



RT Easy™ I

Master Premix for first-strand cDNA synthesis

Cat.No.RT-01011/01012

Fast and highly sensitive reverse transcription system for generating first-strand cDNA using pg-level RNA

For research use only

Store at -20°C



目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	3
产品质量控制	4
试剂盒内容	4
运输及储存条件	4
试剂盒组分信息	5
注意事项	5
RT Mix 耐受性	6
● 酒精耐受性分析	6
● 胍盐耐受性分析	6
操作前准备事项	7
逆转录引物用量	7
RNA 模板用量	7
实验材料和设备	7
自备试剂	8
安全性	8
操作指南	9
操作示意图	10
问题分析指南	11

产品介绍

本公司的2× RT Easy™ Mix合成第一链cDNA的温度高达50°C，有利于复杂二级结构RNA模板进行逆转录反应。

实验室纯化获得的RNA常有酒精及胍盐残留，对大多数逆转录酶有很强的抑制性，导致逆转录效果不理想或逆转录效率低。福际2× RT Easy™ Mix对酒精和胍盐显示出极高的耐受性，对RNA样品中酒精的最高耐受为45%，胍盐的最高耐受为750mM。即使不纯的RNA也可用福际2× RT Mix进行逆转录反应。独特的反应体系,使得RT反应更加简便、快捷、高效，25min即可完成第一链cDNA的合成。

此产品可与Foregene公司的荧光定量产品Real Time PCR Easy™配合使用，能获得高质量的实验结果。

产品特点

- ◆ 高效的逆转录体系，只需 25min 即可完成第一链 cDNA 的合成。
- ◆ 高灵敏的逆转录体系，pg 级别的模板也可以得到高质量的 cDNA。
- ◆ 逆转录体系热稳定性高，该体系反应温度可高达 50°C，具有良好的逆转录性能。
- ◆ 即使不纯的 RNA 样品(酒精可达 45%，胍盐可达 750mM)也可进行逆转录反应。

试剂盒应用

- ◆ 常规 RT-PCR
- ◆ 合成 cDNA，用于克隆和表达研究
- ◆ 转录起始位点的引物延伸法分析
- ◆ RACE(cDNA 末端快速扩增)
- ◆ 线性 RNA 扩增
- ◆ 芯片标记

产品质量控制

按照福际生物试剂盒质量检测体系标准(FOREGENE's Total Quality Management System), 每一批次的 RT Easy™ I 试剂盒都严格进行多次测试, 确保每一批次试剂盒质量的可靠性和稳定性。

试剂盒内容

RT Easy™ I Master Premix for first-strand cDNA synthesis		
试剂盒组成	RT-01011	RT-01012
	25 次 (20µl 体系)	100 次 (20µl 体系)
2× RT Easy™ Mix	0.25ml	1ml
Random Primer (50µM)	50µl	200µl
Oligo(dT)18 Primer (50µM)	50µl	200µl
RNase-Free ddH ₂ O	1.7ml	1.7ml
说明书	1 份	1 份

运输及储存条件

1. 运输条件

全程低温冰盒运输, 保证试剂盒处于<4°C状态。

2. 保存条件

RT Easy™ I 保存于-20°C。产品收到后立即存放于-20°C恒温冰箱中。如果存储条件适当, 产品在 1 年有效期内不会降低任何性能。

试剂盒组分信息

- ◆ 2× RT Easy™ Mix: Foregene Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、dNTPs、反应缓冲液、优化剂和稳定剂等。
- ◆ Random Primer (50μM): 6 个寡聚核苷酸的随机引物，其浓度为 50μM。
- ◆ Oligo(dT)18 Primer (50μM): 具有 18 个 dT 的引物，其浓度为 50μM。

