

M5 Hiper SuperFast microRNA First Strand cDNA Synthesis Kit 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 Hiper SuperFast microRNA First Strand cDNA Synthesis Kit	25T	MF282-01

备注：本试剂盒须与 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (MF308) 配套使用。

【储存条件】

长期保存，请置于-20°C。

【产品简介】

本 miRNA 第一链合成试剂盒采用在 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】： 1 ng-2 μg 的总 RNA，或 0.1 ng-1 μg 的小分子 RNA。

【产品组分】

<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase, 5U/μl	10 μl
TRUEScript H ⁺ RTase (200U/μl)	25 μl
2× miRT Reaction Mix	250 μl
RNase-Free Water	1 ml

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

1. 向冰浴中预冷的无 RNase 反应管中加入以下试剂至总体积 20 μ l。

Total RNA*	X μ l (ug)
2 × miRT Reaction Mix	10 μ l
E.coli Poly(A) Polymerase(5U/ μ l)	0.3-0.4 μ l **
TRUEScript H ⁻ RTase (200U/ μ l)	0.8-1 μ l **
RNase-Free Water	补足至 20 μ l

* 反应中使用的 total RNA 必须含有小分子 RNA。此过程也可以直接使用小分子 RNA（建议加入量为 2-5 μ l。请根据目的 miRNA 的丰度来确定加入量，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)。

** E.coli Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻RTase 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。E.coli Poly(A) Polymerase 可以每次按照 0.3 μ l 使用，TRUEScript H⁻RTase 可以每次按照 0.8 μ l 使用，也不影响使用效果。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min。

3. 85 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 保存；也可以直接进行下游 PCR 或者荧光定量 PCR 检测。

B. 按照 miRNA Real-Time PCR Assay kit 进行 real time PCR。

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。

附录：microRNA 加尾法反转录和茎环法反转录性能比较

	加尾法反转录	茎环法反转录
检测通量	一次反转录可检测多个miRNA	一次反转录只能检测一个miRNA
检测准确性	内参与miRNA一起，在同一个反应体系反转录，准确性高	内参与miRNA分开，在两个体系分别反转录，容易产生误差
检测特异性	★★★★	★★★★★
检测灵敏度	★★★★★	★★★★
实验时间	+++++	+++++

【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。