

miRNA cDNA第一链合成试剂盒(茎环法)

miRNA 1st strand cDNA synthesis kit (Stem-loop)

Code No. AG11743

包装量: 50 rxns / 20 μ l
保存温度: -20 $^{\circ}$ C

产品概述

本产品是利用茎环法合成miRNA第一链cDNA的反转录试剂盒。相较于常规反转录试剂盒，该制品反转录获得的cDNA可实现对低丰度miRNA的精准定量，具有反转效率高、特异性强等优点，合成得到的cDNA适用于嵌合法qPCR分析。本制品适用于 Total RNA 或 small RNA 等包含miRNA样品的反转录。

保存

保存温度: -20 $^{\circ}$ C

运输温度: 干冰或者-20 $^{\circ}$ C冰袋运输

产品组成

| | |
|---|-------------|
| 5X miRNA RT Reaction Solution (Stem-loop) | 200 μ l |
| miRNA RT enzyme mix (Stem-loop) | 100 μ l |
| RNase free water | 1 ml |

注意事项

1. miRNA RT enzyme mix (Stem-loop) 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，并用移液枪轻柔吸打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
2. 需要几个样本同时进行检测时，可先配制各种试剂的混合液，然后分装到每个反应管中进行反应。
3. 所有反应混合液需要在冰上配制。
4. 本品是由RNA制备cDNA的反转录试剂盒，进行反转录反应时需要注意防止RNase污染，需要使用灭菌的器具，操作过程中要避免说话，且需要穿实验服、戴一次性手套等防止RNA被污染或降解。

实验操作

反转录反应:

按照下表在冰上配制好反应液，置于PCR仪中进行反转录反应^{*3}：

| 组分名称 | 用量 |
|--|------------------|
| 5X miRNA RT Reaction Solution (Stem-loop) | 4 μ l |
| miRNA RT enzyme mix (Stem-loop) | 2 μ l |
| Stem-loop RT Primer ^{*1} (10 μ M) | 0.5 μ l |
| Total RNA ^{*2} | - |
| RNase free water | Up to 20 μ l |

反转录反应条件

| | |
|------|--------|
| 25°C | 5 min |
| 42°C | 15 min |
| 85°C | 5 sec |
| 4°C | - |

*1: 根据miRNA序列设计特异性茎环反转录引物, 引物推荐使用量为0.25 μM, 可在0.1-0.4 μM范围内调整。

*2: RNA量可根据需要添加。在20 μl反转录体系中, 最多使用1 μg Total RNA。

*3: 反转录获得的 cDNA 可立即用于后续qPCR反应或-20°C保存, 长期保存建议放置于-80°C。

定量PCR反应

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

(以ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems为例)

| 组分名称 | 加入量 |
|---|-------------|
| 2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix II | 12.5 μl |
| cDNA ^{*1} | - |
| Primer F (10 μM) ^{*2} | 1 μl |
| Primer R (10 μM) ^{*2} | 1 μl |
| ROX Reference Dye (4 μM) ^{*3} | 0.5 μl |
| RNase free water | Up to 25 μl |

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.

- *1: 定量PCR反应体系中, cDNA原液使用体积不要超过定量PCR反应总体积的10%。
- *2: 引物通常使用终浓度为0.4 μM, 可根据实际情况在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整。
- *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。

qPCR反应条件^{*1}

| 循环数 | 温度 | 时间 | 循环数 |
|--------|--------------------|----------------------|------|
| Step 1 | 95°C | 30 sec ^{*2} | 1 |
| Step 2 | 95°C | 5 sec | } 40 |
| | 60°C | 30 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: 预变性时间通常设定为30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至1 ~ 5 min。

*3: 通常情况下PCR扩增产物设计在300 bp以下, 扩增延伸反应条件设定为60°C、30 sec时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或者PCR扩增产物较长, 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。