

For research use only

Version Number : 2.0

RT Easy™ II (With gDNase)

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

试剂盒组成 (20 μL 体系)	RT-01031	RT-01032
	25 T	100 T
5× gDNase Mix	50 μL	200 μL
5× RO-Easy™ Mix	100 μL	400 μL
RNase-Free ddH ₂ O	1.7 mL	1.7 mL
说明书	1 份	1 份

产品简介

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℃，2 分钟快速去除 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℃，15 分钟即可完成第一链 cDNA 的合成。

该试剂盒的逆转录体系在 50℃ 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。

运输及储存条件

运输条件：全程低温冰盒运输，保证试剂盒处于<4℃ 状态。

保存条件：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

- ❖ 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℃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℃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℃。

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

操作指南

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	2 μL
Template (RNA)	X μL (Total RNA:<1 μg / mRNA:<0.1 μg)
RNase-Free ddH ₂ O	(8-X) μL
Total Volume	10 μL

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：RT 反应程序设置

步 骤	温 度	时 间	内 容
1	42℃	2 min	去gDNA反应
2	4℃	N/A	反应完成后置于4℃待用或-20℃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

1. 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)	10 μL
5× RO-Easy™ Mix	4 μL *
RNase-Free ddH ₂ O	6 μL
Total Volume	20 μL

- *: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。
2. 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 反应程序设置

步 骤	温 度	时 间	内 容
1	42℃	15 min	失活gDNase及cDNA合成
2	85℃	5 sec	失活逆转录酶
3	4℃	N/A	反应完成后置于4℃待用或-20℃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℃，其他 RNA 模板建议采用 42℃。
3. 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℃。

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。