

一管化 RT Mix with DNase

1 产品基本信息

产品名称（中文）：一管化 RT Mix with DNase

产品名称（英文）：All-in-One RT Mix with DNase

产品编号：MF1801

2 规格或纯度

20 μL \times 20 T, 20 μL \times 100 T

组分	20 μL \times 20 T	20 μL \times 100 T
A. 5 \times RT All-in-One Mix	80 μL	2 \times 200 μL
B. DNase（脱氧核糖核酸酶）	20 μL	100 μL
C. RNase-Free Water（无 RNA 酶水）	400 μL	2 \times 1 mL

注：5 \times RT All-in-One Mix 包含逆转录酶、RNA 酶抑制剂、dNTPs（脱氧核苷三磷酸）、Oligo (dT)₂₀VN 和随机引物等。

3 产品介绍

产品简介：

本产品构建了便捷的 RNA 合成 cDNA 系统，集成了第一链 cDNA 合成所需全套试剂，仅需添加 RNA 模板与水，即可启动逆转录反应，操作流程简单高效。合成的 cDNA 主要用于 qPCR 反应。

该预混液采用高效热敏感 DNase，高温下迅速不可逆失活，因此仅需一次加样便能在同一管内完成基因组 DNA 污染去除和逆转录反应。相较传统 DNase I 使用方法，无需额外添加 EDTA 失活，既降低了对 RNA 模板的损害和 RNase 污染风险，又有效节省了实验时间。

产品特点：

- 迅速高效：特制高效 DNase，反转速度快，15 min 内最长可获得 12 kb 大小的 cDNA；
- 操作简便：含有第一链 cDNA 合成所需的全部试剂、仅需一次加样且“一管化”操作。

适用范围：

转录组研究

4 储存与运输

储存条件：-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存，避免反复冻融，以保证试剂活性。

运输条件：冰袋运输，确保运输过程中温度维持在低温环境，防止试剂变质。

5 使用方法（仅供参考）

反应体系配制：在冰上配制 20 μL 反应体系，各组分添加体积与要求如下

反应组分	体积 / 用量
5 \times RT All-in-One Mix	4 μL
DNase	1 μL
模板 RNA	50 ng~1 μg （推荐使用高质量 RNA，避免降解或杂质污染）
RNase-Free Water	加至 20 μL （补足体系体积）

操作步骤

(1) 按照上述表格在冰上依次添加各反应组分，避免在室温下长时间放置试剂，防止 RNA 酶污染或试剂活性降低。

(2) 轻柔混匀各组分后，进行瞬时离心（短时间高速离心），使管内液体集中在管底，避免管壁残留导致反应体系不均。

(3) 将离心后的反应管放入 PCR 仪，按照以下条件设置反应程序：

- 第一步：37 °C 孵育 2 min，目的是去除基因组 DNA 污染，避免其对后续 cDNA 合成与 qPCR 结果产生干扰。
- 第二步：55 °C 孵育 15 min，启动逆转录反应，合成第一链 cDNA。
- 第三步：85 °C 孵育 5 min，使热敏感 DNase 不可逆失活，同时终止逆转录反应，防止其对后续实验造成影响。

(4) 反应结束后，将获得的 cDNA 产物立即保存于 -20 °C 长期储存；若需马上进行后续 qPCR 实验，可暂放于冰上短期保存。

6 常见问题

Q1： 逆转录产物无条带或条带很弱，是什么原因？如何解决？

答：

- RNA 模板质量不佳：存在 RNA 降解（如操作过程中未严格防 RNase 污染）或纯度不够（如残留蛋白、EDTA、酚等杂质），影响逆转录酶活性与反应效率。解决方法：重新提取高质量 RNA，提取过程中严格使用 RNase-Free 耗材与试剂，纯化后检测 RNA 完整性（如琼脂糖凝胶电泳）与纯度（如 Nanodrop 检测 OD 值）。
- 引物设计不合理：预混液中的 Oligo (dT)₂₀VN 或随机引物无法有效结合 RNA 模板（如模板结构特殊或引物与模板存在错配）。解决方法：根据 RNA 模板类型优化引物，若为特殊结构 RNA，可尝试设计特异性引物替代预混液中的通用引物。
- 逆转录酶活性降低或失活：试剂储存不当（如反复冻融、储存温度不符合要求）导致逆转录酶活性下降。解决方法：更换新的 All-in-One RT Mix with DNase 试剂，严格按照 -20 °C 保存要求储存，避免反复冻融。
- 反应体系添加错误或量不足：如漏加某一组分（如 DNase、5× RT All-in-One Mix）或模板 RNA 用量过少。解决方法：重新核对反应体系配方，确保各组分添加完整且用量符合要求，推荐按照说明书推荐的 50 ng~1 μg 范围添加模板 RNA。

Q2： 逆转录产物出现非特异性条带，该如何处理？

答：

- 引物特异性差：预混液中的通用引物（Oligo (dT)₂₀VN 或随机引物）与 RNA 模板中的非目的基因序列结合，导致非特异性逆转录。解决方法：重新设计特异性更高的引物（如基因特异性引物），替换预混液中的通用引物，减少非特异性结合。
- 模板中存在杂质或基因组 DNA 污染：即使经过 37 °C DNase 处理，若模板初始基因组 DNA 污染严重或 DNase 活性不足，仍可能残留基因组 DNA，后续 PCR 扩增时会产生非特异性条带。解决方法：对 RNA 模板进行二次 DNase I 处理（选择非热敏感 DNase，处理后用 EDTA 失活并纯化 RNA），或在 qPCR 实验中设计跨内含子的引物，区分 cDNA 与基因组 DNA 扩增产物。
- PCR 扩增条件过于宽松：后续 qPCR 反应中退火温度过低、循环次数过多，导致非特异性扩增。解决方法：优化 PCR 扩增条件，如适当提高退火温度（根据引物 T_m 值调整）、减少循环次数（如从 40 次循环减少至 35 次），同时设置阴性对照（如无模板对照）排除污染干扰。

7 注意事项

- RNA 模板的纯度和完整性是逆转录反应成功的关键。在逆转录操作中，若模板中混杂易导致 RNA 降解的杂质（如蛋白、EDTA、酚等），会抑制逆转录酶活性，进而影响逆转录效果，需严格控制 RNA 模板质量。

- 后续 qPCR 实验中，逆转录产物的加量应不超过 qPCR 体系终体积的 1/10。若加量过多，会导致体系中残留的逆转录试剂（如 DNase、dNTPs）干扰 qPCR 反应，影响定量准确性。
- 本产品的预混液不适用于 miRNA 等小 RNA 模板。miRNA 长度较短（通常 20~24 nt），预混液中的 Oligo (dT)₂₀VN 和随机引物无法有效结合，需选择专门针对小 RNA 的逆转录试剂盒。
- cDNA 产物仅适用于 qPCR 反应，不适用于克隆等下游实验的长片段 PCR 扩增。若需进行长片段扩增或克隆，需选择具备高保真度且适用于长片段合成的逆转录试剂盒。
- 本产品仅限于科研用途，不得用于临床诊断或其他非科研领域，且不得存放于普通住宅内，需存放在实验室专用试剂储存区。
- 为了您的安全和健康，操作过程中请遵循所在实验室的常规安全规范，如佩戴一次性手套、护目镜，避免试剂接触皮肤与黏膜，若不慎接触，需立即用大量清水冲洗。