

miRNA cDNA Kit (Stem Loop)



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 技术 QQ: 328153626

包装量:

目录编号	包装单位
PC6501	50次
PC6502	100次

组成	PC6501	PC6502
5 × THERMO Reaction Mix	200 µl	400 µl
gDNA Remover	50 µl	100 µl
RNase free H ₂ O	1.5 ml	1.5 ml

产品组成、储存： -20 °C 保存。

制品说明： miRNA cDNA Kit 第一链 cDNA 合成试剂盒是采用茎环法原理的专用试剂盒，5 × THERMO Reaction Mix 为一管式反转录预混 Mix，含有反转录所需的所有试剂（THERMOscript H⁻ RTase、RNase Inhibitor、dNTP Mixture、Buffer），只需加入模板 RNA 和茎环引物即可进行反应，使得 cDNA 的合成更加的方便快捷。本试剂盒中使用了具有 DNA 分解活性的特殊 gDNA Remover，不需要中途开盖添加，只需一步操作，即可同时完成基因组清除与逆转录反应，极大简化了操作步骤，避免了复杂加样过程造成的样品污染与 RNA 降解的风险。本制品基于的 THERMOscript H⁻ RTase 具有极高的热稳定性，配以针对优化的缓冲体系，最大限度保证各种 miRNA 特异性逆转录产物的合成。cDNA 产物兼容性好，可以配套任意商品化公司的荧光定量 mix 做下游检测试验。

操作步骤:

一、茎环法miRNA第一链cDNA合成(以20 µl反应体系为例，也可以采用10 µl反应体系)

1. 解冻各组分，使用前将每种溶液轻弹或者轻微涡旋振荡混匀，可简短离心以收集残留在管壁的液体到管底。
2. 在RNase free管里面加入以下成分：(建议使用PCR管冰上配制，置PCR仪反应)

Components	Volume
Total RNA/miRNA	Up to 2µg *
Stem-loop primer(2 µM)	1 µl
5 × THERMO Reaction Mix	4 µl (见注意事项 3)
gDNA Remover	1 µl (见注意事项 3)
RNase free H ₂ O	to 20 µl (补足到总体积 20 µl)

- * 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。

3. 移液器轻轻吹打混匀，按下列条件进行第一链cDNA合成反应:

25°C	5 min
50°C *	15 min
85°C	5 sec

- * 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域，可尝试将反应温度提高至55°C有助于提高产量。得到的cDNA产物可立即用于qPCR反应，或在-20°C保存，并在半年内使用；长期存放建议分装后在-70°C保存。cDNA应避免反复冻融。

二、RT-qPCR

取适量反转录cDNA产物（一般不超过qPCR反应体积的1/10）作为qPCR模板，按照厂家荧光定量PCR试剂说明书（艾德莱货号：PC62）进行下一步荧光定量PCR。如果表达基因含量丰富，可以根据实际适当稀释cDNA模板使用。

如果茎环引物按照艾德莱推荐设计，则配套通用下游引物序列：5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT- 3'

引物设计：

1. 通用茎环结构序列推荐序列：5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC- 3'
2. 茎环尾加碱基（和 miRNA3' 互补碱基）长度一般为 5-8 个碱基，本公司建议新手起始首选尾加互补碱基为 6 个碱基。逆转录引物只需根据 miRNA 序列在茎环序列上添加 6 个碱基即可。
3. 配套通用下游引物序列：5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT- 3'
4. 茎环引物设计软件可以采用任意商业化公司的设计软件，也可以联系艾德莱索取引物设计软件。

注意事项：

1. 避免 RNase 污染。
2. 为保证反转录成功建议使用高质量的 RNA 样品。
3. 5 × THERMO Reaction Mix 和 gDNA Remover 含甘油很粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。5 × THERMO Reaction Mix 和 gDNA Remover 内包含的酶均为过量，即使每次 5 × THERMO Reaction Mix 按照 3.6 μl-3.8 μl 使用，gDNA Remover 按照 0.8 μl-0.9 μl 也不影响使用效果。