



RT Easy™ I (For first-strand cDNA synthesis)

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

RT Easy™ II (First-strand cDNA synthesis for Real Time PCR)

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

Research use only

Store at -20°C



目 录

产品介绍	3
产品特点	3
试剂盒应用	4
产品质量控制	4
试剂盒内容	5
试剂盒组分信息	5
运输及储存条件	6
注意事项	6
RT Mix 耐受性	7
● 酒精耐受性分析	7
● 胍盐耐受性分析	8
逆转录引物用量	9
RNA 模板用量	9
操作前准备事项	10
实验材料和设备	10
自备试剂	10
安全性	10
操作指南	11
● RT Easy™ I 操作步骤	11
● RT Easy™ II 操作步骤	13
反应实例	15
操作示意图	17
问题分析指南	18

产品介绍

2x RT Easy™ Mix、2x RT OR-Easy™ Mix合成第一链cDNA的温度高达50°C，65°C温度下仍具有活性，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。而2x RT Easy™ Mix、2x RT OR-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%(2x RT Easy™ Mix)、60%(2x RT OR-Easy™ Mix)，胍盐的最高耐受为750mM。即使不纯的RNA也可用2x RT Easy™ Mix、2x RT OR-Easy™ 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。

2x RT OR-Easy™ Mix是专为Real Time PCR而研发的快速逆转录试剂，该体系逆转录效率高，无需添加任何引物，可对少量RNA模板进行良好的逆转录反应。独特的反应体系，使得RT反应更加简便、快捷、高效，20min即可完成第一链cDNA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，该体系通常反应温度高达 50°C，在 65°C仍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。
- ◆ 2x RT OR-Easy™ Mix 已添加了优化配比的逆转录引物（Random Primer、Oligo(dT)₁₈ Primer）。

试剂盒应用

RT Easy™ I(For first-strand cDNA synthesis)

- ◆ 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

RT Easy™ II(First-strand cDNA for Real Time PCR)

- ◆ 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), RT Easy™ I(For first-strand cDNA synthesis) 和 RT Easy™ II(First-strand cDNA for Real Time PCR)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(For first-strand cDNA synthesis)

试剂盒组成	RT-01011	RT-01012
	25 次 (20 μ l 体系)	100 次 (20 μ l 体系)
2x RT Easy™ Mix	0.25ml	1ml
Random Primer (50 μ M)	50 μ l	200 μ l
Oligo(dT)18 Primer (50 μ M)	50 μ l	200 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	1.7ml	1.7ml
说明书	1 份	1 份

RT Easy™ II(First-strand cDNA for Real Time PCR)

试剂盒组成	RT-01021	RT-01022
	50 次 (10 μ l 体系)	200 次 (10 μ l 体系)
2x RT OR-Easy™ Mix	0.25ml	1ml
RNase-Free ddH ₂ O	1.7ml	1.7ml
说明书	1 份	1 份

试剂盒组分信息

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

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 $< 4^{\circ}\text{C}$ 状态。

2. 保存条件

- ◆ RT EasyTM 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。
- ◆ RT EasyTM II 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。

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 2x RT EasyTM Mix 或者 2x RT OR-EasyTM 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。
- ◆ RT EasyTM I 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 EasyTM II 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。

