

miRNA first-strand cDNA synthesis kit



北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 邮箱：info@aidlab.cn

使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC4801	25次

组成	PC4801
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	50U
TRUEScript H ⁻ RTase (200U/μl)	5000 U
2 × miRT Reaction Mix	250 μl
RNase free H ₂ O	1 ml

产品组成、储存：-20℃ 保存。

制品说明：miRNA 第一链合成试剂盒本试剂盒采用在 Poly(A)加尾法原理，首先 miRNA 3' 末端加 Poly(A) 尾，再使用 Anchored oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物进行逆转录反应，最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链。本试剂盒采用特殊优化预混合 mix 将 Poly(A)加尾和反转录合并为一步完成，简化了操作步骤并提高 Poly(A)加尾和逆转录效率，该试剂盒具有可从 20pg-2μg 的 total RNA 中有效制备 miRNA 对应的 cDNA 第一链。一次合成的 cDNA 可检测多个 microRNA，节约了样品和成本。

注：该试剂盒须与 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (PC4901) 配套使用。

操作步骤：

一、miRNA 3' 末端进行 Poly (A)加尾和逆转录反应（第一链合成）

1. 加入以下试剂至总体积20μl（最后加入*E. coli* Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻ RTase）

Components	Volume	Final Concentration
Total RNA	x μl	Up to 2μg
2 × miRT Reaction Mix	10 μl	1 ×
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	0.3-0.4 μl(见注意事项)	2U
TRUEScript H ⁻ RTase (200U/μl)	0.8-1μl (见注意事项)	200U
RNase free H ₂ O to final volume	20 μl	

注意事项：*E. coli* Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻ RTase 非常粘稠和微量，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。*E. coli* Poly(A) Polymerase可以每次按照0.3μl使用，TRUEScript H⁻ RTase 可以每次按照0.8μl使用，也不影响使用效果。

*在反应中使用的total RNA 必须含有小分子RNA。

*此过程也可以使用小分子RNA，miRNA无法直接用分光光度计定量，建议加入量为2μl ~5μl。可根据目的miRNA丰度决定加入量，但是对于低丰度miRNA 样品而言(如血清血浆提取物)，可直接加入最大体积8 μl。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在42℃反应60 min。

3. 85℃加热5秒钟失活*E. coli* Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻ RTase。合成的cDNA反应液可放置于-20℃保存；也可以直接进行下游PCR或者荧光定量PCR检测。

二、按照北京艾德莱生物miRNA Real-Time PCR Assay kit(货号PC4901)进行real time PCR。

注：按照上述操作步骤得到的cDNA模板用于下游PCR或者荧光定量PCR检测时，可以根据实际情况选择使用量，对于特殊的检测体系中，高含量的cDNA 模板易导致非特异性扩增，可根据所检测miRNA 的丰度适当的稀释cDNA（5-10倍或者100倍）后使用。如果发现有非特异扩增条带，或者融链曲线显示有非特异扩增，往往提示cDNA模板过量， 可以尝试将上述cDNA模板稀释几十到几百倍甚至上千倍再使用。