



RT Easy™ II(With gDNase)

Master Premix for first-strand cDNA synthesis for Real Time PCR

Cat.No.RT-01031/01032

Fast and highly sensitive reverse transcription system for generating first-strand cDNA for use in Real Time PCR

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
RNA 模板用量	5
操作前准备事项	6
实验材料和设备	6
自备试剂	6
安全性	6
● RT Easy™ II 操作步骤	7
操作示意图	9
问题分析指南	10

产品介绍

RT Easy™ II(With gDNase)是专门为Real Time PCR研制的快速去除基因组DNA污染的逆转录体系。5× gDNase Mix能在42°C，2min快速去除RNA中残留的基因组，有效的避免了基因组对qPCR结果的干扰。

5× RO-Easy™ Mix内含福际专门研制的Foregene Reverse Transcriptase，是一款新型反转录酶，具有更强的RNA亲和性。优化后的体系使得逆转录速率更快，42°C，15min即可完成第一链cDNA的合成。

该试剂盒的逆转录体系在50°C条件下逆转录酶也能保持良好的活性，因此对于复杂的RNA模板更优势，能轻松的转录GC含量高、二级结构复杂的RNA模板。

产品特点

- ◆ 高效的去 gDNA 能力，能在 2min 内去除模板中的 gDNA。
- ◆ 高效的逆转录体系，只需 15min 即可完成第一链 cDNA 的合成。
- ◆ 复杂模板：GC 含量较高和二级结构复杂模板亦能得到很高效率的逆转。
- ◆ 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，最适反应温度为 42°C，在 50°C仍具有良好的逆转录性能。

试剂盒应用

- ◆ 直接用于 Real Time PCR 定量分析基因的表达。
- ◆ 可以快速、准确地对 RNA 病毒等微量 RNA 进行分析。
- ◆ 高 GC 含量或具有复杂二级结构 RNA 模板的逆转录。

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™ II(With gDNase)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™ II(With gDNase) Master Premix for first-strand cDNA synthesis for Real Time PCR		
试剂盒组成	RT-01031	RT-01032
	25 次 (20µl 体系)	100 次 (20µl 体系)
5× gDNase Mix	50µl	200µl
5× RO-Easy™ Mix	100µl	400µl
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

试剂盒保存于-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

- ◆ 5× gDNase Mix: gDNA 去除剂，在进行 RT 反应前务必按照操作说明使用该试剂 (内部甘油含量较高，-20°C 以上可能不会结冰，属于正常现象)。
- ◆ 5× RO-Easy™ Mix: 包含福际生物专门研制的 Foregene Reverse Transcriptase、RNase Inhibitor、dNTPs、稳定剂、增强剂、优化剂及优化配比的逆转录引物 (Random Primer、Oligo(dT)₁₈ Primer)。

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 5× gDNase Mix 和 5× RO-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。
- ◆ 5× RO-Easy™ Mix 已经添加了优化配比的逆转录引物，无需再额外添加任何引物。
- ◆ 对二级结构复杂的 RNA 模板，可把反应温度提高至 50°C。

模板 RNA 用量

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

RT Easy™ II(With gDNase): (0.1pg-1µg total RNA or 0.01pg-0.1µg mRNA)/20µl 体系。

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™ II(With gDNase)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。

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

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。

操作步骤

A: 材料及试剂准备

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

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

2. 取出 5× gDNase Mix 和 5× RO-Easy™ Mix 置于冰浴上, 使其自然融化, 并轻揉混匀待用; 取出 RNase-Free ddH₂O 融化后置于冰浴上待用。

B: 去 gDNA 反应

1. 按如下成分于冰上配制反应混合液, 为了保证反应液配制的准确性, 进行各项反应时, 应先按反应数+2 的量配制 gDNA Mix, 然后再分装到每个反应管中, 最后加入 RNA 样品。体系配制参考下表 1:

表 1: 去 gDNA 体系配制

体系添加内容	用 量
5× gDNase Mix	2μl
Template(RNA)	Xμl (Total RNA:<1μg / mRNA:<0.1μg)
RNase-Free ddH ₂ O	(8-X)μl
Total Volume	10μl

2. 体系配制完成后, 按照下表 2 的反应条件进行去 gDNA 反应。

表 2: 去 gDNA 反应条件

步骤	温度	时间	内容
1	42°C	2min	去gDNA反应
2	4°C	N/A	反应完成后置于4°C待用或-20°C保存

3. 反应结束置于冰上, 按照表 3 进行 RT 反应体系的配制。

C: RT 体系配制

- 使用 B 步骤得到的去 gDNA 反应液为模板进行 RT 体系配制，只需将 5× RO-Easy™ Mix 加入到 B 步骤反应管中进行反应即可。具体的 RT 反应体系配制可参考下表 3。

