## 产品组分

| 组分名称 | 组分目录号 | 定制规格 200,000 U |
|---|---|---|
| 5X First-Strand Reaction Buffer | RM20109 | 10 mL |
| 100 mM DTT | RM20117 | 5 mL |
| ABScript III Reverse Transcriptase | RM21402 | 1 mL |

## 产品说明

ABScript III Reverse Transcriptase 是经基因工程改造的 *M-MuLV* 反转录酶，降低了 RNase H 活性，提高了热稳定性，可以比野生型的 *M-MuLV* 在更高的温度下合成第一链 cDNA。本产品即使在 50-55°C 也有活性，具有更高的特异性、更高的产量且可以合成长达 12 kb 的 cDNA。

## 产品来源

编码突变的 *M-MuLV* Reverse Transcriptase (RNase H-) 基因在大肠杆菌中表达并经过多步纯化精制而成。

## 活性定义

1 活性单位（U）是指以 Poly(rA)•Oligo $d(T)_{18}$ 为模板的 50 μL 反应体系中，37°C 10 min 内将 1 nmol dTTP 掺入到酸不溶性物质所需的酶量。

## 酶储存液

20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 50% Glycerol, 0.01% IGEPAL® CA-630, pH 7.5 @ 25°C

## 保存条件

-20°C

## 反应条件

1X First-Strand Reaction Buffer, 10 mM DTT, 200 U ABScript III Reverse Transcriptase，补充终浓度 0.5 mM 的 dNTPs (自备) 和终浓度 5 μM 的 $d(T_{)23}VN$ (自备)，在 50°C 反应 1 hr。

如果使用随机引物，推荐在 50°C 反应前，先置于室温（25°C）孵育 5 min。

## 1X First-Strand Reaction Buffer 组成

50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl2, pH 8.3 @ 25°C

## 热失活

85°C，20min 失活。

## 质量控制

SDS-PAGE 检测蛋白纯度大于 95%。

无核酸外切酶、DNase 和 RNase 活性。

PCR 检测无宿主基因组残留。

## 操作说明

**1.第一链 cDNA 合成（简易流程）**

1.1 实验开始前冰上解冻各组分并振荡混匀。

1.2 按下表添加并混合各组分，50°C 孵育 1 hr。如果使用随机引物，建议在 50°C 反应前先将反应体系置于 25°C 反应 5 min。

1.3 在 85°C 加热 20 min 使酶失活。对于下游 PCR 应用，逆转录产物的加入体积不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

| 组分 | 反应体系 |
|---|---|
| ddH2O | Up to 20 μL |
| 5X First-Strand Buffer | 4 μL |
| RNA 模板 | Up to 1 μg* |
| 50 μM $d(T)_{23}VN$ 或 60 μM 随机引物 | 2 μL |
| 10 mM dNTPs | 1 μL |
| 100 mM DTT | 2 μL |
| RNase Inhibitor (40 U/μL) | 0.2 μL (8 U) |
| ABScript III Reverse Transcriptase** | 1 μL (200 U) |

*， 注：1 ng-1 μg 总 RNA 模板或 50 pg-100 ng Poly(A)-RNA。**，注： ABScript III Reverse Transcriptase 在 50-55°C 均有活性。

**2. 第一链 cDNA 合成（标准流程）**

2.1 如果需要变性模板 RNA，请使用以下方案。在无 RNase 的 PCR 管中加入 RNA 模板和 $d(T)_{23}VN$ 引物。

| 组分 | 反应体系 |
|---|---|
| RNA 模板 | Up to 1 μg* |
| 50 μM $d(T)_{23}VN$ 或 60 μM 随机引物 | 2 μL |
| 10 mM dNTPs | 1 μL |
| ddH2O | Up to 10 μL |

*，注：1 ng-1 μg 总 RNA 模板或 50 pg-100 ng Poly(A)-RNA。

2.2 将以上体系置于 65°C 下反应 5 min，使 RNA 模板/引物变性后短暂离心并迅速置于冰上。

2.3 然后向上述 PCR 管中加入以下组分：

| 组分 | 反应体系 |
|---|---|
| ddH2O | Up to 20 μL |
| 上一步变性的 RNA 模板/引物 | 10 μL |
| 5X First-Strand Buffer | 4 μL |
| 100 mM DTT | 2 μL |
| RNase Inhibitor (40 U/μL) | 0.2 μL |
| ABScript III Reverse Transcriptase | 1 μL |

**，注：ABScript III Reverse Transcriptase 在 50-55°C 均有活性。

2.4 混匀后，50°C**孵育 1 hr。如果使用 Random Primer Mix，建议在 50°C 反应前先将反应体系置于 25°C 反应 5 min。

2.5 85°C 加热 20 min 使酶失活，逆转录产物储存在-20°C。对于下游 PCR 应用，逆转录产物的加入体积不应超过 PCR 反应总体积的 1/10。

**3. 第一链 cDNA 合成（无 RT 阴性对照反应）**

3.1 混合下列各组分，在 50°C**下孵育 1 hr。

| 组分 | 反应体系 |
|---|---|
| ddH2O | Up to 20 μL |
| 5X First-Strand Buffer | 4 μL |
| RNA 模板 | Up to 1 μg* |
| 50 μM d(T)23VN 或 60 μM 随机引物 | 2 μL |
| 10 mM dNTPs | 1 μL |
| 100 mM DTT | 2 μL |
| RNase Inhibitor (40 U/μL) | 0.2 μL (8 U) |

*，注：1 ng-1 μg 总 RNA 模板或 50 pg-100 ng Poly(A)-RNA。**，注：ABScript III Reverse Transcriptase 在 50-55°C 均有活性。