

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 μ L×20 T, 20 μ L×100 T

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

注：5× 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 °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 μ L 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× RT All-in-One Mix	4 μ L
DNase	1 μ L
模板 RNA	50 ng~1 μ g (推荐使用高质量 RNA，避免降解或杂质污染)
RNase-Free Water	加至 20 μ L (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 Tm 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。