

货号: R718

制品简介

本试剂盒采用加 A 法来进行 miRNA 第一链 cDNA 的反转录。具体过程是先通过 *E.coli Poly(A) Polymerase* 在 miRNA 3' 末端加多聚 A 尾 Poly(A), 再使用 *Oligo(dT)-Universal Tag* 通用逆转录引物进行逆转录反应, 最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链。

本试剂盒采用特殊优化预混合 miRNA RT Enzyme Mix 将 Poly(A)加尾和反转录合并为一步完成, 简化了操作步骤并提高了 Poly(A)加尾和逆转录效率。该试剂盒具有可从 20 pg-2 µg 的 Total RNA 中有效制备 miRNA 对应的 cDNA 第一链。一次合成的 cDNA 可检测多个 microRNA, 节约了样品和成本。

本试剂盒中的 2×miRNA RT Reaction Buffer 包含了 miRNA 加 A 尾反应和反转录反应的所有原料和引物, 并经过精心优化, 可保证 miRNA 3' 末端的 Poly(A)修饰过程和逆转录过程同时高效进行。

注: 本试剂盒包含后续 qPCR 检测所需引物 miRNA qPCR 3' primer。

制品组成及包装量

组分	R718 25 rxn (20 µl/rxn)
miRNA RT Enzyme Mix	50 µl
2×miRNA RT Reaction Buffer	250 µl
miRNA qPCR 3' primer (10µM)	625 µl x2
RNase free H ₂ O	1 ml

储存条件

-20°C保存。

适用范围

miRNA 第一链 cDNA 合成。

操作步骤

1、反转录体系的配制

解冻 2×miRNA RT Reaction Buffer 并混匀, miRNA RT Enzyme Mix 放于冰中备用, 在 PCR 管中配制如下混合液至总体积 20 µl (最

后加入 miRNA RT Enzyme Mix)。

Total RNA*	X µl
2×miRNA RT Reaction Buffer	10 µl
miRNA RT Enzyme Mix	2 µl
RNase free H ₂ O	To 20 µl (补足到总体积 20 µl)

*反应中所使用的 Total RNA 必须含有 miRNA。此过程也可以使用富集的 miRNA 作为模板, 富集的 miRNA 无法直接用分光光度计定量, 建议直接加入 2-5 µl。可根据目的 miRNA 丰度决定加入量, 对于低丰度 miRNA 样品而言(如血清血浆提取物), 可直接加入最大体积 8 µl。

2、反转录程序

移液器轻轻混匀上述配制的反应液, 按下表程序进行 miRNA 的反转录反应:

反应温度	时间	说明
42°C	60 min	miRNA 加 A 尾反应和逆转录反应
85°C	5 s	酶失活反应

合成的 cDNA 反应液可放置于 -20°C 保存; 也可以直接进行下游荧光定量检测。在进行下游荧光定量检测时, 如果发现有非特异扩增条带, 或者融链曲线显示有非特异扩增, 往往提示 cDNA 模板过量, 可以尝试将上述 cDNA 模板稀释 10-1000 倍再使用。