



# **GeneCreate RT OneStep Mix for qRCR with dsDNase (100T)**

**Catalog#JKR23014-100T**

Sufficient reagents for 100T Reverse transcription assays per kit.

Store at -20°C

# 目录

一、产品简介	02
二、产品组成	02
三、质量控制	02
四、使用方法	03
五、注意事项	03
六、常见问题	04



## 一、产品简介

本产品是一款高效、快捷的cDNA一链合成预混液，包含所有一链cDNA合成反应所需组分（GeneCreate Revertase及其反应Buffer、RNA酶抑制剂、dNTPs，Oligo(dT)<sub>20</sub> VN和随机引物等），反应中仅需加入RNA模板和水。

预混液中的GeneCreate Revertase是基于M-MLV开发的更高效逆转录酶，降低了RNase H活性，提高了热稳定性，反应温度高达55°C，大幅提升了逆转录效率和对复杂模板（大量二级结构或高GC比例）的耐受性，具有更高的特异性。

通过 Realtime PCR进行基因表达分析时，cDNA 的检测非常重要。但是用过柱纯化式的RNA抽提试剂盒纯化的Total RNA中经常会混入微量的gDNA。而当检测目的基因中存在假基因或无法在横跨内含子的位置上设计引物时，混入的gDNA会被当作模板扩增，影响准确的定量。本产品中GeneCreate dsDNase，可彻底去除RNA模板中残留的基因组DNA，使定量结果更加准确；同时其具有热敏感性，可在高温条件下快速不可逆地失活。因此仅需一次加样，即可同管进行去除基因DNA 污染与逆转录反应。

## 二、产品组成

产品名称	规格 (100T)	保存条件
RT OneStep Mix	400 μL	-20°C
dsDNase	100 μL	-20°C
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	2 mL	-20°C

## 三、质量控制

### 1. 核酸内切酶残留检测

将本产品与超螺旋质粒DNA在37°C温育4 h，通过琼脂糖凝胶电泳检测质粒无变化。

## 2. 核酸外切酶残留检测

将本产品与双链DNA底物在37°C温育16 h, 通过琼脂糖凝胶电泳检测双链DNA底物无变化。

## 四、使用方法

### 第一链cDNA合成

试剂	加入量
RT OneStep Mix	4 $\mu$ L
dsDNase	1 $\mu$ L
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	To 20 $\mu$ L
RNA模板	50 ng-1 $\mu$ g

注: 推荐使用试剂盒提取的高质量RNA作为模板。

1. 于冰上加入以上反应组分;
2. 轻柔吸打混匀, 瞬离;
3. 37°C温育2 min, 以去除基因组DNA污染;
4. 55°C温育15 min;
5. 反应结束后, 85°C温育5 min以终止反应;
6. 迅速将获得的cDNA置于冰上, 用于后续实验或立即保存于-20°C。

## 五、注意事项

1. 使用RT OneStep Mix时, 请充分融解, 混匀后使用, 避免强光直射。若同时需要配制多个RT OneStep Mix反应时, 应提前配制好所需的工作液, 然后再分装到每个反应管, 减少试剂损失。

2. 分取之前请瞬时离心收集到管底后使用, 使用后立即放回-20°C冰箱保存。
3. 反应液的配制和分装一定使用无污染枪头、Microtube, 尽量避免污染。
4. 预混液中已经包含Oligo(dT)<sub>20</sub>VN和随机引物, 不仅适用包含Poly(A)结构的真核生物mRNA, 也适用于不含Poly(A)结构的原核生物RNA、真核生物rRNA和tRNA等模板, 但不适用于miRNA等小RNA模板。

## 六、常见问题

现象	原因	解决方法
qPCR检测无信号或者信号出现延迟	RNA的量过多或过少	经确认, 使用本产品时, 添加50ng-1 μg范围的RNA
	RNA被降解	量(10 μL反应体系)都能够进行稳定有效的逆转录反应。但是由于RNA的种类和品质等的不同, 可以进行反应的RNA量可能会有所改变。请适当增减模板RNA的添加量。
	RNA的纯度较低	RNA可能是被混入的RNase降解。请重新配制RNA。此外, 低浓度的RNA保存时, 除更容易被RNase降解外, 由于被反应容器吸附, 实际的RNA的量会有所减少。建议避免把使用过的低浓度RNA冻结保存后再使用, 最好每次使用时直接从高浓度的保存液稀释。
	RNA容易形成高级结构	可能是由于配制RNA时残留的杂质抑制了逆转录反应, 建议重新提纯模板RNA。
	反应温度不当	RNA容易形成高级结构的情况下, 会抑制逆转录反应。建议在逆转录反应前, 将RNA在65°C条件下热变性5min, 然后急速在冰上冷却后再使用。
	逆转录反应液的	改变反应条件会对引物的退火效率、酶的活性、逆转录后的酶失活、模板RNA的清除效率等多方面产生影响。在进行实验时, 请务必按照本使用说明书上记载的条件来设定反应温度。
	添加量过多	逆转录反应液添加量过多会抑制PCR反应, 因此添加到PCR反应液中的逆转录反应液最好能控制在10%以下。

现象	原因	解决方法
用 no - RT Control 的反应液进行 qPCR 时可确认到扩增	RNA 中混入了过量的基因组 DNA	经确认, 使用本产品可最多去除约 50ng 的基因组 DNA (10 $\mu$ l 反应体系)。但模板 RNA 中混入过量 DNA 时, 也有可能不能完全去除干净。请另外再进行 DNase I 处理, 再次纯化模板 RNA。
	产生了引物二聚体	融解曲线分析时, no-template control 在目的片段的低温侧出现峰值, 疑似有引物二聚体产生。除引物序列外, 引物二聚体因引物质量不好而产生。此时应先再次摸索 PCR 反应条件, 如果仍无法改善, 则可进行引物再设计或再合成。再次合成时, 纯化级别应在 HPLC 以上。



## 武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：[marketing@genecreate.com](mailto:marketing@genecreate.com)

网址：[www.genecreate.cn](http://www.genecreate.cn)

