

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1	规格-2
		20 RXN	100 RXN
10X ABScript II Enzyme Mix	RM21451	40 µL	200 µL
2X ABScript II Reaction Mix	RM21450	200 µL	1 mL
Oligo d(T) ₂₃ VN * (50 µM) **	RM20115	40 µL	200 µL
Random Primer Mix (60 µM) **	RM20116	40 µL	200 µL
dNTPs (10 mM each)	RM20120	30 µL	100 µL
Nuclease-free H ₂ O	RM20214	1.25 mL	1.25 mL

*注: V=A, G or C; N=A, G, C or T。

**注: 包含 1 mM dNTPs。

产品说明

ABScript II cDNA First Strand Synthesis Kit 包含 ABScript II Enzyme Mix 和 ABScript II Reaction Mix 两种经过优化的 Mix。其中 ABScript II Enzyme Mix 包含了 ABScript II 逆转录酶和 RNase 抑制剂, 而 ABScript II Reaction Mix 含有优化的反应 Buffer。ABScript II 逆转录酶是一种重组 M-MuLV 逆转录酶, 拥有较低的 RNase H 活性同时兼具增强的热稳定性。与野生型 M-MuLV 相比, 重组 M-MuLV 逆转录酶可以在更高的温度下合成第一链 cDNA。该酶在高达 48°C 时仍具有活性, 特异性 cDNA 产量更高。该试剂盒提供两种逆转录引物。Oligo-dT 引物[d(T)₂₃VN]迫使引物退火至 Poly(A) 尾的起始处。优化的 Random Primer Mix 特异性较低, 因此所有 RNA, 包括 mRNA、rRNA、tRNA 均可作为逆转录模板。本试剂盒可合成长达 10 kb 的 cDNA。

保存温度

-20°C 保存

第一链 cDNA 合成反应

1. RNA 和引物在 65-70°C 变性 5 min 可以去除阻碍 cDNA 合成的二级结构, 但在许多情况下可省略此步骤。
2. 为获得最大产量和长度的 cDNA, 建议在 42°C 孵育 1 hr。

第一链 cDNA 合成方案

实验开始前在冰上融解各组分并振荡混匀。

简易流程

1. 混合以下组分, 42°C 孵育 1 hr。如果使用 Random Primer Mix, 建议在 42°C 反应前先于 25°C 孵育 5 min。

组分	加入量
RNA 模板	Up to 1 µg
Oligo d(T) ₂₃ VN (50 µM) *	2 µL
10 mM dNTPs	1 µL
2X ABScript II Reaction Mix	10 µL
10X ABScript II Enzyme Mix	2 µL
Nuclease-free H ₂ O	Up to 20 µL

*注: 根据不同的实验需求, 可按照推荐的引物浓度添加引物: Oligo d(T)₂₃VN (5 µM)、随机引物 (6 µM)、特异性引物 (0.1-1 µM)。

2. 80°C 加热 5 min 使酶失活。对于下游 PCR 应用, cDNA 加入体积不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

标准操作

注：如果需要变性 RNA 模板，请使用以下方案。标准操作有助于打开复杂 RNA 模板的二级结构，提高反转录效率、增加 cDNA 产物。

1. 在无 RNase 的 PCR 管中加入 RNA 模板和 Oligo d(T)₂₃VN 引物。

组分	加入量
RNA 模板	1-5 μL (Up to 1 μg)
Oligo d(T) ₂₃ VN (50 μM) *	2 μL
10 mM dNTPs	1 μL
Nuclease-free H ₂ O	Up to 8 μL

***注：根据不同的实验需求，可按照推荐的引物浓度添加引物：Oligo d(T)₂₃VN (5 μM)、随机引物 (6 μM)、特异性引物 (0.1-1 μM)。**

2. 65°C 孵育 5 min，使 RNA 模板/Oligo d(T)₂₃VN 变性。短暂离心并迅速置于冰上。

3. 向上述 PCR 管中加入以下组分：

组分	加入量
2X ABScript II Reaction Mix	10 μL
10X ABScript II Enzyme Mix	2 μL

4. 混匀后，42°C 孵育 1 hr。如果使用 Random Primer Mix，建议 42°C 反应前先于 25°C 孵育 5 min。

5. 80°C 加热 5 min 使酶失活，cDNA 储存在 -20°C。对于下游 PCR 应用，cDNA 加入体积不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

无 RT 阴性对照反应（可选）

混合以下组分，在 42°C 下孵育 1 hr。

组分	加入量
RNA 模板	Up to 1 μg
Oligo d(T) ₂₃ VN (50 μM)	2 μL
10 mM dNTPs	1 μL
2X ABScript II Reaction Mix	10 μL
Nuclease-free H ₂ O	Up to 20 μL