

版本号: KR160112

miRcute Plus miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit

miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒

目录号: KR211

产品内容

产品组成	KR211-01 (20 μ l \times 25 rxn)	KR211-02 (20 μ l \times 50 rxn)
miRNA 反转录混合酶 miRNA RT Enzyme Mix	50 μ l	100 μ l
2 \times miRNA反转录缓冲液 2 \times miRNA RT Reaction Buffer	250 μ l	500 μ l
无RNA酶双蒸水 RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	1 ml

运输条件

干冰运输。

储存条件

收到本产品后, 请立即置于-20 $^{\circ}$ C下保存。从-20 $^{\circ}$ C取出使用时, 将miRNA RT Enzyme Mix需放在冰中备用; 将冻存的2 \times miRNA RT Reaction Buffer融解, 融解后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。

产品简介

本试剂盒采用加A法来进行miRNA第一链cDNA的反转录。具体过程是先通过*E. coli* Poly(A) Polymerase在miRNA 3'末端加多聚A尾Poly(A)，再使用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。

miRcute Plus miRNA cDNA第一链合成试剂盒采用了双组分形式，简化了实验操作流程，降低了操作失误的可能性。本产品中的miRNA RT Enzyme Mix包含了*E. coli* Poly(A) Polymerase、RTase和RNasin。其中的*E. coli* Poly(A) Polymerase不但具有高效的加A尾效率，还可特异性识别单链miRNA，从而避免了具有双链结构的miRNA前体的进一步逆转录反应；RTase经过分子改造，去掉了RNase H活性，增加了RNA模板亲和力，从而使得miRNA的逆转录反应具有更高的效率和灵敏度。

本产品中的2× miRNA RT Reaction Buffer包含了miRNA加A尾反应和逆转录反应的所有原料和引物，并经过精心优化，可保证miRNA 3'末端的Poly(A)修饰过程和逆转录过程同时高效进行。

注：本试剂盒须与miRcute Plus miRNA荧光定量检测试剂盒(FP411)配套使用

产品特点

- 省时省力。**本试剂盒将miRNA的加A尾反应和逆转录反应合二为一，在减少操作步骤的同时也节省了一半的反应时间。另外，本试剂盒为双组分形式，操作过程中只需加入RNA模板和两个组分即可进行miRNA的逆转录反应，进一步简化了操作。
 - 特异性强。**本试剂盒中的*E. coli* Poly(A) Polymerase和RTase都只针对单链的miRNA进行修饰和逆转录反应，因此可最大程度地避免具有二级结构的miRNA前体进行逆转录反应。
 - 灵敏度高。**本试剂盒通过将加A尾反应和逆转录反应的整合实现了miRNA的加A产物可全部进行进一步的逆转录反应，大大提高了低丰度miRNA的检出率。
 - 适用广泛。**本试剂盒可针对几乎所有材料提取的miRNA进行逆转录反应，模板的使用范围可达20 pg~2 μg(质量范围)和10 fM~100 pM(浓度范围)。
-

操作步骤

一、反转录体系的配制

解冻2×miRNA RT Reaction Buffer并混匀，miRNA RT Enzyme Mix放于冰中备用，在冰上预冷RNase Free的反应管内加入以下试剂至总体积20 μl (最后加入 miRNA RT Enzyme Mix)。

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA*	-	可达2 μg
2×miRNA RT Reaction Buffer	10 μl	1×
miRNA RT Enzyme Mix	2 μl	-
RNase-Free ddH ₂ O	补至20 μl	-

*反应中所使用的Total RNA必须含有小分子RNA。此过程也可以使用小分子RNA作为模板，建议加入量为2-5 μl。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。

二、反转录程序

移液器轻轻混匀上述配制的反应液，按下表程序进行miRNA的逆转录反应：

反应温度	反应时间	说明
42°C	60 min	miRNA加A尾反应和逆转录反应
95°C	3 min	酶失活反应

合成的cDNA反应液可放置于-20°C保存；也可以直接进行下游荧光定量检测。在进行下游荧光定量检测时，为避免反转录体系对定量PCR反应的抑制，得到最适的Ct值(15-30之间)，可将cDNA反应液稀释10-1000倍后使用。

注意事项

预防RNase污染，应注意以下几方面：

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
 2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 3. RNA在裂解液中不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
 4. 配制溶液应使用无RNase的水(将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1% (v/v)，放置过夜，高压灭菌)。
-