



RT-PCR Easy™ II(Two Step)

Cat.No.RT-02021/02022

Two-step RT-PCR Master Mix

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.....	3
试剂盒内容.....	4
运输及储存条件.....	4
试剂盒组分信息.....	4
Foregene Reverse Transcriptase.....	4
Foregene HotStar Taq DNA Polymerase.....	5
注意事项.....	5
操作前准备事项.....	6
RNA 模板浓度.....	6
实验材料和设备.....	6
自备试剂.....	6
安全性.....	6
操作指南.....	7
操作示意图.....	10
问题分析指南.....	11

产品介绍

RT-PCR Easy™ II(Two Step) 包含两步法 RT-PCR 的全部试剂，将 RT 反应和 PCR 反应结合在同一个试剂盒中，提供了优化的 RT Mix 和 PCR Mix。独特的 RT Mix，能简便高效的合成高质量的第一链 cDNA，2× PCR Easy™ Mix Plus 具有高效的特异性扩增，两者的有机结合使得目的基因的检测更加灵敏。

产品特点

- ◆ 可以快速准确的对 RNA 进行实时定量分析。
- ◆ 试剂盒使用独特的 Foregene 反转录试剂和 Foregene HotStar Taq DNA Polymerase 相结合，并配合独特的反应体系，有效提高反应的扩增效率和特异性。
- ◆ 优化的反应体系使得反应具有更高的检测灵敏性，更强的热稳定性，更好的耐受性。

试剂盒应用

- ◆ 方便快捷，可广泛用于cDNA的克隆，基因检测等分子实验。
- ◆ 特别适合对高GC含量或具有复杂二级结构的RNA模板进行分析。

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-PCR Easy™ II(Two Step)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-PCR Easy™ II(Two Step) 两步法 RT-PCR 试剂盒		
试剂盒组成	RT-02021	RT-02022
	100 次 (20µl 体系)	500 次 (20µl 体系)
2× RT Easy™ Mix	1ml	1.7ml×3
2× PCR Easy™ Mix Plus	1ml	1.7ml×3
Random Primer (50µM)	200µl	1ml
Oligo(dT)18 Primer (50µM)	200µl	1ml
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℃状态。

2. 保存条件

试剂盒保存于-20℃。产品收到后立即存放于-20℃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。
- ◆ 2× PCR Easy™ Mix Plus : Foregene Taq DNA Polymerase、dNTPs、Mg²⁺、反应缓冲液、优化剂、稳定剂。

Foregene Reverse Transcriptase

Foregene 逆转录酶能够提供高效、特异性强的逆转录反应。逆转录酶表现出很高的亲和力和，并在 50°C 反应温度条件下仍然保持良好的逆转录活性，能够很好的逆转录其他逆转录酶不能处理的二级结构复杂的 RNA。Foregene Reverse Transcriptase 灵敏度高，使用的 RNA 量范围广泛($0.1\text{pg} \leq \text{RNA} \leq 1\mu\text{g}$)。

Foregene HotStar Taq DNA Polymerase

提供了 PCR 的高度特异性扩增。反转录进行时，DNA 聚合酶是完全无效的，不妨碍反转录反应。后通过 PCR 反应程序，加热到 94°C，激活 DNA 聚合酶同时，失活逆转录酶。热启动过程消除了第一个循环时非特异性退火的引物和引物二聚体的形成，保证 PCR 扩增的高度特异性和可靠性。

注意事项：(请务必在使用试剂盒前仔细阅读注意事项)

- ◆ 试剂应避免反复冻融，否则会导致试剂性能下降或失效。
- ◆ 建议使用新鲜样品提取或-80°C条件下保存的模板 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 tube 都必须保证是 RNase-Free 的；并佩戴一次性手套和口罩。
- ◆ 本试剂盒必须配合特异引物进行实验，请根据实验需要选择需要扩增的基因的特异引物。
- ◆ 使用前，将 2× RT Easy™ Mix、2× PCR Easy™ Mix Plus 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。

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-PCR Easy™ II(Two Step)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。

模板 RNA 浓度

RT-PCR Easy™ II(Two Step): (0.1pg-5µg total RNA)/20µl 体系

实验材料和设备

- ◆ 常规PCR仪或荧光定量PCR扩增仪
- ◆ 微量移液器和RNase-Free枪头
- ◆ 冰浴

自备试剂

- ◆ RNA模板
- ◆ 基因特异PCR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

A-1: 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)、特异引物(10 μ M)及相关的耗材、仪器。

注意: 请确保 RNA 的完整性, 尽量使用新鲜样品提取的 RNA。

2. 将 2 $\times$ RT Easy™ Mix、RNase-Free ddH₂O 置于冰浴上, 使其自然融化, 并轻弹管壁混匀待用。

A-2: RT 体系配制

2 $\times$ 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20 μ l, 则取10 μ l 2 $\times$ 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20 μ l。具体的RT反应体系配制可参考下表1。

