

Version 3

Cat No. AG11716

AG11717

miRNA cDNA 第一链合成试剂盒

miRNA 1st strand cDNA synthesis kit

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc.



➤ 产品概述

本制品是应用加 A 尾法进行 miRNA 第一链 cDNA 合成的试剂盒。先使用 Poly (A) Polymerase 在 miRNA 3' 末端加 A 尾, 再使用通用反转录引物【带有特定标签的 Oligo (dT) 引物】进行反转录反应, 最终生成 miRNA 的第一链 cDNA。该制品中 miRNA RT Enzyme Mix 包含加 A 尾酶和反转录酶, 2X miRNA RT Reaction Solution 含有通用反转录引物, 经过优化, 在同一反应体系中同时高效的完成加 A 尾和反转录反应, 简化了实验操作流程, 可减少试剂损失及实验误差。本制品适用于 Total RNA 或 Small RNA 等包含 miRNA 样品的反转录。

本制品包含后续 qPCR 检测所需引物 miRNA qPCR 3' primer。

➤ 产品组成

组分名称	AG11716 (10 rxns / 10 μ l)	AG11717 (50 rxns / 10 μ l)
miRNA RT Enzyme Mix ^{*1}	12.5 μ l	62.5 μ l
2X miRNA RT Reaction Solution ^{*2}	50 μ l	250 μ l
miRNA qPCR 3' primer (10 μ M) ^{*3}	250 μ l	625 μ l x 2 pcs
RNase free water	1 ml	1 ml

*1: 含有 Poly (A) Polymerase、*M-MLV* RTase、RNase Inhibitor;

*2: 含有通用反转录引物;

*3: 用于 qPCR 反应, Tm 值为 59°C。

➤ 保存

保存温度: -20°C

运输温度: 干冰运输或-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本试剂盒将 miRNA 的加 A 尾反应和逆转录反应合二为一, 使用方便, 可减少实验误差, 提高低丰度 miRNA 的检出率。
2. 本试剂盒可对 Total RNA 或 Small RNA 等包含 miRNA 的样品进行反转录。