表 3: RT 体系配制

RT 体系添加内容	用 量
B步骤反应液(所有)	10μl
5× RO-Easy™ Mix	4μl *
RNase-Free ddH ₂ O	6μl
Total Volume	20μl

*: 将 5× RO-Easy™ Mix 直接加入 B 步骤反应之后的反应管中加水补齐体系即可进行下一步反应，5× RO-Easy™ Mix 中已经添加逆转录引物，无需再进行补加。

- 体系配制完成后，轻柔混匀并简短离心后按照下表 4 的反应条件进行 RT 反应。

表 4: RT 反应条件

步骤	温度	时间	内容
1	42°C	15min	失活gDNase及cDNA合成
2	85°C	5sec	失活逆转录酶
3	4°C	N/A	反应完成后置于4°C待用或-20°C保存

注意：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。对具有复杂二级结构的 RNA 模板，在第一步反应温度建议使用 50°C，其他 RNA 模板建议采用 42°C。

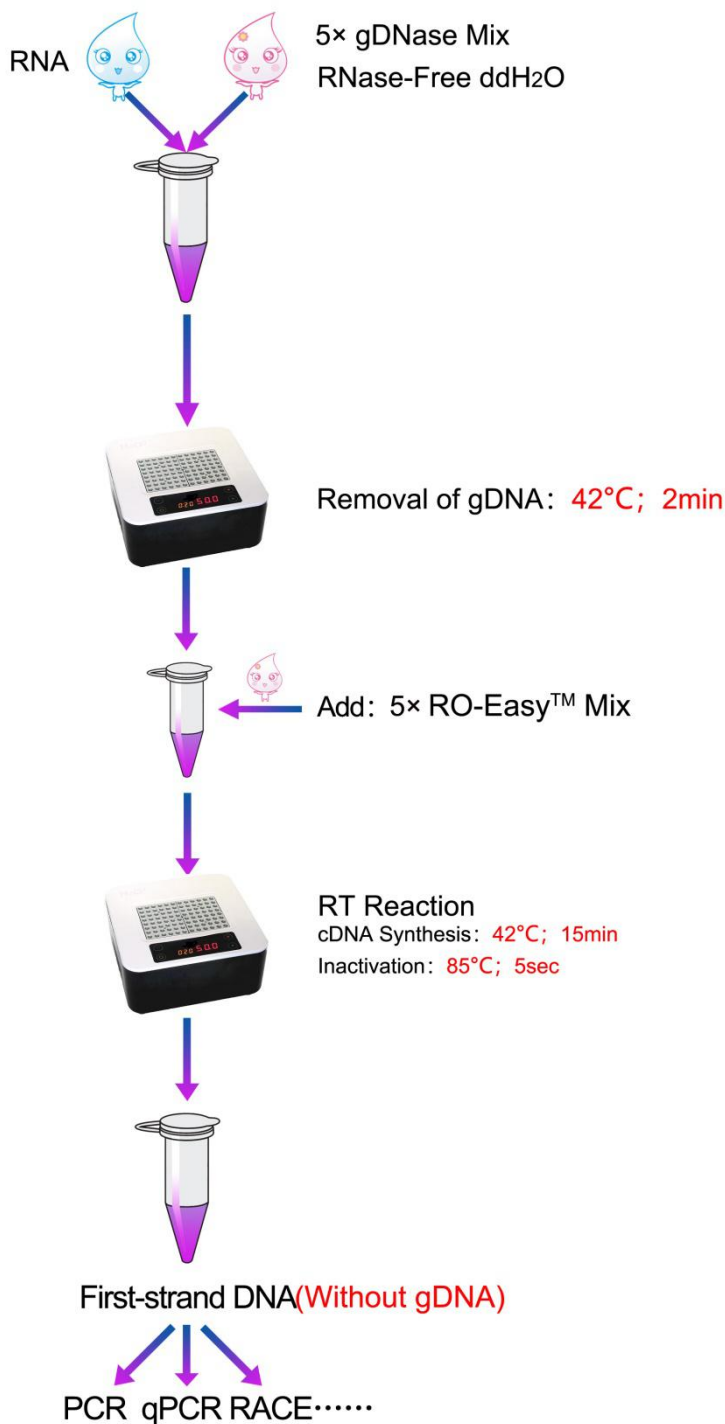
- 反应完成之后，置于冰上直接用于 Real Time PCR，长期保存请置于-20°C。

注意：得到的 RT 反应液加入到下一步的 Real Time PCR 反应体系中，其加入量不要超过 Real Time PCR 反应体积的 1/10(V/V)量。

快速操作示意图

First-strand cDNA synthesis

For Real Time PCR(With gDNase)



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：028-83361257 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：确定第一步 gDNA 去除反应温度为 42°C，也可延长反应时间至 5min。

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)