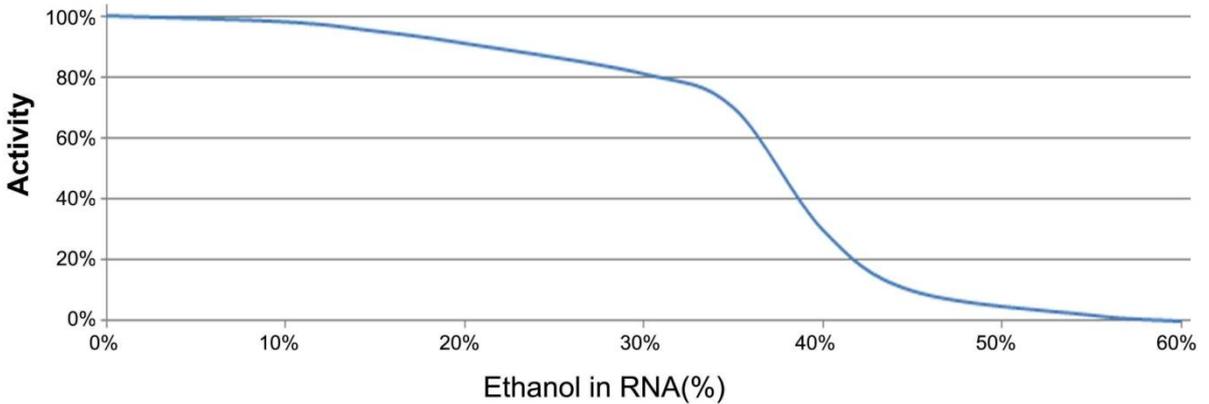
RT Mix 耐受性

经测试分析，2x RT Easy™ Mix和2x RT OR-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的高效率的进行。

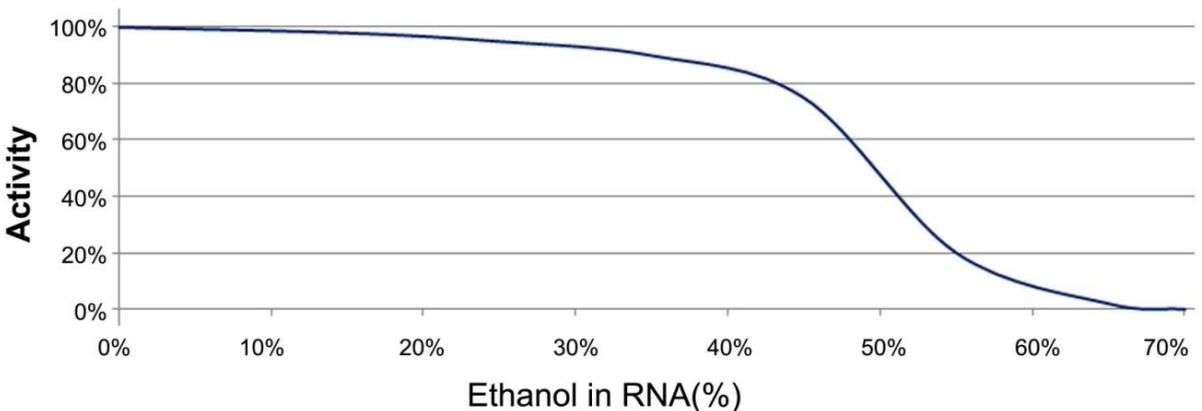
注意：下图活性测试所使用RNA量与2x RT Easy™ Mix或2x RT OR-Easy™ Mix比例为1:1，即直接使用RNA将2x RT Easy™ Mix或2x RT OR-Easy™ Mix稀释至1x。