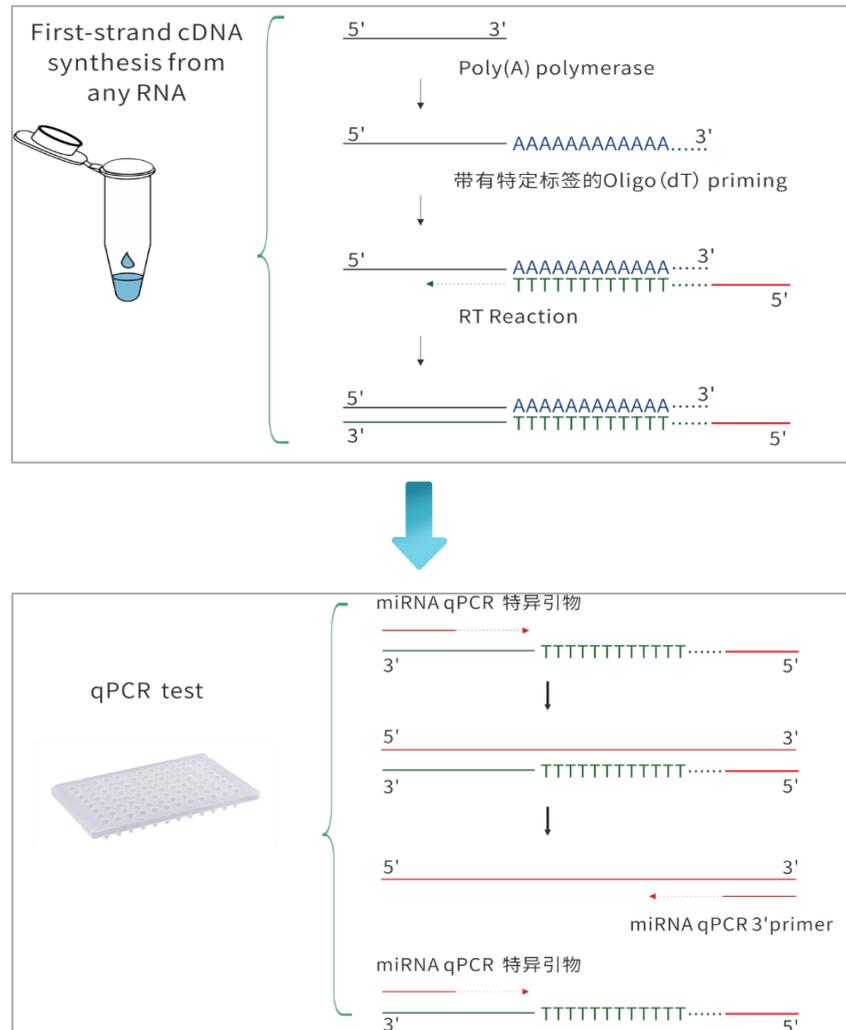
➤ 实验原理

miRNAs 是真核生物中一类非编码内源小分子 RNA, 它通过对靶 mRNA 的剪切或抑制靶 mRNA 的翻译来调控基因的表达, 从而对靶基因实施转录后水平调控。由于成熟的 miRNA

的长度只有 20 nt 左右，非常短，反转录之后无法进行定量检测，最常见的方法是在反转录时加 A 尾。

加 A 尾法是在 Poly (A) Polymerase 的作用下，以 RNA 为模板在 miRNA 的 3' 末端加入 20 ~ 200 个 A 碱基，为 cDNA 合成提供 Oligo (dT) 引物结合位点，然后在反转录酶的作用下，以带有特定标签的 Oligo (dT) 为引物进行反转录反应。

进行定量 PCR 时，以合成的 cDNA 为模板，以根据 miRNA 序列设计的特异引物与 miRNA qPCR 3' primer 进行 qPCR 检测。



➤ 使用注意事项

- miRNA RT Enzyme Mix 甘油浓度较高，使用前短暂离心将所有的溶液收集至离心管底部，减少损失；并用移液枪轻轻吸打混匀，过程中尽量避免起泡，然后再进行使用。
- 需要同时进行多个样本检测时，应先配制各种试剂的混合液，然后分装到每个反应管中。
- 所有反应混合液需要在冰上配制。

- 本品是由 RNA 制备 cDNA 的反转录试剂盒，进行反转录反应时需要注意防止 RNase 污染，需要使用灭菌的器具，操作过程中要避免说话，且需要穿戴实验服、一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。

➤ 实验前准备

1. PCR 仪 (或 37°C、42°C 水浴和 85°C 加热块)
2. RNase free 1.5 ml 离心管、PCR 管
3. 冰浴或冰盒
4. 移液器、枪头 (RNase free)

➤ 操作方法

1. 加 A 尾反应和第一链 cDNA 合成

1) 反应体系的配制 (10 μl)

组分名称	用量 (μl)
miRNA RT Enzyme Mix	1.25 μl
2X miRNA RT Reaction Solution	5 μl
Total RNA ^{*1}	20 ng ~ 2 μg
RNase free water	Up to 10 μl

*1: Total RNA 推荐用量: 20 ng ~ 2 μg, 最多可加至 8 μg。

2) 反应条件

37°C ^{*1}	60 min
85°C	5 min
4°C	-

*1: 如模板比较复杂，反转录效果不好时，可尝试提高反转录温度至 42°C。

注意:

- ❖ 反转录完成后，合成的 cDNA 反应液可放置于 -20°C 保存；也可以直接进行荧光定量检测。
- ❖ 在进行荧光定量检测时，建议将合成的 cDNA 稀释 10 倍，也可根据扩增情况，将合成的 cDNA 稀释倍数在 5 ~ 100 倍进行调整。

2. 定量 PCR 反应

经上述反转录过程得到的 cDNA 进行定量 PCR 分析。以本公司 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II (Code. AG11702) 为例，具体操作如下：

(以 ABI QuantStudio 5 或 Bio-Rad CFX 96 为例)

1) 配制 PCR 反应液

组分名称	反应终浓度	加入量
Template ^{*1}	-	2 μl
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix II	1X	10 μl
miRNA-specific primer (10 μM) ^{*2}	0.4 μM	0.8 μl
miRNA qPCR 3' primer (10 μM)	0.4 μM	0.8 μl
ROX Reference Dye (4 μM) ^{*3}	0.08 μM	0.4 μl
RNase free water	-	Up to 20 μl

*1: 模板为“加 A 尾反应和第一链 cDNA 合成”得到的 cDNA, 一般建议将 cDNA 稀释 10 倍使用 (稀释倍数可根据 CT 值进行适当调整)。

*2: miRNA 特异性引物, 根据目的 miRNA 进行设计。

*3: 如果需要使用 ROX 进行荧光信号校准, 请按照仪器推荐量添加; 若不需要使用 ROX, 可使用 RNase free water 代替。

2) qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序^{*1}:

	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec ^{*2}	1
Step 2	95°C	5 sec	} 40
	60°C	20 sec ^{*3}	
Step 3	Dissociation stage		

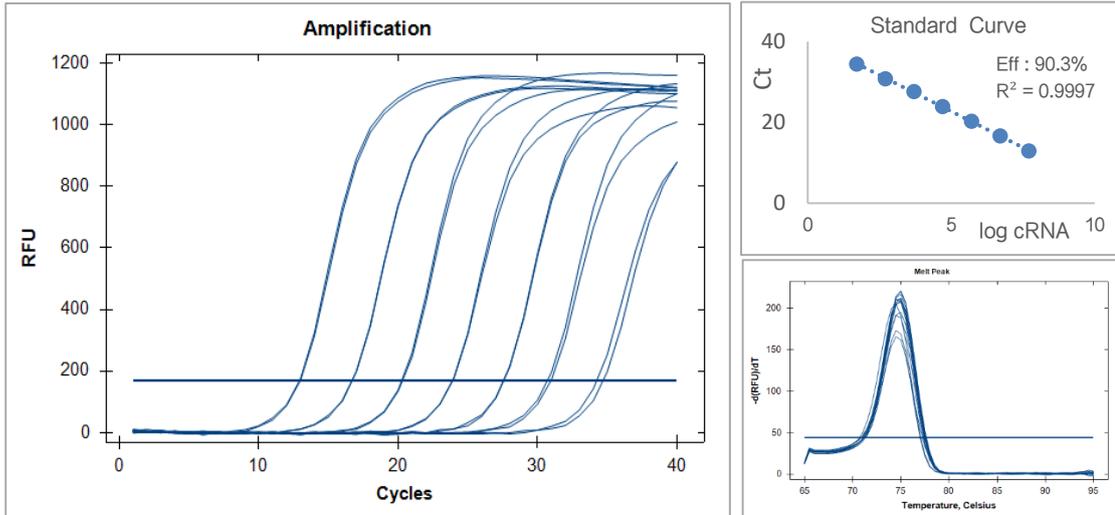
*1: 建议首先采用两步法 PCR 反应程序, 如果得不到良好的实验结果时再优化反应条件; 如果引物 T_m 值较低, 导致两步法扩增效率较差, 可采用三步法进行 PCR 扩增。

*2: 预变性时间通常设定为 30 sec, 如果模板变性困难, 可以延长预变性时间至 1~ 5 min。

*3: 扩增时延伸反应条件设定为 60°C 20 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高延伸温度; 如需提高扩增效率, 则可将反应延伸时间适当延长, 同时也可尝试进行三步法 PCR 扩增。

➤ 实验例

- 以合成的 miRNA *hsa-miR-571* (RNA 拷贝数分别是 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^1$ copies) 为模板, 采用本试剂盒进行反转录合成 cDNA, 并以公司产品 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II (Code. AG11702) 进行定量 PCR 检测。结果如下所示:

