

# M5 miRNA cDNA Synthesis Kit

## 使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 miRNA cDNA Synthesis Kit	25T	MF283-01

**备注：本试剂盒须与 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (MF307) 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】

本试剂盒采用在 miRNA 3'末端加多聚 A 尾的方法来使 miRNA 具有 Poly(A)尾，之后再使用 Oligo(dT)-Universal tag 通用逆转录引物进行逆转录反应，最终合成 miRNA 对应的第一链 cDNA。

miRNA cDNA 第一链合成试剂盒包含 miRNA 3'末端 Poly(A)尾修饰过程及修饰后逆转录过程需要的全部试剂。该试剂盒具有非常高的 Poly(A)修饰和逆转录效率，可以从 1 ng-2 µg 的 total RNA 中有效获得 miRNA 对应的 cDNA 第一链。并且操作简便、快捷，可以用于从一个反应合成的 cDNA 中同时检测多种 miRNA，不仅减少了误差、节约了样品，同时还实现了检测的高通量。

**【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】

Tris-HCl, 1 mM, PH 8.0	1 ml
E. coli Poly(A) Polymerase, 5U/µl	15 µl
10×Poly(A) Polymerase Buffer	80 µl
ATP, 10 mM	15 µl
RT Primer, 25 µM	90 µl
5×SuperRT Buffer	120 µl
UltraPure dNTP Mix, 10 mM each	30 µl
SuperRT	15 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 加 Poly(A)尾的过程:**

- 首先根据所用 RNA 的量, 按如下公式, 用 1 mM Tris (PH8.0) 来稀释 10 mM ATP:

$$\text{ATP 稀释系数} = 5000 / \text{总 RNA 量 (ng)}$$

例: 如果总 RNA 的起始用量为 100 ng, 那么 ATP 稀释系数 = 5000/100 = 50。即将 ATP

稀释 50 倍 (1  $\mu$ l 的 10 mM ATP 加 49  $\mu$ l 的 1 mM Tris, PH8.0)。

- 向冰浴中预冷的无 RNase 反应管中加入以下试剂至总体积 25  $\mu$ l。

Total RNA*	X $\mu$ l
10 $\times$ Poly(A) Polymerase Buffer	2.5 $\mu$ l
第“1”步中稀释好的 ATP	1 $\mu$ l
E. coli Poly(A) Polymerase, 5U/ $\mu$ l	0.5 $\mu$ l
RNase-Free Water	补足至 25 $\mu$ 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  $\mu$ l。请根据目的 miRNA 的丰度来确定加入量)。

- 轻轻混匀上述反应液, 短暂离心将液体收集于管底。37 $^{\circ}$ C, 孵育 15 分钟。此过程结束后, 立刻进行第一链 cDNA 的合成, 或于 -20 $^{\circ}$ C 暂存。如需长期保存, 建议存放于 -80 $^{\circ}$ C。

**B. 修饰后的 miRNA cDNA 第一链合成的过程:**

- 向冰浴中预冷的无 RNase 反应管中加入下表中试剂, 至终体积 20  $\mu$ l:

上述 Poly(A)反应液	4 $\mu$ l
UltraPure dNTP Mix, 10 mM each	1 $\mu$ l
RT Primer, 25 $\mu$ M	3 $\mu$ l
5 $\times$ SuperRT Buffer	4 $\mu$ l
SuperRT	0.5 $\mu$ l
RNase-Free Water	7.5 $\mu$ l

- 轻轻混匀上述反应液, 短暂离心将液体收集于管底。42 $^{\circ}$ C, 孵育 50 分钟。
- 85 $^{\circ}$ C, 孵育 5 分钟, 终止反应。合成的 cDNA 反应液可以直接进行荧光定量检测实验, 也可以于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

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。