



miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒(加尾法)

miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit(by tailing A)

Cat.NO.: ZR109

试剂盒组成	ZR109-1 25次
miRNA RT Enzyme Mix	50ul
2×miRNA RT Buffer	250ul
Universal Reverse Primer(10 uM)	250ul
RNase-free ddH2O	1ml

保存和运输条件:

干冰运输;短距离可以凝胶冰运输。收到本产品后,请立即置于-30°C~-15°C保存,避免反复冻融。

产品简介:

本产品以总RNA或miRNA为模板,先通过Poly(A)聚合酶在miRNA的3`端加多聚A尾,随后使用Universal Oligo(dT) Primer进行逆转录反应,最终生成miRNA对应的cDNA第一链。

本产品中,miRNA RT Enzyme Mix包含了E.coli Poly(A) Polymerase和逆转录酶,其中的 E.coli Poly(A) Polymerase特异性识别单链miRNA,降低了miRNA 前体的逆转录;逆转录酶经过分子改造,无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。

2×miRNA RT Buffer包含了miRNA加A尾反应和逆转录反应的所有组分,在一管中即可同时完成加A尾和逆转录。

适用范围:

以总RNA或miRNA为模板,进行加A尾法逆转录,产物用于RT-PCR、荧光定量PCR。

注意事项:

冻存的反转录试剂应完全融解后混匀均一,冰上备用;反转录体系的配制建议在冰上完成,并严格按照RNA实验操作注意事项,以预防RNase污染。



实验流程

1、配制反转录体系

Components	Volume
2×miRNA RT Buffer	10 ul
miRNA RT Enzyme Mix	2 ul
Total RNA/miRNA	100 ng-2 ug
RNase-free ddH2O	Add to 20 ul

注:使用的Total RNA模板必须含有miRNA。根据目的miRNA丰度决定加入量,低丰度的miRNA样本可直接加入最大体积8 μl。

2、反转录程序

移液器轻轻吹打混匀反应液,离心后按照以下表中程序进行第一链cDNA合成。

温度	时间
37°C	60 min
85°C	5 min

注:合成的cDNA应避免反复冻融,长期保存建议存放-70°C,也可直接用于荧光定量实验;为避免反转录体系对PCR反应的抑制,根据具体的CT值,建议稀释10-1000倍使用。

荧光定量PCR引物设计:

1. Forward Primer引物设计原则

- 以成熟的miRNA序列为基础,将U替换成T。
- 试剂盒提供的下游引物Tm值为60°C,设计引物时尽量保证在60°C左右。
- 若根据以上原则设计的引物Tm值过低,建议在引物5`端添加几个碱基(以G和C为主),添加碱基后应验证引物特异性,并避免二级结构
- 若设计的引物Tm值过高,建议在引物5`端或3`端删去几个碱基。

2. Reverse Primer引物

本产品提供反向通用引物Universal Reverse Primer, Tm值为60°C。