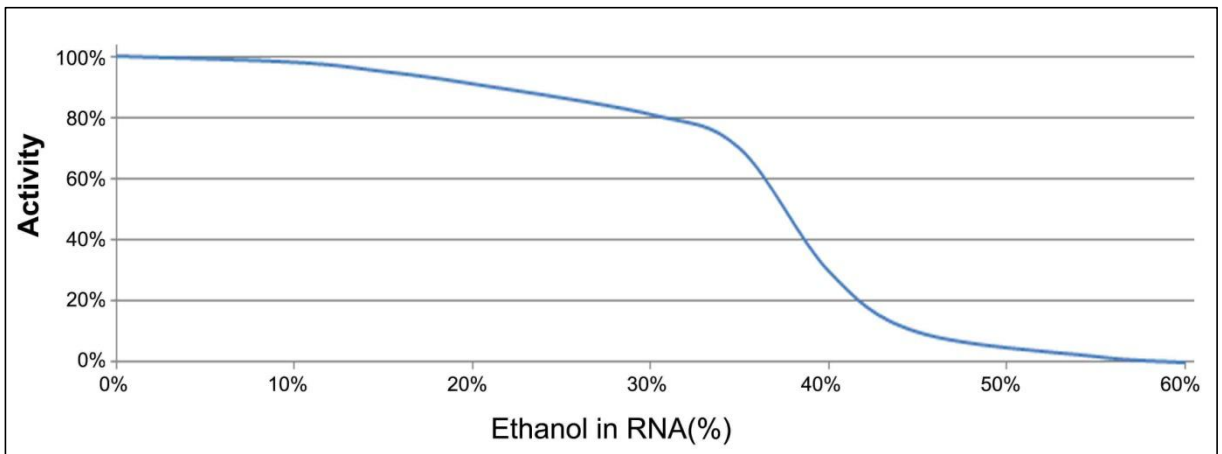
注意事项: (请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 模板建议使用新鲜样品提取的或-80°C条件下保存的 RNA(RNA 应避免反复冻融)。
- ◆ 为避免 RNase 污染，实验操作请在 RNase-Free 空间进行；所用的枪头、PCR 离心管都必须保证是 RNase-Free 的；并佩戴一次性手套和口罩。
- ◆ 使用前，将 2× RT Easy™ Mix 置于冰上使其完全融化，轻弹混匀后使用；体系的配制请在冰浴上操作，以提高试剂盒性能，提高 PCR 扩增的特异性。
- ◆ 2× RT Easy™ Mix 没有添加逆转录引物，需要根据实验要求自行添加适当浓度的 Random Primer 或 Oligo(dT)18 Primer 或特异引物。

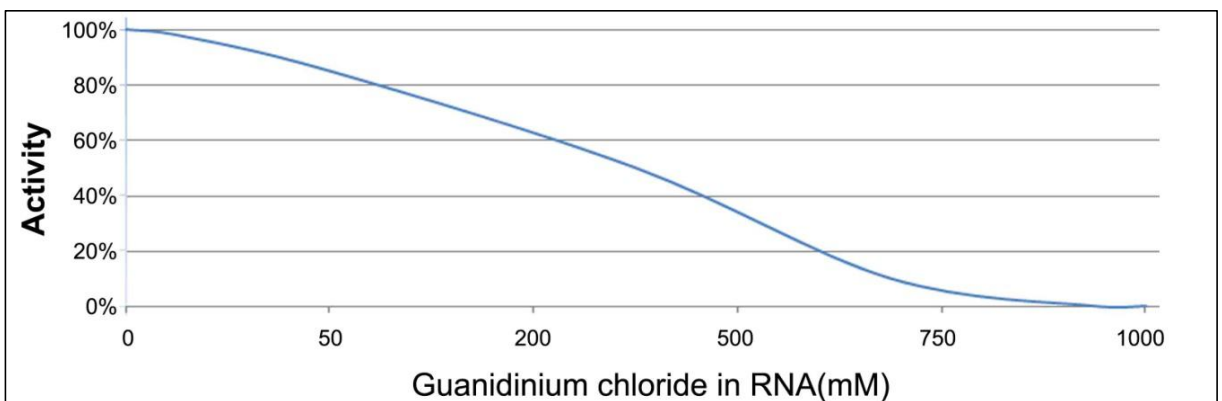
RT Mix 耐受性

经测试分析，2× RT Easy™ Mix对酒精和胍盐显示出极高的耐受性。实验室纯化获得的RNA常有酒精及胍盐残留，对逆转录有很强的抑制性，导致逆转录效果不理想或逆转录效率低。Foregene RT Easy系列产品对酒精及胍盐的耐受能力使得逆转录更容易、高效率的进行。

酒精耐受性分析



胍盐耐受性分析



操作前准备事项

强烈建议用户在本试剂盒使用前仔细阅读说明书。RT Easy 系列试剂盒操作简单、方便、快捷，说明书提供了整个试剂盒的正确使用方法。请在使用前准备好必要的实验材料和设备。

逆转录引物用量

RT Easy™ I 需要添加逆转录引物，请根据实验需要按下表建议加入适当浓度的引物。

引物名称	适用范围	引物用量
Random Primer	适用于长的或具有二级构造的 RNA，包括 rRNA、mRNA、tRNA 等在内的所有 RNA 的逆转录反应都可使用本引物	50 pmol
Oligo(dT)18 Primer	适用于具有 Poly (A)尾的 RNA 注意：原核生物的 RNA、真核生物的 rRNA、tRNA 以及某些种类的真核生物的 mRNA 等不具有 Poly (A)。	50 pmol
特异性下游引物	必须与模板序列互补，需了解靶序列	2 pmol

