

M5 Stem-loop miRNA cDNA Synthesis Kit

小 RNA 第一链合成试剂盒（茎环法）使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Stem-loop miRNA cDNA Synthesis Kit	10T	MF878-T
M5 Stem-loop miRNA cDNA Synthesis Kit	50T	MF878-01

备注：本试剂盒须与茎环法 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (MF879) 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】

本试剂盒采用茎环结构的逆转录引物与 miRNA 分子的 3'端结合，并在逆转录酶的作用下进行反应，获得人为加长的 miRNA cDNA 第一链。获得的逆转录产物可直接用于后续的荧光定量检测。此方法特异性高只对成熟的 miRNA 进行反转，不受其前体干扰，序列高度同源的 miRNA 也可精确区分。简化的试剂缩短了操作时间，一定程度上避免操作过程 RNA 的降解。本产品通过体系优化，可实现一次能针对多至 10 种的 miRNA 进行同时逆转录，使得茎环引物法 miRNA cDNA 第一链合成在特异性强、成本低等优点的基础上，进一步提升了检测效率和通量。

【产品组分】

	MF878-T	MF878-01
5xLoopRT Mix for miRNA	40 µl	200 µl
Loop RT Enzyme	10 µl	50 µl
RNase-Free H ₂ O	0.2 ml	1 ml

【注意事项】

- 操作时使用新手套。使用无 RNase 的一次性塑料制品和枪头避免交叉污染。配制反应溶液应使用无 RNase 的水。
- RNA 提取以及后继续处理过程中务必使用不含 RNase 的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在 150°C 烘烤 4 h，塑料器皿建议尽量使用无 RNase 的一次性塑料制品。
- 所有从冷冻状态的组分使用前必须完全融化并多次颠倒混匀，然后短暂离心后备用。

【操作流程】

1. miRNA stem-loop RT primer 及 RT PCR primer 设计方法

1) 茎环引物由两部分构成。一部分是通用的茎环结构序列（通用序列有很多种，本说明书仅列举一种），另一部分是针对某个 miRNA 的特定序列，一般修改其 3'末端的 6-10 个碱基。具体选用的碱基数量需考虑 3'末端的 GC 含量来决定，要使其 GC 含量占比超过 50%。

通用茎环结构序列为：5'CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGC-3'

2) 例如设计 hsa-miR-30b-5p (TGTAACATCCTACACTCAGCT) 的 stem-loop RT primer, 在通用茎环序列后加上 miRNA 的 3'末端 9 个碱基的反向互补序列经验证是好用的。

序列为：5'CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCAGC TGAGTGT-3'

3) miRNA 特异的 QPCR 正向引物设计：通常为 5'端配重 序列（用来延伸引物长度和调节 GC 含量，一般用高 GC 序列，例如：5'-GCCGAG3'）加上除去 3'端作为 RT primer 碱 基的剩余 miRNA 序列作为正向引物。这里需要考虑成熟 miRNA 自身碱基组成及 GC 含量，如 GC 含 量过低，可调节 5'端配重序列，或者延长引物 3'端与已经作为 RT primer 的那段碱基重叠不超过 4 个碱基，来提高引物 Tm 值。例如 hsamiR-30b-5p，正 向引物设计为 5'GCAGGTGTAACATCCTACA-3'，用二步法 QPCR 检测，可很好的工作。

4) 反向引物为茎环引物上的一段序列，对应此例中的通用茎环 结构序列，如本例中的茎环结构序列对应的反向引物可设计为 5'-CTCAACTGGTGTCTGGGA-3'。

5) 设计的引物需要通过预试验检测引物的效果。

2. 反转录体系的配制

解冻 5xLoop Mix for miRNA 和 RNase-Free H₂O，在 RNase Free 的反应管内按下表配制总体 积为 20 μl 的反应体系并混匀。（Loop RT Enzyme 取出后若久置，请置于冰上，使用后尽快放回-20℃保存）

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA*	--	可达 2ng
5xLoopRT Mix for miRNA	4 μl	1x
Loop RT Enzyme	1 μl	--
stem-loop RT primer(10μM each)**	1 μl	--
RNase-Free H ₂ O	补至 20 μl	--

* 使用 Total RNA 模板时须确保含有 miRNA，Total RNA 建议加 入 0.5-2μg。若使用 miRNA 作为模板，建议加入量为 4-8 μl（也可根据目的 miRNA 丰度确定模板用量）；是对于低丰度 miRNA 样品（如血 浆等样品提取的游离 RNA），可直接加入最大体积 14 μl。

** 合成的 stem-loop RT primer 干粉需先溶解到 100μM，然后 用 RNase-Free H₂O 稀释混合成 10μM each 的 RT primer 混合物备用。

3. 反转录反应

移液器轻轻混匀配制的反应液，短暂离心后于 PCR 仪中进行 miRNA 的逆转录反应（热盖开启），条件如下：

反应温度 反应时间

37°C	5 min
50°C	30 min
80°C	10 min
20°C	10 s

4. qPCR 检测

合成的 cDNA 反应液可放置于-20℃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)，建议将 cDNA 反应液稀释 10-1000 倍后使用。

注意：进行后续 QPCR 检测反应时，直接逆转录产物作为 模板的用量不要多于 QPCR 反应体积的 1/20，否则可能会对 PCR 反应产生一定抑制。

【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。