

Version 1

Code No. AG11748

miRNA cDNA

第一链合成预混液(茎环法)

miRNA 1st Strand cDNA

Synthesis Premix (Stem-loop)

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.



➤ 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。本产品针对反应体系进行了优化，5X miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Premix (Stem-loop) 中含有反转录反应所需的 Buffer 与 *M-MLV*，只需加入茎环引物、RNA 模板与水即可直接进行反应，使用方便，可有效减少试剂损失及实验误差，缩短操作时间。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 适合用于嵌合法 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)；若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。

➤ 产品组成

组分名称	AG11748 (50 rxns / 20 μ l)
5X miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Premix (Stem-loop)	200 μ l
RNase free water	1 ml

➤ 保存及运输

保存温度：-20℃保存

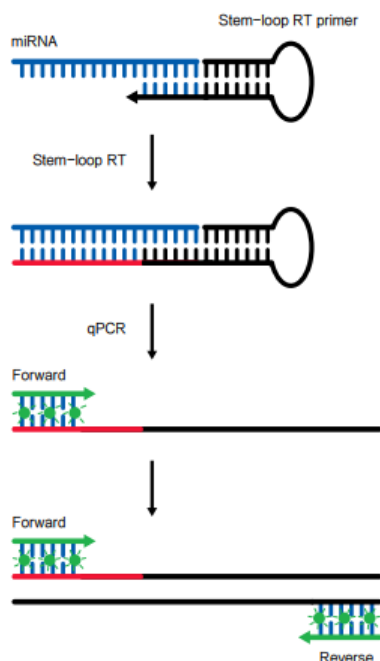
运输温度：干冰运输或者-20℃冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本产品为预混型产品，反应液配制十分简单，仅需加入茎环引物、RNA 模板与水即可直接进行反应。
2. 本产品可对 Total RNA 或 Small RNA 等包含 miRNA 的样品进行反转录。
3. 经本产品反转得到的 cDNA，可实现对成熟 miRNA 的精确定量，具有较高的灵敏度和特异性。

➤ 实验原理

本产品是以 RNA 为模板，使用特异性茎环引物（Stem-loop RT Primer）和反转录酶合成 miRNA 第一链 cDNA 的试剂盒。Stem-loop RT Primer 主要由两部分组成：一是通用的茎环结构序列；二是 5~8 个与目的 miRNA 3' 端反向互补的碱基序列。进行定量 PCR 时，以根据 miRNA 序列设计的特异性正向引物与通用茎环结构序列设计的反向引物参与反应。



➤ 使用前注意事项

1. 5X miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Premix (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，并用移液器轻柔吸打混匀（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，可先将各组分溶液配制成预混液，然后分装到每个反应管中。
3. 所有反应混合液建议在冰上配制。
4. cDNA 产物适用于定量 PCR 反应，不适用于长片段基因调取，如有需要，可使用本公司其他相关产品。
5. 本产品是由 RNA 制备 cDNA 的反转录试剂盒，进行反转录反应时需要使用灭菌的器具，操作过程中避免说话，且需穿戴好实验服、一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。

➤ 实验前准备

1. PCR 仪 (或 25°C、42°C和 85°C 的水浴或加热块)
2. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) 、PCR 管 (RNase-free)
3. 冰盒
4. 移液器、枪头 (RNase-free)

➤ 操作步骤

本产品是利用 Stem-loop Primer, 对 miRNA 进行反转录合成 cDNA 的试剂盒。如需进行下一步 qPCR 反应, 可配合本公司相关定量产品使用。操作如下:

1. 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	加入量
5X miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Premix (Stem-loop)	4 μ l
Stem-loop RT Primer ^{*1} (10 μ M)	0.5 μ l
Total RNA ^{*2}	\leq 1 μ g
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, 可参考<产品注意事项-引物设计>, 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: 在 20 μ l 反转录体系中, 建议 Total RNA 用量不超过 1 μ g。