表 1: RT 体系配制

RT-PCR 体系添加内容	用 量
2 $\times$ RT Easy™ Mix	10 μ l
Random Primer(50 μ M)	1 μ l
or Oligo(dT)18 Primer(50 μ M)	1 μ l
or Specific Primer(2 μ M)	1 μ l
Template(RNA)	X μ l (Total RNA:<5 μ g / mRNA:<0.5 μ g)
RNase-Free ddH ₂ O	(9-X) μ l
Total Volume	20 μ l

A-3: 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 Mix 的活性和提高其扩增效率，最好在待金属浴达到设置的反应温度(逆转录温度 42°C或 50°C)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。

表 2：RT 反应程序设置

步 骤	温 度	时 间	内 容
1	42°C或50°C	20 min	复性&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 50°C。

- 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。

B： PCR 鉴定反应

B-1： PCR 反应体系配制

使用 A 步骤合成的 cDNA 作为模板，配合试剂盒中提供的 2× PCR Easy™ Mix Plus 进行 PCR 反应。将 2× PCR Easy™ Mix Plus、cDNA、RNase-Free ddH₂O 置于冰浴上，使其自然融化，并轻弹管壁混匀待用。具体的 PCR 体系配制参照下表 3。

表 3：PCR 反应体系配制

RT-PCR 体系添加内容	用 量	终浓度
2× PCR Easy™ Mix Plus	10μl	1×
Forward Primer (10μM)	0.5μl	0.2-0.25μM ^{1*}
Reverse Primer (10μM)	0.5μl	0.2-0.25μM ^{1*}
Template(cDNA)	Xμl	1-2μl
RNase-Free ddH ₂ O	(9-X)μl	
Total Volume	20μl	

1*：通常引物终浓度为 0.2-0.25μM 可以得到较好结果。反应性能较差时，可以在 0.1-0.5μM 范围内调整引物浓度。

B-2: PCR 反应条件设置

1. 参照上表配制好 PCR 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 PCR 反应程序设置(表 4)设置反应的温度、时间等。

注意：为了保证 PCR Mix 的活性和提高其扩增效率，最好先在 PCR 仪上设置好 PCR 条件，在进行 PCR 体系的配制。

表 4: PCR 反应条件设置

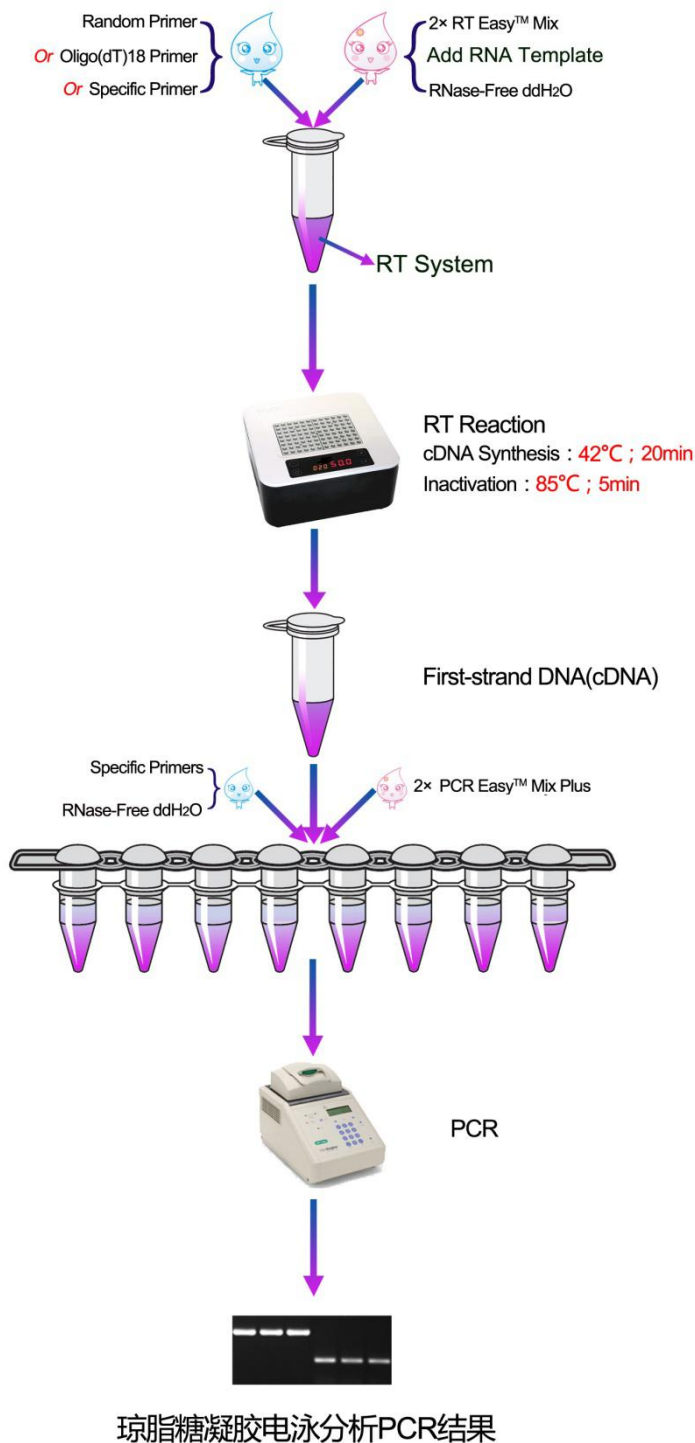
步 骤	温 度	时 间	循环数	内 容
1	94℃	5min	1	预变性
2	94℃	10sec	30-40	变性
3	55-65℃	20sec		退火
4	72℃	Xmin (2kb/min) ^{1*}		延伸
5	72℃	5min	1	终延伸