模板 RNA 用量

模板 RNA 最好使用新鲜样品提取的或是-80℃条件下保存的 RNA(RNA 应避免反复冻融)。

RT Easy™ I: (0.1pg-5µg total RNA or 0.01pg-0.5µg mRNA)/20µl 体系。

实验材料和设备

- ◆ PCR扩增仪或金属浴
- ◆ 微量移液器、RNase-Free枪头
- ◆ RNase-Free tube
- ◆ 冰浴

自备试剂

- ◆ RNA模板
- ◆ 基因特异引物(如有需要)

安全性

- ◆ 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床医疗、食品及化妆品等用途。
- ◆ 使用化学品时，穿戴合适的实验服，手套，防护眼镜等。

操作指南

A: 材料及试剂准备

1. 准备制备好的 RNA 模板(建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列试剂盒提取纯化 RNA)、及相关耗材、仪器。

注意：作为模板的 RNA，请确定 RNA 没有降解或是使用新近提取的 RNA。

2. 取出 2× RT Easy™ Mix 置于冰浴上，使其自然融化，轻弹管壁几次，混匀待用；取出 RNase-Free ddH₂O 融化后置于冰浴上待用；根据需要取出 Random Primer 或 Oligo(dT)18 Primer 或特异引物融化后置于冰上待用。

B: RT 体系配制

2× RT Easy™ Mix使用方便快捷，最大程度上避免操作过程中的污染以及多次配制反应体系带来的实验误差。使用时只需取反应体系一半体积(如：反应体系为20μl，则取10μl 2× RT Easy™ Mix溶液)，加入RNA模板和逆转录引物，并加RNase-Free ddH₂O 补足体积20μl。具体的RT反应体系配制可参考下表1。

表 1: RT 体系配制

RT 体系添加内容	用 量
2× RT Easy™ Mix	10μl
Random Primer(50μM)	1μl*
or Oligo(dT)18 Primer(50μM)	1μl*
or Specific Primer(2μM)	1μl*
Template(RNA)	Xμl (Total RNA:<5μg / mRNA:<0.5μg)
RNase-FreeddH ₂ O	(9-X)μl
Total Volume	20μl

*: 引物用量请参照第 7 页“逆转录引物用量”。

C: RT 反应程序设置

- 参照上表配制好 RT 体系后, 轻轻混匀(可使用枪头轻轻吹打; 也可在涡旋仪上瞬时混匀并瞬时离心收集散落在管壁或管盖的液体, 放置于冰盒上待用)。
- 参照 RT 反应程序设置(表 2)设置反应的温度、时间等。
注意: 为了保证 2× RT Easy™ Mix 的活性和提高其扩增效率, 最好待金属浴达到设置的反应温度(逆转录温度 42°C、50°C 或 65°C, 根据 RNA 模板二级结构选择合适的反应温度)之后再行 RT 反应体系的配制, 以便体系配制完成后立即进入反应程序。也可以在 PCR 仪上进行 RT 反应。
- 反应产物可直接用于后续试验, 或储存 -20°C 长达一周。长期储存建议 -80°C 条件下, 避免反复冻融。

