尽量使用一次性塑料器皿，若用玻璃器皿，应在使用前按下列（1）或者（2）方法进行处理。

(1) 干热灭菌 (180°C, 60 min)

(2) 用0.1%DEPC (焦碳酸二乙酯) 水溶液在37°C下处理12小时。然后在120°C下高压灭菌30分钟以除去残留的DEPC。

另外，建议使用RNase-OFF™ (RNase decontamination solution) (Code No. 9037) 去除仪器和器具等的RNase。RNA实验用的器具和仪器建议专门使用，不要用于其它实验。

【试剂配制】

用于RNA实验的试剂，需使用干热灭菌 (180°C, 60 min) 或用上述方法进行DEPC水处理灭菌后的玻璃容器盛装 (也可使用RNA实验用的一次性塑料容器)，使用的无菌水需用0.1%的DEPC处理后进行高温高压灭菌。

RNA实验用的试剂和无菌水都应专用，避免混用后交叉污染。

【制备方法】

使用简单的RNA纯化方法即可获得满足于RT-PCR反应的RNA (只需少量的RNA便可进行RT-PCR反应)。但为了保证实验的成功率，建议使用GTC法 (异硫氰酸胍法) 制备的高纯度RNA。

从培养细胞、组织中提取时，使用RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)。纯化的RNA用灭菌水或灭菌的TE缓冲液溶解。

RNase-OFF is a trademark of Takara Bio Inc.

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站

www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

v201901Da