酒精耐受性分析

2x RT Easy™ Mix

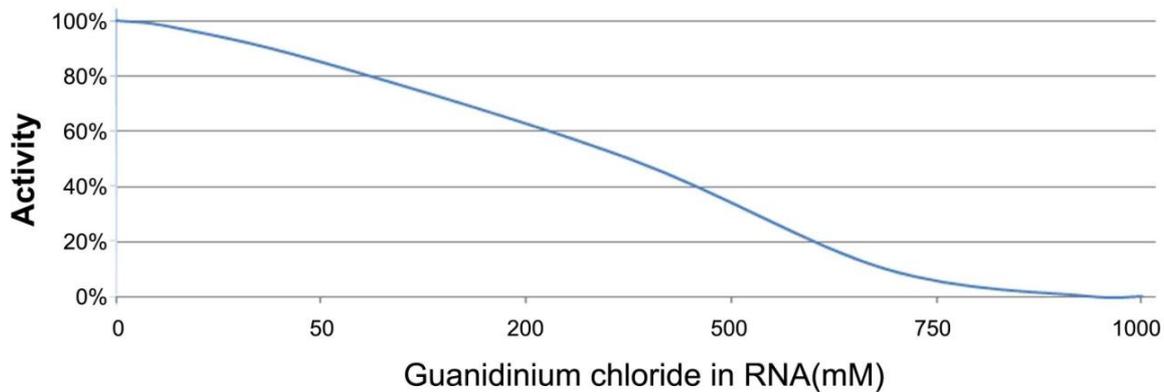


2x RT OR-Easy™ Mix

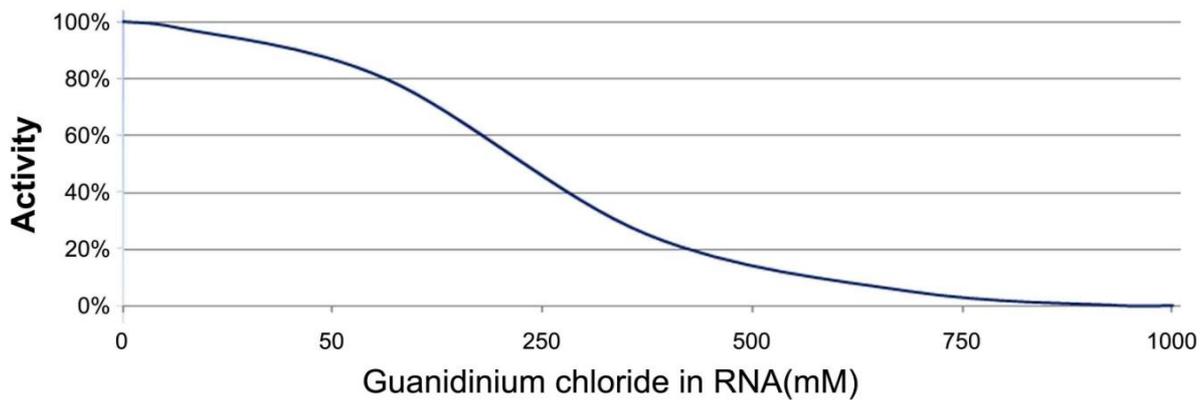


胍盐耐受性分析

2x RT Easy™ Mix



2x RT OR-Easy™ Mix



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 的反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°C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。
- ◆ RT Easy™ II: (0.1pg-0.5µg total RNA or 0.01pg-0.05µg mRNA)/10µl 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 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。

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

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

RT Easy™ I(For first-strand cDNA synthesis)操作步骤

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 2x 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

2x 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 2x 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
2x RT Easy™ Mix	10μl
Random Primer(50μM)	1μl
<i>or Oligo(dT)18 Primer(50μM)</i>	1μl
<i>or Specific Primer(2μM)</i>	1μl
Template(RNA)	Xμl (Total RNA: <5μg/mRNA: <0.5μg)
RNase-FreeddH ₂ O	(9-X)μl
Total Volume	20μl

C : RT 反应程序设置

1. 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）。
2. 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 2x 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 50°C 或 65°C）之后再进行 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。

3. 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 -70°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	50°C 或 65°C	20 min	逆转录
2	85°C	5min	失活

注意：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。对具有复杂二级结构的 RNA 模板，第一步反应温度建议使用 65°C，其他 RNA 模板建议采用 50°C。

RT Easy™ II (First-strand cDNA synthesis for Real Time PCR) 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 2x RT OR-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 : RT 体系配制

2x RT OR-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 10μl，则取 5μl 2x RT OR-Easy™ Mix 溶液），加入 RNA 模板，并加 RNase-Free ddH₂O 补足体积 10μl。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
2x RT OR-Easy™ Mix	5ul
Template(RNA)	Xμl (Total RNA: <0.5μg /mRNA: <0.05μg)
RNase-FreeddH ₂ O	(5-X)μl
Total Volume	10μl