*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, 若需长期保存建议放置于-80°C。

2. 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。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	反应终浓度	25 μ l 体系
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix II	1X	12.5 μ l
cDNA ^{*1}	-	\leq 2.5 μ l
Primer F (10 μ M) ^{*2}	0.4 μ M	1 μ l
Primer R (10 μ M) ^{*2}	0.4 μ M	1 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*3}	0.08 μ M	0.5 μ l
RNase free water	-	Up to 25 μ l

*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%。若用 cDNA 原液进行定量 PCR 反应, 出现荧光信号偏低的情况时, 可尝试将 cDNA 原液稀释 2 ~ 10 倍后进行实验。

*2: 引物通常使用终浓度为 0.4 μ M, 可根据实际情况在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

*3: 若需要使用 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 进行荧光信号校准, 可使用 RNase free water 代替。

qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序^{*1、*2}:

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec ^{*3}	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	60°C ^{*4}	30 sec ^{*4}	
Step 3	Dissociation stage		

*1: 建议首先采用上表中推荐的两步法 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。

*2: 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 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

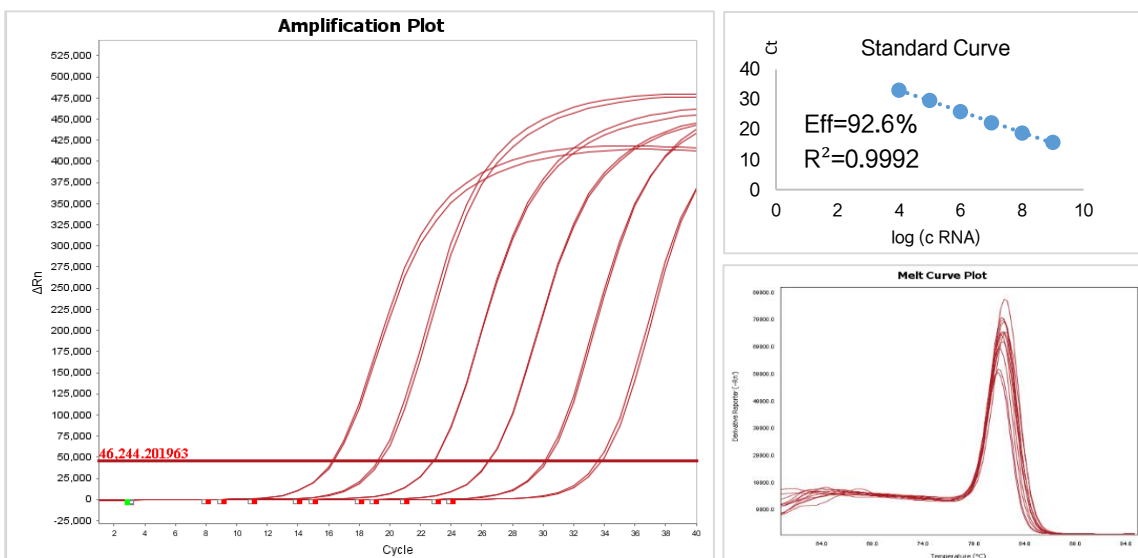
*3: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可根据实际需求延长预变性时间至 30 sec ~ 2 min。

*4: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增退火和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, 可适当提高退火和延伸温度; 如需提高扩增效率, 或 PCR 扩增产物较长, 则可将反应退火和延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

➤ 实验例

1、以小鼠肝脏 Total RNA (分别为 1 μg、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、0 pg) 为模板，使用本产品进行反转录实验，并以反转得到的 cDNA 为模板，取 2 μl 的 cDNA 原液，用 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 II (Code. AG11702) 进行 qPCR 扩增检测小鼠的 *mmu-miR-29a-3p*。

