

For research use only

Version Number : 2.0

## RT Easy™ II

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

| 试剂盒组成<br>(10 µL 体系)           | RT-01021 | RT-01022 | RT-01023   |
|-------------------------------|----------|----------|------------|
|                               | 50 T     | 200 T    | 800 T      |
| 2× RT OR-Easy™ Mix            | 0.25 mL  | 1 mL     | 1 mL × 4   |
| RNase-Free ddH <sub>2</sub> O | 1.7 mL   | 1.7 mL   | 1.7 mL × 3 |
| 说明书                           | 1 份      | 1 份      | 1 份        |

### 产品简介

本公司的 2× RT OR-Easy™ Mix 合成第一链 cDNA 的温度高达 50℃, 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 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 60%, 胍盐的最高耐受为 750 mM。即使不纯的 RNA 也可用福际 2× RT OR-Easy™ Mix 进行逆转录反应。

2× 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, 20 分钟即可完成第一链 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。

### 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：RT Easy™ II 保存于-20℃。产品收到后立即存放于-20℃恒温冰箱中。

### 试剂盒组分信息

2× 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)。

### 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 2× RT OR-Easy™ Mix 置于冰上使其完全融化, 轻弹混匀后使用; 体系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 Easy™ 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。

### 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: (0.1 pg-0.5 µg total RNA or 0.01 pg-0.05 µg mRNA) / 10 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 2× 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 ddH<sub>2</sub>O 融化后置于冰浴上待用。

B：RT 体系配制

2× 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 10 μL，则取 5 μL 2× RT OR-Easy™ Mix 溶液)，加入 RNA 模板，并加 RNase-Free ddH<sub>2</sub>O 补足体积 10 μL。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 OR-Easy™ Mix            | 5 μL                                           |
| Template (RNA)                | X μL (Total RNA : < 0.5 μg / mRNA : < 0.05 μg) |
| RNase-Free ddH <sub>2</sub> O | (5-X) μL                                       |
| Total Volume                  | 10 μL                                          |

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 2)。
- 注意：为了保证 2× 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 42℃、50℃或 65℃，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。
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-80℃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℃ | 15 min | 逆转录 |
| 2   | 85℃ | 5 min  | 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。通常第一步反应温度建议采用 42℃；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℃或 65℃。