

miRNA cDNA 第一链合成试剂盒

miRNA 1st strand cDNA synthesis kit

Code No. AG11716

包装量:	10 rxns / 10 μ l
保存温度:	-20 $^{\circ}$ C

产品概述

本制品是应用加 A 尾法进行 miRNA 第一链 cDNA 合成的试剂盒。先使用 Poly (A) Polymerase 在 miRNA 3' 末端加 A 尾, 再使用通用反转录引物【带有特定标签的 Oligo (dT) 引物】进行反转录反应, 最终生成 miRNA 的第一链 cDNA。该制品中 miRNA RT Enzyme Mix 包含加 A 尾酶和反转录酶, 2X miRNA RT Reaction Solution 含有通用反转录引物, 经过优化, 在同一反应体系中同时高效的完成加 A 尾和反转录反应, 简化了实验操作流程, 可减少试剂损失及实验误差。本制品适用于 Total RNA 或 Small RNA 等包含 miRNA 样品的反转录。本制品包含后续 qPCR 检测所需引物 miRNA qPCR 3' primer。

保存

保存温度: -20 $^{\circ}$ C

运输温度: 干冰运输或 -20 $^{\circ}$ C 冰袋运输

产品组成

miRNA RT Enzyme Mix ¹	12.5 μ l
2X miRNA RT Reaction Solution ²	50 μ l
miRNA qPCR 3' primer (10 μ M) ³	250 μ l
RNase free water	1 ml

*1: 含有 Poly (A) Polymerase、M-MLV RTase、RNase Inhibitor;

*2: 含有通用反转录引物;

*3: 用于 qPCR 反应, T_m 值为 59 $^{\circ}$ C。

实验操作

加 A 尾反应和第一链 cDNA 合成

反应体系的配制 (10 μ l)^{*3}

组分名称	用量 (μ l)
miRNA RT Enzyme Mix ¹	1.25 μ l
2X miRNA RT Reaction Solution	5 μ l
Total RNA ²	20 ng ~ 2 μ g
RNase free water	Up to 10 μ l

*1: miRNA RT Enzyme Mix 甘油浓度较高, 使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部, 减少损失, 并用移液枪轻轻吸打混匀, 过程中尽量避免起泡, 然后再进行使用。

*2: Total RNA 推荐用量: 20 ng ~ 2 μ g, 最多可加至 8 μ g。

*3: 所有反应混合液需要在冰上配制。

反应条件

37 $^{\circ}$ C ^{*1}	60 min
85 $^{\circ}$ C	5 min
4 $^{\circ}$ C	-

*1: 如模板比较复杂, 反转录效果不好时, 可尝试提高反转录温度至 42 $^{\circ}$ C。

注意:

1. 反转录完成后,合成的 cDNA 反应液可放置于 -20°C 保存;也可以直接进行荧光定量检测。
2. 在进行荧光定量检测时,建议将合成的 cDNA 稀释 10 倍,也可根据扩增情况,将合成的 cDNA 稀释倍数在 5 ~ 100 倍进行调整。

定量PCR反应

经上述反转录过程得到的 cDNA 进行定量 PCR 分析。以本公司 SYBR Green Premix *Pro Taq HS* qPCR Kit II (Code. AG11702) 为例,具体操作如下:

(以 ABI QuantStudio 5 或 Bio-Rad CFX 96 为例)

组分名称	反应终浓度	加入量
Template*1	-	2 μl
2X SYBR Green <i>Pro Taq HS</i> Premix II	1X	10 μl
miRNA-specific primer (10 μM) *2	0.4 μM	0.8 μl
miRNA qPCR 3' primer (10 μM)	0.4 μM	0.8 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ³	0.08 μM	0.4 μl
RNase free water	-	Up to 20 μl

*1: 模板为“加 A 尾反应和第一链 cDNA 合成”得到的 cDNA,一般建议将 cDNA 稀释 10 倍使用(稀释倍数可根据 CT 值进行适当调整)。

*2: miRNA 特异性引物,根据目的 miRNA 进行设计。

*3: 如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准,请按照仪器推荐量添加;若不需要使用 ROX,可使用 RNase free water 代替。

详细信息请查阅 www.agbio.com.cn

本产品仅供科学研究使用,不能用于人、动物的医疗或诊断程序,不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.

qPCR 反应条件 (两步法 PCR 反应程序*1)

	温度	时间	cycles
Step 1	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec ²	1
Step 2	95 $^{\circ}\text{C}$	5 sec	} 40
	60 $^{\circ}\text{C}$	20 sec ³	
Step 3	Dissociation Stage		

*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序,如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件;如果引物 T_m 值较低,导致两步法扩增效率较差,可采用三步法进行 PCR 扩增。

*2: 预变性温度通常设定为 30 sec,如果模板变性困难,可以延长预变性时间至 1 ~ 5 min。

*3: 扩增延伸反应条件设定为 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 sec 时可以满足要求;如需提高反应特异性,可适当提高延伸温度;如需提高扩增效率,则可将反应延伸时间适当延长,同时也可以尝试进行三步法 PCR 扩增。

附录
三步法 PCR 反应程序

	温度	时间	cycles
Step 1	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec	1
Step 2	95 $^{\circ}\text{C}$	5 sec	} 40
	55 $^{\circ}\text{C}$ *1	20 sec	
	72 $^{\circ}\text{C}$	20 sec ²	
Step 3	Dissociation Stage		

*1: 退火温度可根据上下游引物的 T_m 值进行调整。

*2: 如扩增效率不理想,可将反应延伸时间适当延长。