

产品组分

组分名称	组分编号	规格-1 4000 U	规格-2 10000 U
ABScript GII Reverse Transcriptase (200,000 U/mL)	RM29500	20 µL	50 µL
5X Reverse Transcriptase Reaction Buffer	RM20842	500 µL	500 µL

产品说明

ABScript GII Reverse Transcriptase 是来源于细菌 II 型内含子编码的重组反转录酶，在 RNA 反转录合成 cDNA 过程中，展示出更强的热稳定性，以及抑制剂耐受能力。特别适用于长片段、含有复杂二级结构，以及含有抑制成分的 RNA 样品的反转录。ABScript GII Reverse Transcriptase 反转录酶提升了长转录本的 5' 端测序覆盖度，因此适用于 RNA-seq 应用，例如：RNA 直接测序、长片段 cDNA 测序。

产品来源

ABScript GII Reverse Transcriptase 是来源于细菌 II 型内含子编码的基因在大肠杆菌中表达并经过多步纯化精制而成。

酶活定义

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，55°C 10 min 内将 1 nmol dTTP 掺入到酸不溶性物质所需的酶量。

保存温度

-20°C

反应条件

Reverse Transcriptase Reaction Buffer, dNTPs, d(T)₂₃VN 或随机引物和酶，在 60°C 反应 0.5h。如果使用随机引物，推荐在 60°C 反应前，先置于室温 (25°C) 反应 5 min。

热失活

80°C 加热 10 min

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，60°C 孵育 0.5 h。如果使用随机引物，建议在 60°C 反应前先将反应体系置于 25°C 反应 5 min。

组分	反应体系
ddH ₂ O	Up to 20 µL
5X Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4 µL
RNA 模板	Up to 1 µg*
50 µM d(T) ₂₃ VN 或 60 µM 随机引物	1 µL
10 mM dNTPs	1 µL
RNase Inhibitor (40 U/µL)	0.2 µL (8 U)
ABScript GII Reverse Transcriptase**	0.5~1 µL (100~200 U)

*****，注：1 ng-1 µg 总 RNA 模板或 50 pg-100 ng Poly(A)-RNA。******，注：ABScript GII Reverse Transcriptase 在 50-65°C 均有活性。

1.3 在 80°C 加热 10 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。

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)₂₃VN 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	1 µL
10 mM dNTPs	1 µL
ddH ₂ O	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至少 1min。

2.3 然后向上述 PCR 管中加入以下组分：

组分	反应体系
ddH ₂ O	Up to 20 µL
上一步变性的 RNA 模板/引物 (step2.2)	2.1 中配制的体积 (µL)
5X Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4 µL
100 mM DTT	1 µL
RNase Inhibitor (40 U/µL)	1 µL
ABScript GII Reverse Transcriptase**	1 µL

******, 注: ABScript GII Reverse Transcriptase 在 50-65°C 均有活性。

2.4 混匀后，55°C 孵育 10 min。

2.5 80°C 加热 10 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 60°C 孵育 0.5 h。

组分	反应体系
ddH ₂ O	Up to 20 µL
5X Reverse Transcriptase Reaction Buffer	4 µL
RNA 模板	Up to 1 µg*
50 µM d(T) ₂₃ VN 或 60 µM 随机引物	1 µL
10 mM dNTPs	1 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。