

Version 1

Cat No. AG11742
AG11743

miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (茎环法)

miRNA 1st strand cDNA synthesis kit (Stem-loop)

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

本产品是利用茎环法合成 miRNA 第一链 cDNA 的反转录试剂盒。相较于常规反转试剂盒，该制品反转录获得的 cDNA 可实现对低丰度 miRNA 的精准定量，具有反转效率高、特异性强等优点，合成得到的 cDNA 适合用于嵌合法 qPCR 分析。本制品适用于 Total RNA 或 small RNA 等包含 miRNA 样品的反转录。

➤ 产品组成

组分名称	AG11742 (10 rxns / 20 μ l)	AG11743 (50 rxns / 20 μ l)
5X miRNA RT Reaction Solution (Stem-loop)	40 μ l	200 μ l
miRNA RT enzyme mix (Stem-loop)	20 μ l	100 μ l
RNase free water	1 ml	1 ml

➤ 保存

保存温度：-20°C

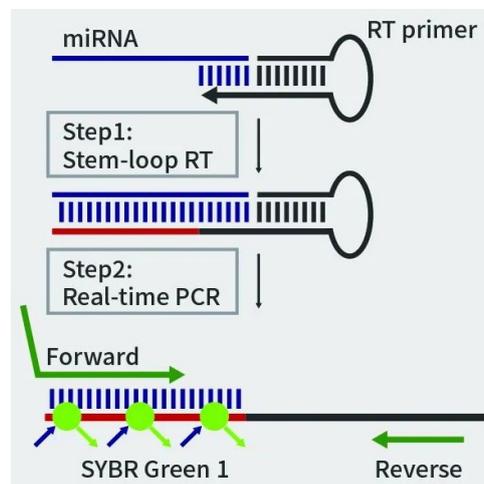
运输温度：干冰或者-20°C冰袋运输

➤ 产品优势

1. 本试剂盒可对 Total RNA 或 small RNA 等包含 miRNA 的样品进行反转录。
2. 经本制品反转得到的 cDNA，可实现对成熟 miRNA 的精确定量，具有很高的灵敏度和特异性。

➤ 实验原理

本制品是以 RNA 为模板，使用特异性茎环引物 (Stem-loop RT Primer) 和反转录酶合成 miRNA 第一链 cDNA 的试剂盒。Stem-loop RT Primer 主要由两部分组成：一是通用的茎环结构序列；二是 5~8 个与目的 miRNA 3'端反向互补的碱基序列。进行定量 PCR 时，以根据 miRNA 序列设计的特异性正向引物与通用茎环结构序列设计的反向引物进行 qPCR 检测。



➤ 使用前注意事项

- miRNA RT enzyme mix (Stem-loop) 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，并用移液枪轻柔吸打混匀（避免起泡），然后再进行使用。
- 需要几个样本同时进行检测时，可先配制各种试剂的混合液，然后分装到每个反应管中进行反应。
- 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，且需要穿实验服、戴一次性手套等防止 RNA 被污染或降解。

➤ 实验前准备

1. PCR 仪（或 25°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）

➤ 操作步骤

本试剂盒是利用 Stem-loop Primer，对 miRNA 进行反转录合成 cDNA 的试剂盒。如需进行下一步 qPCR 反应，可选择合适的定量产品使用。操作如下：

1. 反转录反应

按照下表在冰上配制反应液，置于 PCR 仪中进行反转录反应³。

组分名称	加入量
5X miRNA RT Reaction Solution (Stem-loop)	4 μl
miRNA RT enzyme mix (Stem-loop)	2 μl
Stem-loop RT Primer ^{*1} (10 μM)	0.5 μl
Total RNA ^{*2}	≤1 μg
RNase free water	Up to 20 μl

反应条件：25 °C	5 min
42 °C	15 min
85 °C	5 sec
4 °C	-

*1：根据 miRNA 序列设计特异性茎环反转录引物，引物推荐使用量为 0.25 μM，可在 0.1~0.4 μM 范围内调整。

*2: RNA 量可根据需要添加。在 20 μ l 反转录体系中, 最多使用 1 μ g Total RNA。

*3: 反转录获得的 cDNA 可立即用于后续 qPCR 反应或 -20°C 保存, 长期保存建议放置于 -80°C 。

2. 定量 PCR 分析

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

(以 ABI QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Systems 为例)

组分名称	反应终浓度	25 μ l 体系
2X SYBR Green <i>Pro Taq</i> HS Premix II	1X	12.5 μ l
cDNA ^{*1}	-	-
Primer F (10 μ M) ^{*2}	0.4 μ M	1 μ l
Primer R (10 μ M) ^{*2}	0.4 μ M	1 μ l
ROX Reference Dye (4 μ M) ^{*3}	0.08 μ M	0.5 μ l
RNase free water	-	Up to 25 μ l

*1: 定量 PCR 反应体系中, cDNA 原液使用体积不要超过定量 PCR 反应总体积的 10%。

*2: 引物通常使用终浓度为 0.4 μ M, 可根据实际情况在 0.1 ~ 1.0 μ M 范围内调整。

*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。

qPCR 反应条件

两步法 PCR 反应程序^{*1}:

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95 $^{\circ}\text{C}$	30 sec ^{*2}	1
Step 2	95 $^{\circ}\text{C}$	5 sec	} 40
	60 $^{\circ}\text{C}$	30 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 (三步法 PCR 反应程序可参考附录)。

*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: 通常情况下 PCR 扩增产物设计在 300 bp 以下, 扩增延伸反应条件设定为 60 $^{\circ}\text{C}$ 、30 sec 时可以满足要求; 如需提高反应特异性, 可适当提高退火温度; 如需提高扩增效率, 或者 PCR 扩增产物较长, 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。

➤ 产品注意事项

1. 保证模板的完整性及纯度

- ❖ RNA 的完整性：如模板中含有 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，如操作者佩戴手套和口罩，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反转录酶的活性。

2. 引物设计

- ❖ 反转录引物为通用的茎环结构（推荐的通用茎环序列为 GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC）加上 5~8 个与目的 miRNA 的 3' 端反向互补的碱基。
- ❖ 扩增反应的上游引物为去掉 miRNA 序列 3' 端 5~8 个碱基的剩余部分，如果 Tm 值或 GC 不合适，可在 5' 端加碱基进行调整；扩增反应的下游引物在通用的茎环序列上设计。

➤ 附录（三步法 PCR 反应程序）

步骤	温度	时间	循环数
Step 1	95°C	30 sec	1
Step 2	95°C	5 sec	40
	55°C	30 sec	
	72°C	30 sec	
Step 3	Dissociation stage		