



miRNA cDNA第一链合成试剂盒（含gDNA去除试剂，茎环法）

miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit with gDNA Clean (Stem-loop)

Code No. AG11745

包装量: 50 rxns / 20 μ l
保存温度: -20°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。产品中的 5X gDNA Clean Reaction Mix II 在 42°C 2 min 条件下可有效去除 RNA 中残留的基因组 DNA (gDNA)，提升结果准确性。本产品适用于 Total RNA 或 Small RNA 等包含 miRNA 样品的反转录。使用本产品合成得到的 cDNA 产物可用于嵌合法 qPCR 分析，推荐搭配公司产品 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 II (Code. AG11702)；如 对消除引物二聚体有较高的需求，可搭配 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 IV (Code.AG11746)，以获得较优的实验结果。

保存及运输

保存温度：-20°C 保存

运输温度：干冰运输或 -20°C 冰袋运输

产品组成

5X gDNA Clean Reaction Mix II	100 μ l
5X miRNA RT Buffer (Stem-loop) ^{*1}	200 μ l
miRNA RT enzyme mix (Stem-loop) ^{*2}	100 μ l
RNase free water	1 ml

*1: 含有 dNTP。

*2: 含有 *Evo M-MLV* RTase 与 RNase Inhibitor。

实验操作

1. 去除基因组DNA

按照下表在冰上配制好反应液，置于 PCR 仪进行反应：

组分名称	加入量
5X gDNA Clean Reaction Mix II	2 μ l
Total RNA ^{*1}	\leq 1 μ g
RNase free water	up to 10 μ l

反应条件：42 °C 2 min

70 °C^{*2} 10 min^{*2}

4 °C -

*1: 在 10 μ l 去除 gDNA 的反应体系中, 建议 Total RNA 用量不超过 1 μ g。

*2: 70°C 10min 步骤是使 5X gDNA Clean Reaction Mix II 失活。若扩增效果不理想, 可能是 5X gDNA Clean Reaction Mix II 未完全失活, 可提高温度至 75°C, 反应 10 min。

2. 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^{*2、*3}:

组分名称	加入量
<实验操作-去除基因组DNA>反应液	10 μ l
5X miRNA RT Buffer (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
RNase free water	up to 20 μ l

反应条件: 25 °C 5 min
 42 °C 15 min
 85 °C 5 sec
 4 °C -

*1: Stem-loop RT Primer 根据 miRNA 序列设计, 推荐使用量为 0.25 μ M, 可根据实际情况在 0.1 ~ 0.4 μ M 范围内调整。

*2: 配制反转录反应液时, 各组分溶液可预先配制成预混液, 再分装 10 μ l 到上述步骤<实验操作-去除基因组DNA>反应液中。如不配制预混液, 向步骤<实验操作-去除基因组DNA>反应液中添加试剂顺序: RNase free water、5X miRNA RT Buffer (Stem-loop), 混合均匀后, 加入 Stem-loop RT Primer、miRNA RT enzyme mix (Stem-loop) 溶液, 轻柔混匀进行反转录反应, 确保发挥反转录酶最大活性。

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

3. 定量 PCR 分析

经上述反转录反应得到的 cDNA 可以直接进行定量 PCR 分析。推荐搭配本公司产品 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 II (Code: AG11702), 具体操作见详版说明书 (详版说明书可于官网www.agbio.com.cn下载)。

> 结果检测

反应结束后, 确认扩增曲线和熔解曲线, 并进行标准曲线分析。
 (分析方法请参照仪器操作手册)

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.