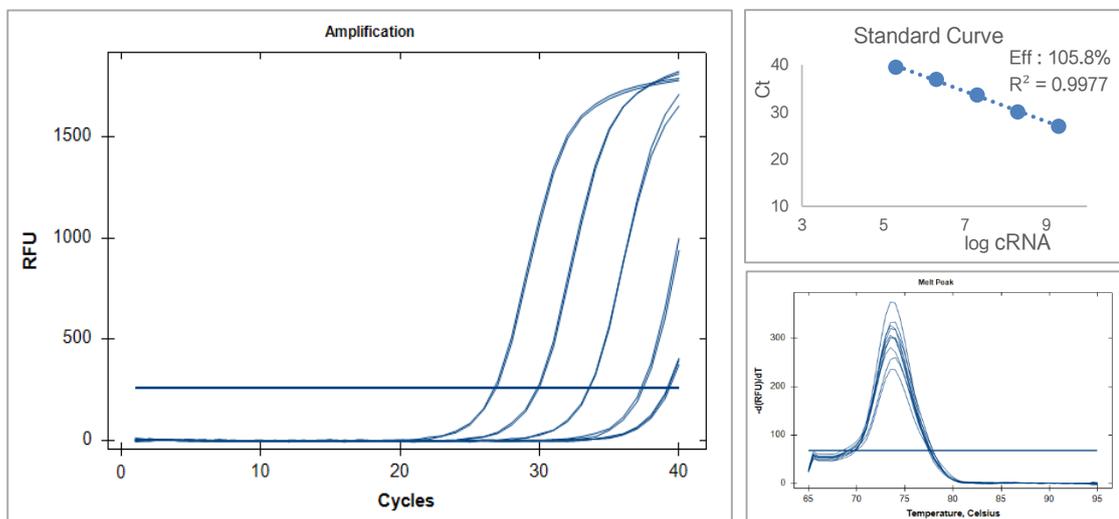


结果如上图：1、工作曲线 $R^2=0.9997$ ，扩增效率 90.3%。

2、可以在宽广的模板范围内进行准确的定量， $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^1$ copies RNA 浓度范围内的扩增曲线呈现良好的线性关系。

3、熔解曲线峰型单一、无杂峰，扩增特异性强。

2. 以土豆 Total RNA (RNA 量是 $2 \mu\text{g}$ 、 200 ng 、 20 ng 、 2 ng 、 200 pg) 为模板，采用本试剂盒进行反转录合成 cDNA，将得到的 cDNA 稀释 10 倍后，以公司产品 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II (Code. AG11702) 进行定量 PCR 检测 miRNA *stu-miR390-3p*。结果如下所示：

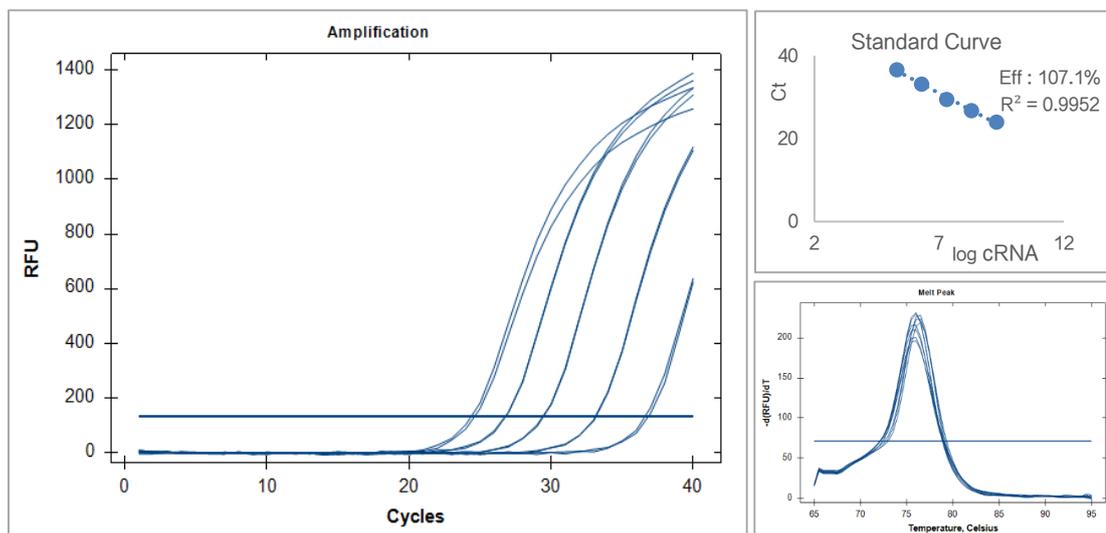


结果如上图：1、工作曲线 $R^2=0.9977$ ，扩增效率 105.8%。

2、在 $2 \mu\text{g} \sim 200 \text{ pg}$ RNA 浓度范围内的扩增曲线呈现良好的线性关系。

3、熔解曲线峰型单一、无杂峰，扩增特异性强。

3. 以 HL60 Total RNA (RNA 量是 2 μ g、200 ng、20 ng、2 ng、200 pg)为模板, 采用本试剂盒进行反转录合成 cDNA, 将得到的 cDNA 稀释 10 倍后, 以公司产品 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II (Code. AG11702) 进行定量 PCR 检测 miRNA *hsa-miR-4682*。结果如下所示:



结果如上图: 1、工作曲线 $R^2=0.9952$, 扩增效率 107.1%。

2、在 2 μ g ~ 200 pg RNA 浓度范围内的扩增曲线呈现良好的线性关系。

3、熔解曲线峰型单一、无杂峰, 扩增特异性强。

4. 用本试剂盒反转录经 DNase I 处理的 RNA, 然后定量 PCR 检测 miRNA *hsa-miR-4682*。操作步骤如下:

- ① 提取后的 HL60 Total RNA 用 DNase I (Cod. AG12001) 处理:

试剂	加入量 (μ l)
RNA 模板 (1 μ g / μ l)	10
10X DNase I buffer	5
DNase I (5U / μ l)	0.5
RNase Free Water	Up to 50 μ l

37°C, 反应 30 min;

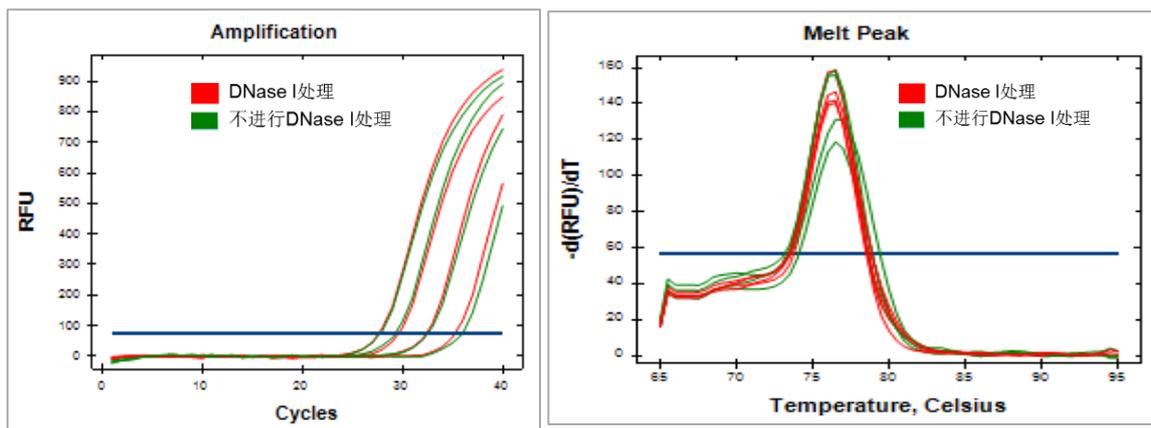
DNase I 的失活: 方法 1: 80°C 2 min。

方法 2: 加入 2.5 μ l 的 200 mM 的 EDTA 后混匀, 80°C 2 min。

经 DNase I 处理的 RNA 可保存于 -80°C 或者直接用于下述步骤 ②。

- ② 以 DNase I 处理的 RNA (RNA 量是 200 ng、20 ng、2 ng、200 pg)为模板, 采用本试剂盒进行反转录合成 cDNA, 将得到的 cDNA 稀释 10 倍后, 以公司产品 SYBR Green Premix *Pro Taq* HS qPCR Kit II (Code. AG11702) 进行定量 PCR 检测 miRNA *hsa-miR-4682*。

③ 结果显示，DNase I 处理后，对后续反转录无影响。结果如下所示：



➤ 产品注意事项

1. 保证模板的完整性及纯度

- ❖ RNA 的完整性: 如果模板中含有 RNase, 降解 RNA, 将会影响 cDNA 的产量及长度。建议在提取 RNA 过程中, 严防 RNase 污染, 采取特殊的保护措施, 如操作者佩戴口罩和口罩, 全程使用无 RNA 酶污染的实验耗材等。
- ❖ RNA 的纯度: RNA 纯化过程中混入的盐、金属离子、乙醇、苯酚、多糖多酚和腐殖酸等会抑制逆转录酶的活性。

2. 合适的定量引物

- ❖ 以成熟的 miRNA 序列为基础, 将 U 替换成 T, 设计正向引物。本试剂盒中提供了反向引物 miRNA qPCR 3' primer。
- ❖ 本试剂盒中提供的反向引物 miRNA qPCR 3' primer 的 T_m 值为 59°C, 正向引物 T_m 值与反向引物 T_m 值最好相差不超过 5°C。

➤ 附录 (三步法 PCR 反应程序)

	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec	1
Step 2	95°C	5 sec	} 40
	55°C ^{*1}	20 sec	
	72°C	20 sec ^{*2}	
Step 3	Dissociation stage		

*1: 退火温度可根据上下游引物的 T_m 值进行调整。

*2: 如扩增效率不理想, 可将反应延伸时间适当延长。