1*: 根据扩增的目的片段长度设定具体的时间，Foregene Taq DNA Polymerase 的扩增速度为 2kb/min。

注意：PCR 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，建议第一步逆转录的反应温度使用 50℃。在具体操作中，需要根据目的片段大小、扩增片段的碱基序列和引物的 GC 含量及长短等具体情况来设计最佳的反应条件，包括退火温度，延伸时间等。

RT-PCR 操作示意图

RT-PCR(Two Step)



问题分析指南

以下针对 RT-PCR Easy 系列试剂盒实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。

RT-PCR 未出现目的片段

1. 模板 RNA 被降解

建议：使用新鲜样品提取，应用高质量高纯的 RNA(建议使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列提取纯化 RNA)；-80℃储存的 RNA 应避免反复冻融。

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；或使用 Foregene Total RNA Isolation Kit 系列提取纯化 RNA。

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。

出现引物二聚体或非特异性扩增

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. Mg²⁺浓度不适合。

建议：我们提供的 Mix 中 Mg²⁺浓度为 3.5 mM。但针对有些特殊引物和模板可能需要较高浓度的 Mg²⁺，因此可直接添加 MgCl₂ 进行 Mg²⁺浓度的优化，建议每次增加 0.5mM 的 Mg²⁺进行优化。

3. PCR 退火温度过低。

建议：对引物做梯度 PCR，选择合适的退火温度。

4. PCR 产物太长。

建议：荧光定量 PCR 产物长度最好在 100-300bp 之间。

5. 引物出现降解，引物降解会导致非特异性扩增出现。

建议：可使用 SDS-PAGE 电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行实验。

6. PCR 体系不当，或体系太小。

建议：PCR 反应体系太小会导致检测精度降低。最好使用定量 PCR 仪推荐的反应体系重新进行实验。

7. PCR 循环数过多。

建议：适当降低 PCR 循环次数。

无扩增信号

1. RNA 模板中存在大量酶抑制因子。

建议：重新纯化模板或降低模板的使用量。

2. PCR 扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。

建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试降低退火温度，适当调整引物浓度等。

3. 模板用量问题，太少或过多。

建议：可进行模板线性化梯度稀释，选择 PCR 效果最好的模板浓度进行荧光定量实验。

负对照出现过高的荧光值

1. 在操作过程中导致的试剂污染。

建议：更换新的试剂进行 RT-PCR 实验。

2. PCR 反应体系配制时发生污染。

建议：操作时进行必要的防护措施，比如：戴乳胶手套，使用带滤芯的枪头等。

3. 引物出现降解，引物降解会导致非特异性扩增出现。

建议：可使用 SDS-PAGE 电泳检测引物是否降解，更换新的引物进行 RT-PCR 实验。

定量值重复性差

1. 仪器故障。

建议：PCR 仪的每一个 PCR 孔之间可能存在误差，在温度管理或检测时产生重现性较差现象。请根据相应仪器的说明书进行检测。

2. 样品纯度不好。

建议：样品不纯会导致实验的重复性较差，这包括模板、引物的纯度。最好进行模板的再纯化，引物最好使用 SDS-PAGE 纯化。

3. PCR 体系配制放置时间过长。

建议：RT-PCR 体系配制好后立即用于 PCR 实验，不要搁置太长时间；建议先设置到 PCR 程序后再进行 RT-PCR 体系配制。

4. PCR 扩增条件不适合、引物序列或者浓度不当。

建议：确认引物序列的正确性以及引物没有降解；扩增信号不好时，可尝试调整退火温度，适当调整引物浓度等。

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)