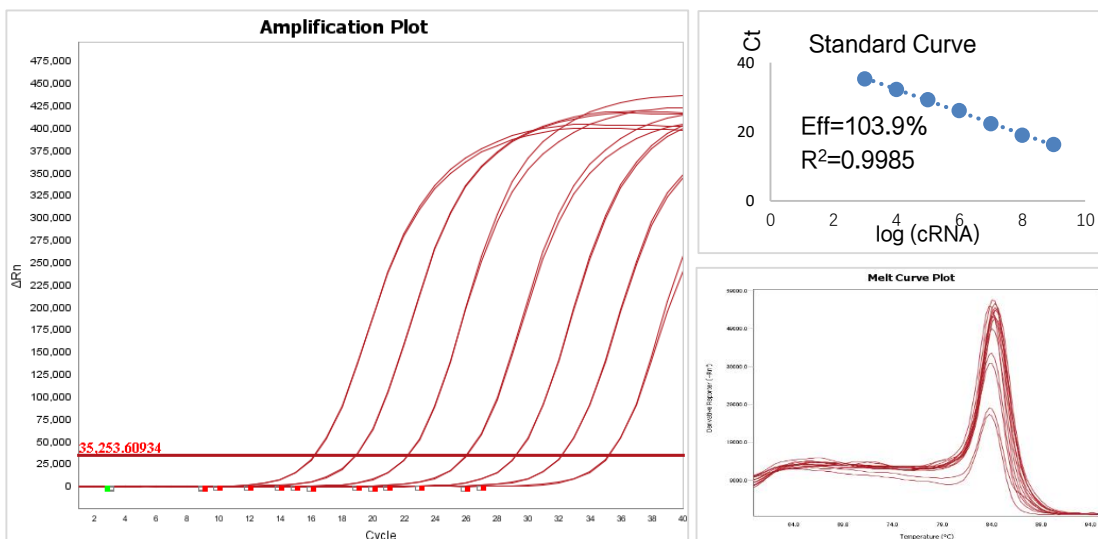
所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：



- 结果如上图所示：
- 1、工作曲线 $R^2=0.9992$ ，扩增效率是 92.6%。
 - 2、在 1 μg ~ 10 pg RNA 浓度范围内的扩增曲线呈现良好的线性关系。
 - 3、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

2、以小鼠肝脏 Total RNA (分别为 1 μg、100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、0 pg) 为模板，使用本产品进行反转录实验，并以反转得到的 cDNA 为模板，取 2 μl 的 cDNA 原液，用 SYBR Green *Pro Taq* HS 预混型 qPCR 试剂盒 II (Code. AG11702) 进行 qPCR 扩增检测小鼠的 *tRF RNA-mmu_tsr000557*。

所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：



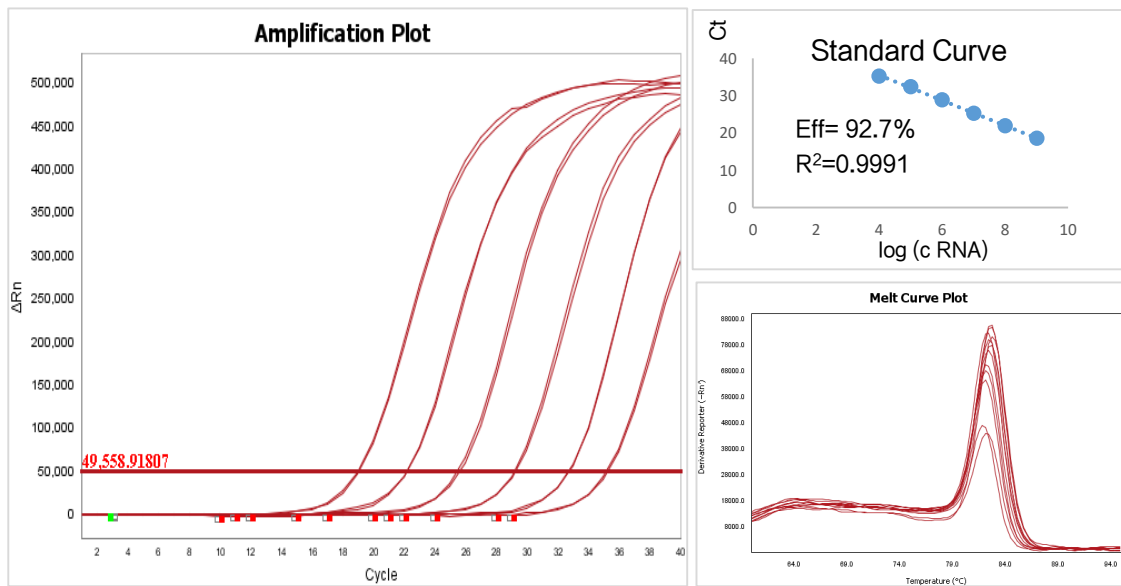
结果如上图所示：1、工作曲线 $R^2=0.9985$ ，扩增效率是 103.9%。