C : RT 反应程序设置

1. 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）。
2. 参照下面 RT 反应程序设置反应的温度、时间等（表 4）。

注意：为了保证 2x RT OR-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 50°C 或 65°C）之后再进行 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。

3. 反应完成之后，置于冰上直接用于 Real Time PCR，或-20℃储存长达一周，长期储存应置于-70℃条件下，避免反复冻融。

表 4：RT 反应程序设置

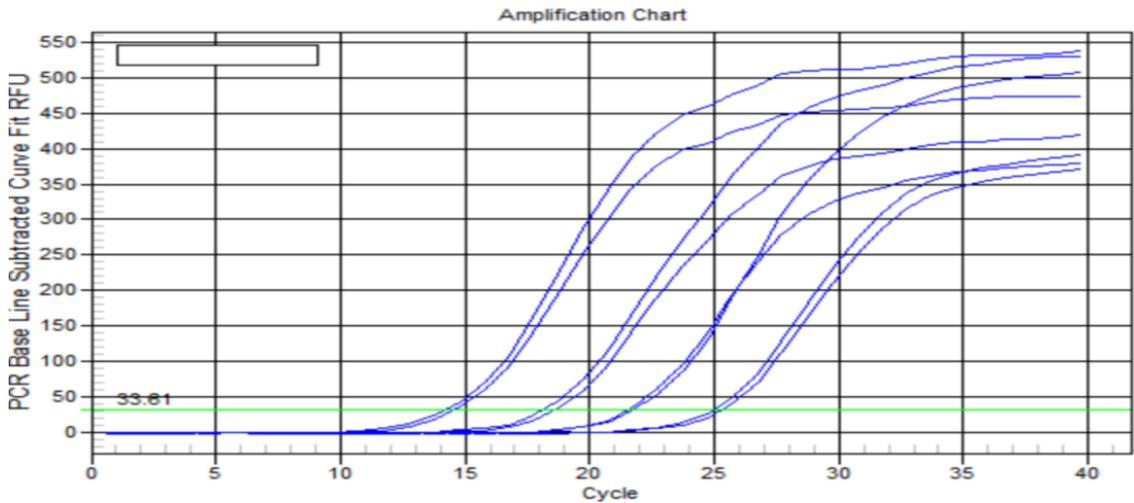
步骤	温度	时间	内容
1	50℃或65℃	15 min	逆转录
2	85℃	5min	失活

