



FastKing一步法RT-PCR

试剂盒 (KR123)

操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170424

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. RNA 样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200 μ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



Step 1



完全融化模板RNA，特异性引物，2×FastKing One Step RT-PCR MasterMix和RNase-Free ddH₂O，短暂离心后置于冰浴上。

Step 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 μ l
25×RT-PCR Enzyme Mix	2 μ l
上游特异性引物(10 μ M)	1.25 μ l
下游特异性引物(10 μ M)	1.25 μ l
RNA模板	10 ng-1 μ g total RNA
RNase-Free ddH ₂ O	补水至50 μ l
总体系	50 μ l



Tips

1. 配制反转录混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个反转录反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个反转录反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个反转录反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算除模板和水之外的组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中制成混合物，彻底混匀，短暂离心。

试剂	1个体系的使用量	6个体系的使用量	11个体系的使用量	22个体系的使用量
2×FastKing One Step RT-PCR MasterMix	25 μl	150 μl	275 μl	550 μl
25×RT-PCR Enzyme Mix	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
上游特异性引物(10 μM)	1.25 μl	7.5 μl	13.75 μl	27.5 μl
下游特异性引物(10 μM)	1.25 μl	7.5 μl	13.75 μl	27.5 μl
混合物总体积	29.5 μl	177 μl	324.5 μl	649 μl

3. 计算每个样本所需加入的RNA模板的体积和所需补充的ddH₂O的体积
4. 按：混合物—RNA—ddH₂O的顺序配制体系，彻底混匀。

Step 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	30 min	1	逆转录步骤
95° C	3 min	1	预变性
94° C	30 sec	35-40	PCR循环步骤
55-65° C	30 sec		
72° C	30 sec		
72° C	5 min	1	补充延伸步骤

Tips



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。

退火温度可根据实际引物的不同而进行调整。

Step 4

将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测分析。