2、在 $1\ \mu\text{g} \sim 1\ \text{pg}$ RNA 浓度范围内的扩增曲线呈现良好的线性关系。

3、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

- 3、以 293T Total RNA (分别为 $1\ \mu\text{g}$ 、 $100\ \text{ng}$ 、 $10\ \text{ng}$ 、 $1\ \text{ng}$ 、 $100\ \text{pg}$ 、 $10\ \text{pg}$ 、 $0\ \text{pg}$) 为模板，使用本产品进行反转录实验，并以反转得到的 cDNA 为模板，取 $2\ \mu\text{l}$ 的 cDNA 原液，用 SYBR Green *Pro Taq HS* 预混型 qPCR 试剂盒 II (Code. AG11702) 进行 qPCR 扩增检测人的 *miR-221-3p*。

所用定量仪器：ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems。结果如下：



结果如上图所示：1、工作曲线 $R^2=0.9991$ ，扩增效率是 92.7%。

2、在 $1\ \mu\text{g} \sim 10\ \text{pg}$ RNA 浓度范围内的扩增曲线呈现良好的线性关系。

3、熔解曲线峰型单一，扩增特异性好。

➤ 产品注意事项

1. 保证模板的完整性及纯度

- ❖ RNA 的完整性：如模板中含有 RNase，降解 RNA，将会影响 cDNA 的产量及长度。建议在提取 RNA 过程中，严防 RNase 污染，采取特殊的保护措施，如操作者穿戴好实验服，佩戴一次性手套和口罩，全程使用无 RNA 酶污染的实验耗材等。
- ❖ RNA 的纯度：RNA 纯化过程中混入的盐、金属离子、乙醇、苯酚、多糖多酚和腐殖酸等会抑制反转录酶的活性。可在无核酸酶水中稀释起始 RNA，以降低潜在的抑制剂浓度；或重新纯化 RNA 样品，以除去残留的盐和抑制剂。

2. 引物设计

- ❖ 进行反转录反应时，需确保加入特异性的茎环引物（推荐的通用茎环序列为 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC）加上 5~8 个与目的 miRNA 的 3' 端反向互补的碱基。
- ❖ 扩增反应的上游引物为去掉 miRNA 序列 3' 端 5~8 个碱基的剩余部分，如果 Tm 值或 GC 含量不合适，可在 5' 端加碱基进行调整；扩增反应的下游引物在通用的茎环序列上设计。

3. 实验细节

- ❖ 扩增反应前要确认管内无气泡。
- ❖ 所有反应混合液建议在冰上配制。
- ❖ 本产品是由 RNA 制备 cDNA 的反转录试剂盒，进行反转录反应时需要使用灭菌的器具，操作过程中避免说话，且需穿戴好实验服、一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。

➤ 附录：三步法 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Step 3	Dissociation stage		