

## 操作说明书

# Eastep<sup>®</sup> RT Master Mix Kit

## Eastep<sup>®</sup> 反转录预混液试剂盒

适用产品目录号：

LS2050, LS2052, LS2054

**产品描述：** Eastep<sup>®</sup> RT Master Mix 是用于从 Total RNA 或 Poly(A+) RNA 合成第一链 cDNA 的预混液反转录试剂。主要成分包括 M-MLV、MgCl<sub>2</sub>、dNTP、Oligo(dT)<sub>15</sub> Primers、Random Primers、RNase inhibitor、5 x gDNA Remover Mix 和反应缓冲液，只需添加模板 RNA 和无核酸酶水即可开始反应。试剂盒中提供的 5 x gDNA Remover Mix 能有效去除 RNA 模板中的 gDNA 污染。LS2054 包装中额外提供的 No-RT Control 组分用于验证反转录体系是否有 gDNA 污染。

Eastep<sup>®</sup> RT Master Mix 适用于动物、植物及微生物的 RNA 的反转录反应。试剂有良好的兼容性，可与市场上广泛的染料法和探针法 Real-Time PCR 试剂配合使用。与 Eastep<sup>®</sup> qPCR Master Mix (LS2062/LS2068) 共同使用，可进行高性能的基因表达分析。

产品	目录号	反应次数	
		10ul 反应体系	20ul 反应体系
Eastep <sup>®</sup> RT Master Mix Kit (5x)	LS2050	50 次	25 次
	LS2052	200 次	100 次
Eastep <sup>®</sup> RT Master Mix Kit (5x), with No-RT Control	LS2054	200 次	100 次

### 产品组分表

产品目录号	LS2050	LS2052	LS2054
<b>组分名称</b>	<b>体积</b>	<b>体积</b>	<b>体积</b>
Eastep <sup>®</sup> RT Master Mix (5x)	100μl	400μl	400μl
Nuclease-free water	1.5ml	1.5ml × 2	1.5ml × 2
5xgDNA Remover Mix	50μl	200μl	200μl
DNase Stop Solution	500μl	500μl	500μl
No-RT Control	/	/	100μl

### 储存条件

-20°C 保存。如使用频繁，可于 4°C 保存不超过 3 个月。避免反复冻融。

### 操作步骤

#### 注意事项：

如果您后续进行 qPCR 实验，建议 20ul 反应体系加入不超过 1ug 的 Total RNA；如果已知目的基因表达量非常低，则建议最多可加入 5ug Total RNA；但通常建议避免加入过多 RNA 模板，因为这可能会导致后续的 qPCR 反应超出线性范围。对于其他后续的应用目的，如果需要合成大量 cDNA，可酌情调整反应体系中 RNA 用量和反应条件，这需要用户通过预实验来确认。

#### 实验前准备：

使用前先将所有组分提前融化，将 Eastep<sup>®</sup> RT Master Mix (5X)，5xgDNA Remover Mix，DNase Stop Solution 分别混匀离心收集试剂至管底，放置冰上待用。如不进行 gDNA 去除的操作，则只融化 Eastep<sup>®</sup> RT Master Mix (5X) 和 Nuclease-free water。

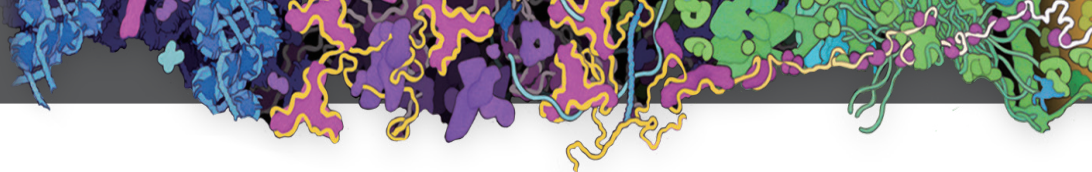
### 1. 去除 RNA 样本中的 gDNA (可选步骤)

**注意：**如用户在 Total RNA 提取过程中已使用 DNase I 去除了 gDNA 污染，可直接跳过此步骤，从反转录反应体系配制开始（实验步骤 2）。

- RNA 样本的 gDNA 污染去除反应体系配制，见右侧表 1。用户可根据自身的实验需求按比例扩大反应体系。
- 将配制好的反应液轻轻混匀后，在 37°C 条件下孵育 2 分钟。反应结束后加入 1μl 的 DNase Stop Solution 终止 DNase 反应，混匀后放置冰上备用，准备反转录反应体系配制。

表 1.

