



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

Cat. No. CW2151

产品简介

本试剂盒采用加A尾法来进行miRNA第一链cDNA的合成。其中的miRNA Enzyme Mix包含了*E.coli* Poly(A) Polymerase、RTase和RNase inhibitor。*E.coli* Poly(A) Polymerase不但具有高效的加A尾效率，还可特异性识别单链miRNA，从而避免了具有双链结构的miRNA前体的进一步逆转录反应。本产品中的2×miRNA RT Mix包含了miRNA加尾反应和逆转录反应所需的所有原料和引物，并经过精心优化，可保证miRNA 3'末端的Poly(A)修饰过程和逆转录过程在同时高效进行。后续qPCR只需设计特异性正向引物，配合试剂盒中的通用反向引物，即可对样本中的miRNA进行检测。

保存条件： -20℃保存。

有效期： 1年。

产品内容

Component	CW2151S 10rxns	CW2151M 50rxns
2×miRNA RT Mix	100μL	500μL
miRNA Enzyme Mix	15μL	75μL
RNase-free Water	1mL	1mL
Universal Reverse Primer	250μL	1.25mL

产品特征

1. 操作简单

加尾和逆转在一管中同步完成。

2. 灵敏度高/cDNA产量高

本试剂盒具有非常高的Poly(A)修饰和逆转录效率,可从10pg-2μg的Total RNA和>100copies的miRNA中有效获得miRNA对应的cDNA第一链。

3. 特异性好

能区分同家族miRNA间单碱基差异,可从一个反应合成的cDNA中同时检测多种miRNA,从而减少误差、节约样品。

4. 适用范围广

能对多种不同类型样本提取的miRNA进行逆转录反应。

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0.5M 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。

使用说明

1. 逆转录体系配制

请在冰上向RNase-free离心管中配制如下反应液:

组分	20μL体系	终浓度
2×miRNA RT Mix	10μL	1×
miRNA Enzyme Mix	1.5μL	-
Total RNA/miRNA*	XμL	可达2μg
RNase-free Water	To 20μL	

* 建议加入量为2-5μL,请根据目的miRNA的丰度来确定加入量

2. 逆转录程序

轻轻混匀上述反应液，短暂离心将液体收集于管底。按下表程序进行miRNA的逆转录反应：

反应温度	反应时间
37°C	60min
85°C	5min

· 合成的cDNA反应液应避免反复冻融，短期保存建议存放于-20°C，长期保存建议存放于-70°C；

· 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，为避免逆转录体系对定量PCR反应的抑制，可根据具体的Ct值，将cDNA反应液稀释10-1000倍后使用。

定量引物设计

1. 正向引物

- ◆ 建议根据完整miRNA序列设计miRNA正向特异性引物，并将其中的U替换为T。
- ◆ 若根据miRNA序列设计的正向特异性引物退火温度过低，建议在引物5'端增加几个碱基(以G和C为主)，增加碱基后需验证引物特异性，以免造成非特异性扩增；若引物退火温度过高，建议删去5'端几个碱基。
- ◆ 对于miRNA前体等长片段非特异性扩增，建议在正向特异性引物3'端增加1 - 3个A碱基。
- ◆ 对于序列相似的miRNA，建议正向特异性引物3'端终止于差异碱基，若由于引物长度过短而导致退火温度过低，可在引物5'端增加几个碱基，使上下游引物Tm值匹配。

2. 反向引物

本产品提供用于qPCR检测的反向通用引物Universal Reverse Primer，退火温度约为63.6°C。