

产品组分

组分名称	组分编号	100 RXN
10X ABScript II Enzyme Mix	RM21451	200 μ L
2X ABScript II Reaction Mix	RM21450	1 mL
Oligo d(T) ₂₃ VN * (50 μ M) **	RM20115	200 μ L
Random Primer Mix (60 μ M) **	RM20116	200 μ L
dNTPs (10 mM each)	RM20120	100 μ L
Nuclease-free H ₂ O	RM20214	1.25 mL
20X gDNA Remover Mix	RM21479	50 μ L

*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 with gDNA Remover 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。

本产品中 20X gDNA Remover Mix, 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。具有热敏感性, 可在高温条件下快速不可逆地失活。

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。

后续实验为 PCR

1. RNA 模板变性 (可选步骤)

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。

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

组分	加入量
RNA 模板	Up to 1 μ g
Nuclease-free H ₂ O	Up to 4.5 μ L

65°C 孵育 5 min, 短暂离心并迅速置于冰上, 并在冰上静置 2 min。

2. 基因组 DNA 去除

组分	加入量
上一步混合液	4.5 μL
20X gDNA Remover Mix	0.5 μL

用移液器轻轻吹打混匀。42°C 2 min。

3. 配制第一链 cDNA 合成反应液

组分	加入量
上一步混合液	5 μL
Oligo d(T) ₂₃ VN (50 μM) *	2 μL
2X ABScript II Reaction Mix	10 μL
10X ABScript II Enzyme Mix	2 μL
10 mM dNTPs	1 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)。**

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。

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。

后续实验为 qPCR

1. 基因组 DNA 去除

在 RNase-free 离心管中配制如下混合液

组分	加入量
RNA 模板	Up to 1 μg
20X gDNA Remover Mix	0.5 μL
Nuclease-free H ₂ O	Up to 5 μL

用移液器轻轻吹打混匀。42°C 2 min。

2. 配制第一链 cDNA 合成反应液

组分	加入量
上一步混合液	5 μL
Oligo d(T) ₂₃ VN (50 μM) *	2 μL
2X ABScript II Reaction Mix	10 μL
10X ABScript II Enzyme Mix	2 μL
10 mM dNTPs	1 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)。**

混匀后，42°C 孵育 30 min。如果使用 Random Primer Mix，建议 42°C 反应前先于 25°C 孵育 5 min。

80°C 加热 5 min 使酶失活，cDNA 储存在 -20°C。