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 65℃，其他 RNA 模板建议采用 50℃。

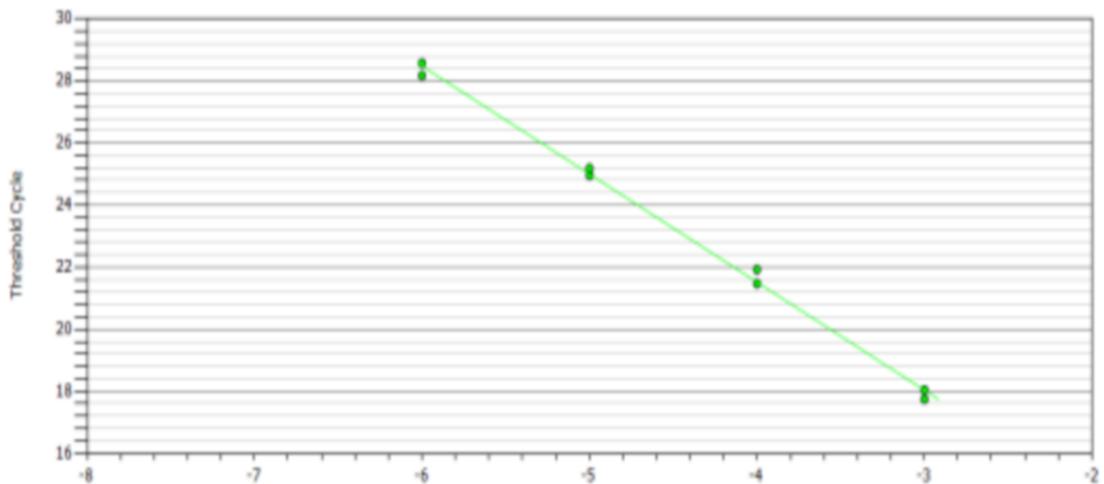
反应实例

本实验采用两步法 RT-qPCR，从小鼠细胞中所提取的 Total RNA 模板为使用 RT EasyTM I 试剂盒进行逆转录，以反应液为模板利用荧光定量方法检测 *actb* 基因的表达。实验结果可见溶解曲线出现单一峰，有良好的特异性，同时标准曲线线性关系良好，能够很地检测到 0.1ng~100 ng Total RNA。

扩增曲线

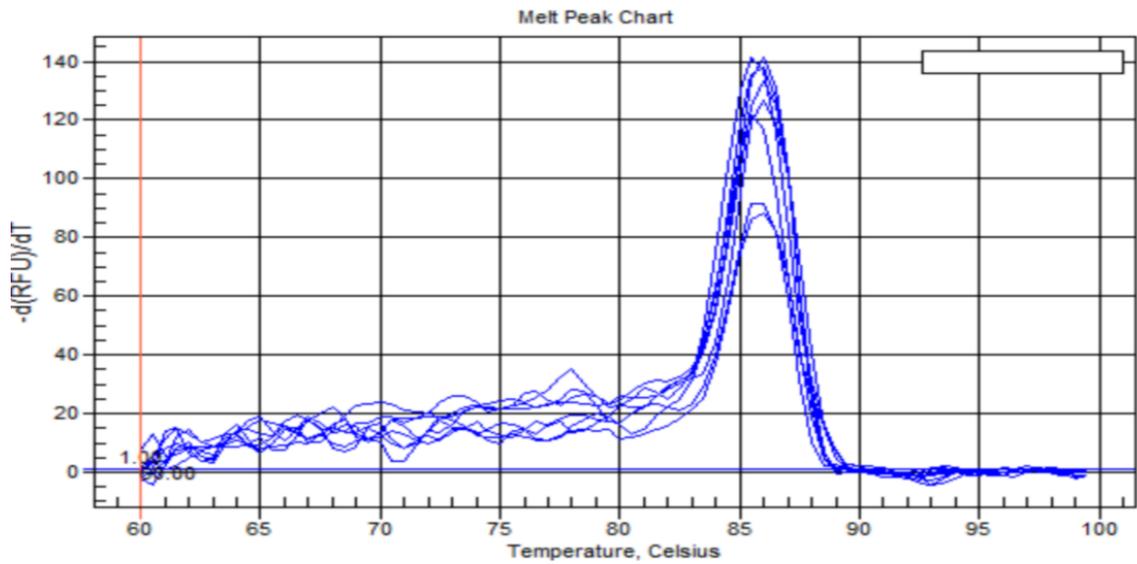


标准曲线



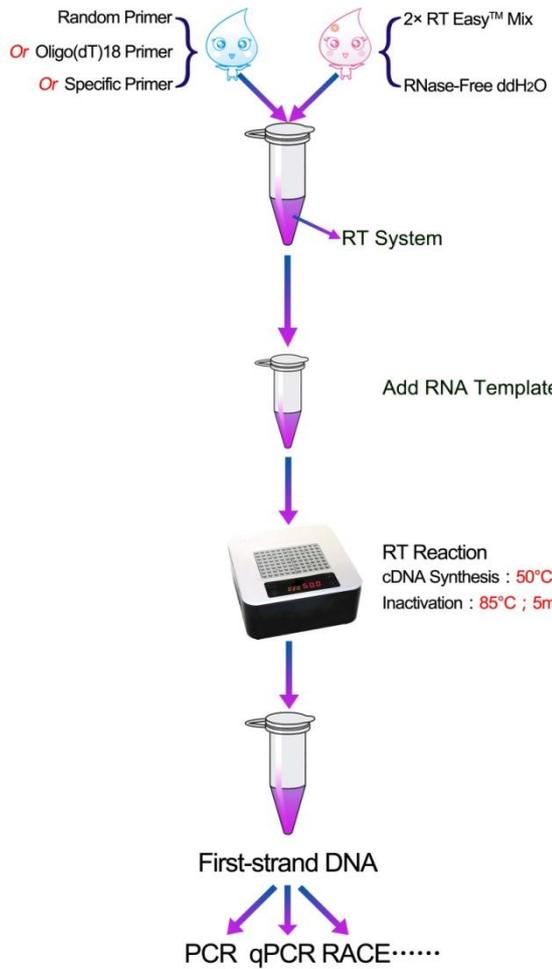
FAM Efficiency (%)=95.5 R²=0.997 Slope=-3.482 y-Intercept=7.593

