

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
miRNA RT Enzyme Mix	50 μ l
2 x miRT Reaction Mix	250 μ l
RNase free H ₂ O	1 ml

产品组成、储存：-20 °C 保存。

制品说明：增强型 miRNA 第一链合成试剂盒本试剂盒采用 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 miRNA RT Enzyme 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-2 μ g 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：该试剂盒须与增强型 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. 解冻 2 x miRNA RT Reaction Mix 并混匀，miRT Enzyme Mix 放于冰中备用，加入以下试剂至总体积 20 μ l (最后加入 miRNA RT Enzyme Mix)。

Components	Volume	Final Concentration
Total RNA*	x μ l	Up to 2 μ g
2 x miRNA RT Reaction Mix	10 μ l	1 x
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l (见注意事项)	-
RNase free H ₂ O to final volume	20 μ l	-

注意事项：miRNA RT Enzyme Mix 非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心，并且避免吸头外壁沾附损失。Enzyme Mix 内酶都是过量的，即使每次按照 1.8 μ l 使用，也不影响使用效果。

*在反应中使用的 total RNA 必须包含有小分子 RNA(miRNA)。此过程也可以使用富集的 miRNA，单纯 miRNA 无法直接用分光光度计定量，建议直接加入 2 μ l ~5 μ l。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 μ l。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在 42°C 反应 60 min。

85°C 加热 5 秒钟失活 miRNA RT Enzyme Mix。合成的 cDNA 反应液可放置于 -20°C 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)进行定量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。