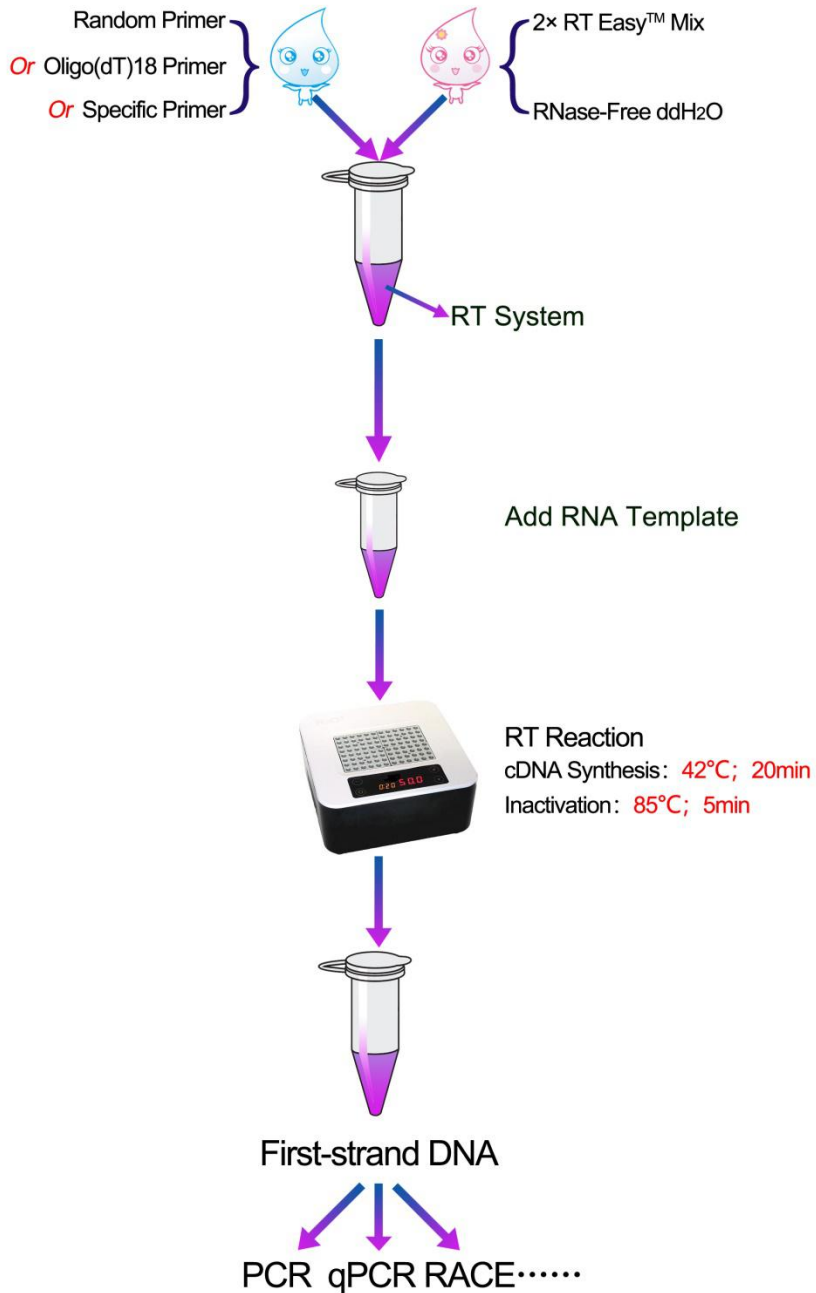
表 2: RT 反应程序设置

步骤	温度	时间	内容
1	42°C	20 min	逆转录
2	85°C	5min	失活

注意: 通常第一步反应温度建议采用 42°C; 对具有复杂二级结构的 RNA 模板, 第一步反应温度建议使用 50°C 或 65°C。使用 Random Primer 时, 在第一步反应前, 应先进行 25°C, 10min 预热反应。以上程序仅作参考, 实际反应条件视模板、引物等的结构条件不同而各异。

快速操作示意图

First-strand cDNA synthesis



问题分析指南

以下针对 RT Easy 系列试剂盒在使用中可能遇到的问题进行分析，希望能对您的实验有所帮助。另外，对于在操作说明和问题以外的其他实验或技术上的问题，我们设有专门的技术支持帮助您。如有任何需要可联系我们：028-83360257 或 E-mail: Tech@foregene.com。

非特异性扩增

1. 引物设计不合理

建议：按照引物设计原则进行引物的设计。

2. 基因组残留。

建议：使用含有基因组去除的逆转录试剂盒如（Cat.No.RH-01031）或者设计跨内含子引物。

RT-QPCR 无扩增信号

1. RNA 被降解。

建议：提取 RNA 的材料尽量新鲜，应用高质量高纯的 RNA。

2. RNA 含有抑制剂。

建议：逆转录抑制剂一般包括 SDS、胍盐、EDTA 等，建议通过 70% 的乙醇对 RNA 沉淀进行清洗，除去抑制剂。

3. 引物设计问题。

建议：按照引物设计原则，重新设计引物进行检查。

空白对照出现目的条带

1. 操作工具或试剂污染。

建议：实验所有试剂或器材均应高压灭菌。操作时应小心轻柔，防止将 DNA 样品吸入加样枪内或溅出离心管外。

2. PCR 反应体系制备时发生污染。

建议：操作时进行必要的防护措施，比如：戴乳胶手套，使用带滤芯的枪头。使用防污染体系的 real time PCR Mix。

3. 引物出现降解。

建议：使用 SDS-PAGE 电泳检测引物是否发生降解，更换新的引物进行荧光检测实验。

中国 ● 福际 World's Foregene

成都福际生物技术有限公司

电话: 028-83360257, 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

[Http://www.foregene.com](http://www.foregene.com)