溶解曲线

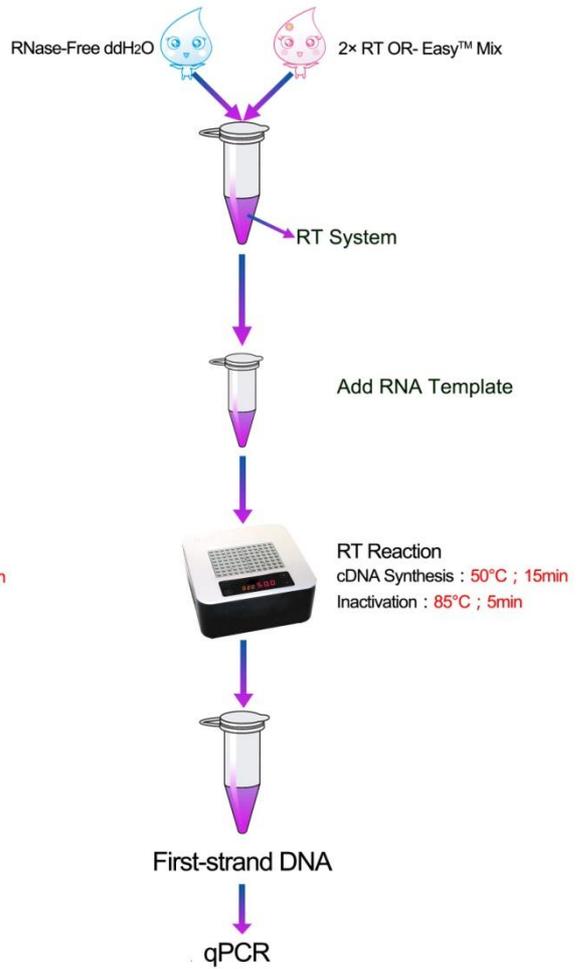


快速操作示意图

First-strand cDNA synthesis



For Real Time PCR



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：028-66070618 或 E-mail：Tech@foregene.com。

RT-PCR 未出现目的片段

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。

RT-PCR 产物出现非特异性条带

1. RNA 中有基因组 DNA 污染。

建议：使用扩增级的 DNase I 进行处理，设置没有逆转录的对照检测 DNA 污染。

2. 退火温度不适。

建议：对引物做梯度 PCR，选择合适的退火温度。

3. 形成引物二聚体。

建议：减少引物使用量，或更加模板使用量，设计 3' 端没有互补序列的引物。

4. 镁离子浓度过高。

建议：优化反应体系中镁离子浓度。

5. 模板加入量过多。

建议：可用水或 TE Buffer 将裂解液进行 10~100 倍稀释后，再作为模板进行 PCR。

产生弥散带

1. PCR 中 cDNA 添加过多。

建议：减少 PCR 中模板 cDNA 使用量。

2. 退火温度过低。

建议：提高退火温度，防止非特异性的起始和延伸。

3. PCR 引物污染。

建议：重新合成引物。

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。

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

传真: 028-83361257

E-mail: info@foregene.com

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