组分	体积 /μl
5xgDNA Remover Mix	1μl
RNA 模板	≤1μg
Nuclease-free water	加水至 5μl



## 2. 反转录反应体系配制

### ① 反转录体系配制, 见表 2

注意:

- 请在冰上配制反应体系。
- 实验过程中需佩戴一次性手套和口罩, 使用无 RNA 酶和无 DNA 酶的管子, 以防止 RNA 酶的污染。

### ② 反转录对照体系配制, 见表 3 (仅 LS2054 适用)

在配制反转录体系的同时, 按照表 3 配制 No-RT Control 反应体系。No-RT Control 体系中不含反转录酶, 若 No-RT Control 反应体系在下游 PCR 中有扩增, 则表明反转录体系内存在 gDNA 污染。

配制好反应体系后轻柔混匀, 置于冰上备用。

表 2.

组分	10ul 反应体系	20ul 反应体系
Eastep® RT Master Mix (5×)	2µl	4µl
RNA 模板	≤1µg	≤1µg
Nuclease-free water	加水至 10µl	加水至 20µl

表 3.

组分	10ul 反应体系	20ul 反应体系
No-RT Control	2 ul	4ul
RNA 模板	≤1ug	≤1ug
Nuclease -free water	加水至 10µl	加水至 20µl

## 3. 反转录程序设置

反转录程序设置建议, 见表 4

注意:

- 本产品最适反转录温度为 37°C, 如有需要, 可设置为 42°C。
- 如反转录产物用于基因克隆, 建议延长反转录时间至 1 小时。
- 反转录后立刻进行下游应用, 85°C 5 秒的条件足够失活体系中的反转录酶, 不会对后续的 qPCR 检测产生影响; 如果反转录产物需要冻存以待后用, 建议使用更严格的失活条件 (5 分钟), 以确保反转录酶被充分失活。
- 反转录产物可在 -20°C 保存, 并在半年内使用。长期保存建议分装后于 -70°C 保存。避免反复冻融。

表 4.

温度	反应时间
37 °C	15 分钟 (反转录反应)
85 °C	5 秒 (反转录酶失活)
4 °C	Hold

## 4. 下游应用

### ① 实时定量 qPCR 操作建议

- 推荐使用 Eastep® qPCR Master Mix (目录号 LS2062 系列产品) 或 GoTaq® qPCR Master Mix (目录号 A6000 系列产品) 进行下游的 qPCR 反应来获得最佳效果, 也可搭配市场上其他常用 qPCR 产品。
- 如 RT 产物浓度较高, 为了获得好的 qPCR 扩增曲线, 建议用户用 Nuclease -free water 稀释 cDNA 产物, 然后再进行 qPCR。
- 稀释样品时, 可根据预估的待测基因表达量选择合适的稀释倍数。
- 第一链 cDNA 产物用作 qPCR 反应的模板时, 建议体积不超过 qPCR 反应总体积的 1/10。
- 更多相关信息请参考 Eastep® qPCR Master Mix 或 GoTaq® qPCR Master Mix 操作手册。

### ② 终点法 PCR

- 本产品产物可以作为终点法 PCR 扩增的模板用于下游的基因检测。RT 产物无需稀释可直接用于 PCR 反应体系配制。
- 在进行常规 PCR 扩增获取全长的基因克隆中, 通过调整优化 MgCl<sub>2</sub>、dNTP、引物以及缓冲液等浓度来消除反转录产品对后续 PCR 扩增的影响, 其上样量可达到 PCR 反应体积的 25%。
- 如果您的实验选择预混液类型的 PCR 产品, 我们推荐 GoTaq® Master Mix (目录号 M7122 系列产品), 也可搭配市场上其他常用 PCR 产品。

#### 订购电话及技术支持请联系

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司  
北京市东城区北三环东路环球贸易中心 B 座 907

#### 产品生产厂商

上海普洛麦格生物产品有限公司

版本号 V3.0

#### 技术支持请联系

电话: 400 8108133  
邮箱: chinatechserv@promega.com

授权经销商  
联系方式



关注 Promega  
生命科学

