

M5 miRNA cDNA Synthesis Kit

小 RNA 第一链合成试剂盒（加尾法，升级版）

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 miRNA cDNA Synthesis Kit	25T	MF283-01 (升级版)

备注：本试剂盒须与 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (MF307 升级版) 配套使用。

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C，有效期 12 个月。使用后请及时放入-20°C 保存以保证酶的活性。

【产品简介】

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。

【自备实验材料】： 20pg-2 μg 的总 RNA，或 0.1 ng-1 μg 的小分子 RNA。

【产品组分】（升级版组分更少）

M5 miRNA 超高效反转录混合酶	50ul
2x M5 miRT Reaction Mix	250μl
RNase free H ₂ O	1ml

【注意事项】

预防 RNase 污染，应注意以下几方面：

1. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头，避免交叉污染。
2. 玻璃器皿应在使用前于 180°C 高温下干烤 4 小时，塑料器皿可在 0.5 M NaOH 中浸泡 10 分钟，用水彻底冲洗后高压灭菌。
3. 配制溶液应使用无 RNase 的水。
4. 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。

【操作流程】

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

1. 在冰上，加入以下试剂至总体积 20 μ l (最后加入 E.coli Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻ RTase)：

组分 Components	体积 Volume	终浓度 Final Concentration
Total RNA*	x μ l	Up to 2 μ g
2x M5 miRT Reaction Mix	10 μ l	1x
M5 miRNA 超高效反转录混合酶**	2 μ l	1x
RNase free H ₂ O to final volume	20 μ l	

注意：

*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 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。

**M5 miRNA 超高效反转录混合酶由 E.coli Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻ RTase 组成，它们非常粘稠和微量，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。

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、按照聚合美 M5 miRNA qPCR Assay Kit miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒（MF307-升级版）进行 qPCR 检测。

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。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。