

# ABScript II cDNA First Strand Synthesis Kit

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录号: RK20400

规格: 50 RXN / 100 RXN (20 µL/RXN)

## 1. 试剂盒介绍

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)<sub>23</sub>VN]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。

## 2. 试剂盒组成

试剂盒组成	目录号	规格	
		50 RXN	100 RXN
ABScript II Enzyme Mix (10X)	RM21451	100 µL	200 µL
ABScript II Reaction Mix (2X)	RM21450	600 µL	1.25 mL
Oligo d(T) <sub>23</sub> VN * (50 µM) **	RM20115	100 µL	200 µL
Random Primer Mix (60 µM)**	RM20116	100 µL	200 µL
dNTPs (10 mM each)	RM20120	50 µL	100 µL
Nuclease-free H <sub>2</sub> 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。

注: 将所有试剂储存在 -20°C。

## 3. 质量控制

使用 Jurkat 细胞总 RNA 和 d(T)<sub>23</sub>VN 引物在 RT 反应中测试 ABScript II 第一链 cDNA 合成试剂盒的性能。通过检测 9.2 kb

的原纤维蛋白基因扩增子来验证转录的 cDNA 长度。

## 4. 第一链 cDNA 合成反应

- 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。
- 为获得最大产量和长度的 cDNA, 建议在 42°C 孵育 1 hr。

## 5. 逆转录引物的选择

- Oligo-dT 引物是大多数应用的首选, 因为它可以确保合成的所有 cDNA 起始于 mRNA 的 3' 末端, 并获得最高产量的全长 cDNA。锚定 Oligo-dT 的引物[d(T)<sub>23</sub>VN]迫使引物退火至 Poly(A) 尾, 从而防止在 mRNA 内部位点进行逆转录<sup>(1)</sup>。
- Random Primer Mix 是优化的 d(N)<sub>6</sub> 引物 Mix。随机引物可以覆盖整个 RNA 模板, 包括 mRNA 和非多腺苷酸化的 RNA (如核糖体 RNA)。利用随机引物合成的 cDNA 较短, 可作为 qPCR 检测的模板。Random Primer Mix 在以各种 RNA 为模板的 cDNA 合成中均展现出良好的性能。
- 当用基因特异性引物合成 cDNA 时, 逆转录产物仅可用于扩增该转录本。在 RNA 投入量很低 (低于 10 ng) 并且仅需要一种特定的 cDNA 时, 推荐使用特异性引物。
- 推荐的引物浓度:

引物种类	Oligo d(T) <sub>23</sub> VN	随机引物	特异性引物
终浓度	5 µM	6 µM	0.1-1 µM

## 6. 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

- 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
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Up to 20 µL
RNA 模板	Up to 1 µg
d(T) <sub>23</sub> VN	2 µL
10 mM dNTPs	1 µL
ABScript II Reaction Mix (2X)	10 µL
ABScript II Enzyme Mix (10X)	2 µL
总体积	20 µL

- 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。

## 标准流程

如果需要变性 RNA 模板，请使用以下方案。

- 在无 RNase 的 PCR 管中加入 RNA 模板和 d(T)<sub>23</sub>VN 引物。

组分	加入量
RNA 模板	1-5 µL (Up to 1 µg)
d(T) <sub>23</sub> VN (50 µM)	2 µL
10 mM dNTPs	1 µL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Up to 8 µL
总体积	8 µL

- 在 65°C 使 RNA 模板/ d(T)<sub>23</sub>VN 变性 5 min。短暂离心并迅速置于冰上。
- 然后向上述 PCR 管中加入以下组分：

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

- 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。

## 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
d(T) <sub>23</sub> VN (50 µM)	2 µL
ABScript II Reaction Mix (2X)	10 µL
10 mM dNTPs	1 µL
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	Up to 20 µL
总体积	20 µL

## 7. cDNA 合成要点

- 高纯度完整的 RNA 对于 RT-PCR 的检测至关重要。
- 总 RNA 或 mRNA 都可用于逆转录反应，通常总 RNA 足以进行大多数 RT-PCR 分析。

## 8. 常见问题解答

### cDNA 产量低

- 通过变性琼脂糖凝胶电泳检查 RNA 的完整性<sup>(2)</sup>。
- RNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 比值应该大于 1.7。乙醇沉淀，然后用 70% 乙醇洗涤可以除去大多数污染物，例如 EDTA 和胍类。用氯化锂沉淀可以去除多糖<sup>(2)</sup>。
- 苯酚/氯仿提取和乙醇提取可以去除蛋白污染，如蛋白酶<sup>(2)</sup>。
- 一些靶 RNA 可能包含 RT 的强终止序列；这种情况下建议使用随机引物而不是 d(T)<sub>23</sub>VN。
- 使用足量的 RNA。

## 9. 参考文献

- Liao, J. and Gong, Z. (1997) *Biotechniques* 23, 368 - 370.
- Sambrook, J. and Russel, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (3rd ed.), (pp. 8.46 - 8.53 and 11.37 - 11.42). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.