

# miRNA cDNA 第一链合成试剂盒

## miRNA 1st strand cDNA synthesis kit

Code No. AG11717

<b>包装量:</b>	50 rxns / 10 $\mu$ l
<b>保存温度:</b>	-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 <sup>*1</sup>	62.5 $\mu$ l
2X miRNA RT Reaction Solution <sup>*2</sup>	250 $\mu$ l
miRNA qPCR 3' primer (10 $\mu$ M) <sup>*3</sup>	625 $\mu$ l x 2 pcs
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<sub>m</sub> 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  $\mu$ l)<sup>\*3</sup>

组分名称	用量 ( $\mu$ l)
miRNA RT Enzyme Mix <sup>*1</sup>	1.25 $\mu$ l
2X miRNA RT Reaction Solution	5 $\mu$ l
Total RNA <sup>*2</sup>	20 ng ~ 2 $\mu$ g
RNase free water	Up to 10 $\mu$ 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  $\mu$ g, 最多可加至 8  $\mu$ g。

\*3: 所有反应混合液需要在冰上配制。

反应条件

37 $^{\circ}$ C <sup>*1</sup>	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 为例或 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</i> HS 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) <sup>3</sup>	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](http://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°C	30 sec <sup>*2</sup>	1
Step 2	95°C	5 sec	} 40
	60°C	20 sec <sup>*3</sup>	
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 Tm 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°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°C	30 sec	1
Step 2	95°C	5 sec	} 40
	55°C <sup>*1</sup>	20 sec	
	72°C	20 sec <sup>*2</sup>	
Step 3	Dissociation Stage		

\*1: 退火温度可根据上下游引物的Tm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。