

miRNA 加尾法逆转录试剂盒

产品使用说明书 (Version 3.0)

产品名称: miRNA 加尾法逆转录试剂盒

英文名称: microRNA Reverse Transcription Kit

货号规格: UR32061 (50 Rxns×20 μL)

运输存储: 冰袋运输, -20°C存储。

产品描述:

本试剂盒采用 Poly(A)加尾反应和 cDNA 合成反应同步进行的方法来进行 microRNA 第一链 cDNA 的合成, 包含了与此配套的通用型 qPCR 反向引物 (Universal 3' qPCR Primer), 仅需自行设计一条目的 microRNA 的特异性正向引物, 就能够用于 microRNA 的定量检测。具体过程是: 先通过 Poly(A) Polymerase 在 microRNA 的 3' 末端加 Poly(A)尾, 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 microRNA 的 cDNA 第一链。

本试剂盒为包含去除基因组 DNA 的高效 DNase 的快速逆转录试剂盒, 主要含有 4 管试剂: gDNA Remover、miRNA RT Enzyme Mix、4 × miRNA RT Buffer、Universal 3' qPCR Primer。其中, gDNA Remover 中主要包括浓缩的 DNase 和 buffer, 仅需室温 (19 ~ 27°C) 反应 5 分钟, 就能降解 95% 以上的基因组 DNA, 极大地降低了残留基因组对结果的干扰。

miRNA RT Enzyme Mix 中主要包含了 Poly(A) Polymerase、逆转录酶、RNase Inhibitor。其中的 Poly(A) Polymerase 不但具有高效的加 Poly(A)尾效率, 还特异性识别成熟的单链 miRNA, 从而避免了具有双链结构的 miRNA 前体的逆转录反应; 逆转录酶采用新型 M-MLV 突变体逆转录酶, 具有很强的抗干扰能力及扩增能力, 扩增效率优异。

4×miRNA RT Buffer 包含了 miRNA 加 Poly(A)尾反应和逆转录反应的所有原料和引物, 包括 Oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物、buffer 和 dNTPs, 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。

产品组分:

组分	规格
gDNA Remover	55 μL
miRNA RT Enzyme Mix	110 μL
4× miRNA RT Buffer	275 μL
Universal 3' qPCR Primer (10 μM)	750 μL
U6 Primer (10 μM)	150 μL
Nuclease free ddH ₂ O	1 mL

产品使用:

使用前将各组分从冰箱中取出, 冰上融化, 上下颠倒 5 ~ 10 次使之充分混匀, 然后使用

Umibio Science and Technology Group

上海公司地址: 上海市浦东新区青黛路 800 号 绍兴公司地址: 浙江省绍兴市越城区天姥路 1 号
电话: 4006-166-973 021-60521508 QQ: 3423485078; 网址: www.umibio.cn

离心机短暂离心将管壁上附着的液体甩下来，置于冰上待用。

➤ 去除基因组DNA反应

- 1、用gDNA Remover处理RNA：取100 ng ~ 1 μg总RNA或者10 ng ~ 20 ng miRNA（一般建议用0.5 μg的总RNA），加入1 μL的gDNA Remover（如果RNA浓度较高，加入后体积少于5 μL，则需要加ddH₂O至5 μL），用移液器轻柔吹打5 ~ 10次混匀，室温（19 ~ 27℃）反应5分钟，置于冰上待用。

➤ 逆转录反应

- 2、按照如下体系配制加尾和逆转录同时反应体系：

成分	体积 (20 μL 体系)
gDNA Remover 处理过的 RNA	上述体积 (X μL)
4× miRNA RT Buffer	5 μL
miRNA RT Enzyme Mix	2 μL
Nuclease free ddH ₂ O	补足到 20 μL

- 3、按照上表加好试剂后，必须用移液器轻柔吹打10次充分混匀（注：移液器体积可调到18 μL进行吹打）。
- 4、逆转录反应程序：37℃反应15分钟，42℃反应10分钟，95℃反应3分钟，即可得到包含所有miRNA的cDNA第一链。
- 5、逆转录反应得到的cDNA可直接作为模板进行qPCR反应，或者稀释5 ~ 10倍后再使用（具体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定）；如果模板cDNA不稀释，一般20 μL qPCR反应体系建议使用0.4 μL的cDNA

（0.2 ~ 0.8 μL）；如果模板cDNA稀释5倍，一般20 μL qPCR反应体系建议使用2 μL的cDNA（1 ~ 4 μL）；如果模板cDNA稀释10倍，一般20 μL qPCR反应体系建议使用4 μL的cDNA（2 ~ 8 μL）。如不立即进行qPCR实验，建议将cDNA冻存于-80℃冰箱中。

microRNA 的 qPCR 上游引物的设计：

- 1、在microRNA数据库网站（例如miRBase，网址：<http://www.mirbase.org/>）上搜索得到目的microRNA成熟体序列。
- 2、复制目的microRNA序列，将其中的U改成T，然后去掉3' 端的最后6个碱基。
- 3、在5' 端加上3 ~ 6个碱基（目的是提高引物的T_m值，加入的序列以GC为主，例如CGGGC，GCGGGC，A/TGCCCG等），使上下游引物的T_m值相近，得到最终的正向引物序列。

常见的注意事项、操作要点及优化方法：

- 1、实验开始前首先验证qPCR引物是否适用，标准与上述标准类似，主要观察扩增曲线与熔解曲线；
- 2、引物验证后应该分装冻存，防止污染或降解；
- 3、microRNA的质量及cDNA的质量对qPCR的结果具有很大的影响，应尽量保证microRNA不降解。RNA提取后应尽快进行逆转录反应，避免反复冻融，或者多次逆转录反应。如果预计使用量较大，则可以一次多逆转录几管cDNA。如果条件允许，cDNA建议保存在-80℃冰箱。