

SynScript® III miRNA RT SuperMix(by tailing A) miRNA第一链cDNA合成试剂盒(加尾法)

■ 目录号

TSK3001

■ 产品简介

本产品是采用加尾法对miRNA进行逆转录并合成第一链cDNA的专用试剂。本产品中的RTase Mix主要由加尾酶和逆转录酶两种酶组成,通过加尾酶对miRNA链延长并在末端加上Poly(A)尾巴,然后在逆转录酶的作用下合成cDNA,具有高效的扩增能力和链置换活性。此外,2×Reaction Buffer包含dNTPs、逆转录引物等反应所需的所有原料和引物,并经过精心优化,可保证加尾反应和cDNA合成反应同步高效进行。

本产品采用双组分形式,可确保酶活稳定保持,且使整个实验过程操作简单、快速,从而大大降低了操作失误的可能性并有效节省了实验时间。

■ 产品组成

组分	规格(20次)
RTase Mix	40 μL
2× Reaction Buffer	200 μL
Universal miRNA qPCR Primer (10 μM)	500 μL
RNase-free Water	1.0 mL

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品应用

本产品为基于加尾法的miRNA逆转录试剂盒,产物可用于miRNA表达水平检测等试验。

■ 产品特点

- 使用方便,操作简单,无繁琐加样步骤;
- Poly(A)加尾反应和cDNA合成反应同步进行;
- 一次反应得到的cDNA能够用于对多种miRNA的检测。

■ 使用方法

1. 加尾与第一链cDNA合成

- 1) 将miRNA模板、RTase Mix、2×Reaction Buffer和RNase-free Water置于冰上融解备用。
- 2) 在无核酸酶的微量离心管中,按照下方表格在冰上配制反应体系(20 μL):

组分	用量
RTase Mix	2 μL
2× Reaction Buffer	10 μL
RNA模板 ^a	见标注
RNase-free Water	Up to 20 μL

a. RNA可选用量范围为10 ng~1 μg, 100 ng以上检测效率更高;推荐使用miRNA模板。

- 3) 使用移液器吹打混匀体系并短暂离心, 37°C孵育60 min, 85°C孵育5 min。
- 4) 反应得到的cDNA可根据实际需要调整稀释倍数, 推荐稀释10倍作为起始, 稀释后产物用于荧光定量检测。

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

2. qPCR定量检测

1) 引物设计

推荐使用成熟miRNA的全部序列(21-23 nt)作为qPCR定量检测的5'端特异性引物,3'端所需要的通用引物Universal miRNA qPCR Primer(10 μM)由本试剂盒提供。成熟miRNA序列可在miRBase数据库中查询。

例:检测小鼠组织中miRNA: mmu-miR-30a-5p

在数据库中找到mmu-miR-30a-5p的成熟序列为5'-UGUAAACAUCUCGACUGGAAG-3',则qPCR定量检测的5'端特异性引物为5'-TGTAACATCC TCGACTGGAAG-3',用该引物进行下一步的qPCR检测。

2) qPCR定量分析

qPCR定量分析使用擎科miRNA Universal SYBR qPCR Mix试剂盒(目录号:TSE2001)。按照下表配制反应体系:

组分	20 μL体系
miRNA Universal SYBR qPCR Mix	10 μL
特异性引物(10 μM)	0.4 μL
Universal miRNA qPCR Primer(10 μM)	0.4 μL
模板DNA ^b	见标注
50×ROX Reference Dye I/II ^c	0.4 μL
ddH ₂ O	Up to 20 μL

b. 推荐模板加样量为1~2 μL,如模板类型为未稀释cDNA原液,模板添加量不应超过总反应体系的10%;

c. 根据所用仪器类型,选择是否添加ROX或ROX类型。仪器类型详见TSE2001说明书。

按照下表设置反应程序:

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	1 min	1 cycle
循环反应	95°C	10 s	40 cycles
	60°C	20 s	

熔解曲线分析^d

d. 实验中使用仪器机型不同,熔解曲线采集程序也有不同,通常使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

■ 注意事项

- Universal miRNA qPCR Primer(10 μM)在进行后续qPCR定量检测时使用,逆转录过程不使用。
- 实验中应避免RNase污染,防止RNA降解或实验中的交叉污染。操作人员需佩戴口罩和一次性手套,实验中经常更换手套,使用专门的仪器和耗材。
- 为保证逆转录成功,请使用高质量的RNA。
- 本产品中各组分在冰上解冻后,应充分混匀并短暂离心后使用。

■ 保存和运输条件

-25~-15°C保存,保质期1年。

■ 技术支持

本产品使用过程中如有任何疑问与建议,欢迎随时与我们联系:
product@tsingke.com.cn。

