

版本号: M16B01V1.0



ABScript III Reverse Transcriptase

TEL: 400-999-6126

WEB: www.abclonal.com.cn

目录: RK20408
规格: 4,000 U / 10,000 U
浓度: 200,000 U/mL
产品组成:

ABScript III Reverse Transcriptase (200,000 U/mL)	RM21402
5X First-Strand Reaction Buffer	RM20109
100 mM DTT (10X)	RM20117

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。

酶存储液

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

保存温度

-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)₂₃VN (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 加热 20 min

操作说明

➤ 第一链 cDNA 合成 (简易流程)

实验开始前冰上解冻各组分并振荡混匀。

- 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。

组分	加入量
ddH ₂ O	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。

- 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。

➤ 第一链 cDNA 合成 (标准流程)

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	加入量
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
ddH ₂ O	Up to 10 μL

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

- 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。
- 然后向上述 PCR 管中加入以下组分:

组分	加入量
ddH ₂ O	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

- 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。

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

- 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。

➤ 第一链 cDNA 合成 (无 RT 阴性对照反应)

混合下列各组分, 在 50°C**下孵育 1 hr。

组分	加入量
ddH ₂ O	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)

*, 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。

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。

其他相关产品

RK21401, RNase Inhibitor, Mammalian (40,000 U/mL)