

miRNA RT Kit

miRNA 反转录试剂盒

包装量:

目录编号	包装单位
154801	25次

组成	154801
<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	50U
10 × Poly(A) Polymerase Buffer	100 μl
10 × rATP solution	50 μl
25μmol RT primer	50 μl
HiFi H ⁺ RTase (200U/μl)	5000 U
5×RT Reaction Mix	200 μl
RNase free H ₂ O	1 ml

产品组成、储存: -20℃ 保存。

制品说明: miRNA 第一链合成试剂盒本试剂盒采用在 miRNA 3' 末端加多聚 A 尾 Poly(A), 再使用 Anchored 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。miRNA cDNA 第一链合成试剂盒包含 miRNA 3' 末端 Poly(A)修饰过程和逆转录过程的所有试剂, 该试剂盒具有高效的 Poly(A)修饰和逆转录效率, 可从 20pg-2μg 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。

注: 该试剂盒须与 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (154901) 配套使用。

操作步骤:

一、miRNA 3' 末端进行加Poly (A)处理

1. 在冰上预冷RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积20μl (最后加入*E.coli* Poly(A) Polymerase)

Components	Volumn	Final Concentration
Total RNA	x μl	Up to 2μg
<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	0.4 μl(见注意事项)	2U
10×Poly(A) Polymerase Buffer	2 μl	1 X
10×rATP solution	2 μl	1 X
RNase free H ₂ O to final volume	20 μl	

注意事项: *E.coli* Poly(A) Polymerase(5U/μl)非常粘稠和微量, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照0.3μl使用, 也不影响使用效果。

*在反应中使用的total RNA 必须含有小分子RNA。

*此过程也可以使用小分子RNA (建议加入量为2μl~4μl。请根据目的miRNA丰度决定加入量)。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液, 短暂离心后在37℃反应30-60 min。所得的Poly(A)反应液可以立即进行第一链合成, 也可以放置-20℃短暂保存。如需长期保存建议存放于-80℃。

二、加Poly (A)修饰后的miRNA 进行逆转录反应（第一链合成）

1. 按照下表组分冰上进行反应液的配制

Components	Volume
上述Poly(A) 反应液	2 -4μl
25μmol RT primer	2 μl
5×RT Reaction Mix	4 μl
HiFi H ⁺ RTase (200U/μl)	0.8-1μl (见注意事项)
RNase free H ₂ O to final volume	20 μl

注意事项：HiFi H⁺ RTase非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。
可以每次按照0.8μl使用，也不影响使用效果。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在42℃反应50min。
3. 70℃加热15 min失活HiFi H⁺ RTase。合成的cDNA反应液可放置于-20℃保存；也可以直接进行下游PCR或者荧光定量PCR检测。

注：按照上述操作步骤得到的cDNA模板用于下游PCR或者荧光定量PCR检测时，可以根据实际情况选择使用量，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， 可以将上述cDNA模板稀释几十到几百倍甚至上千倍再使用。