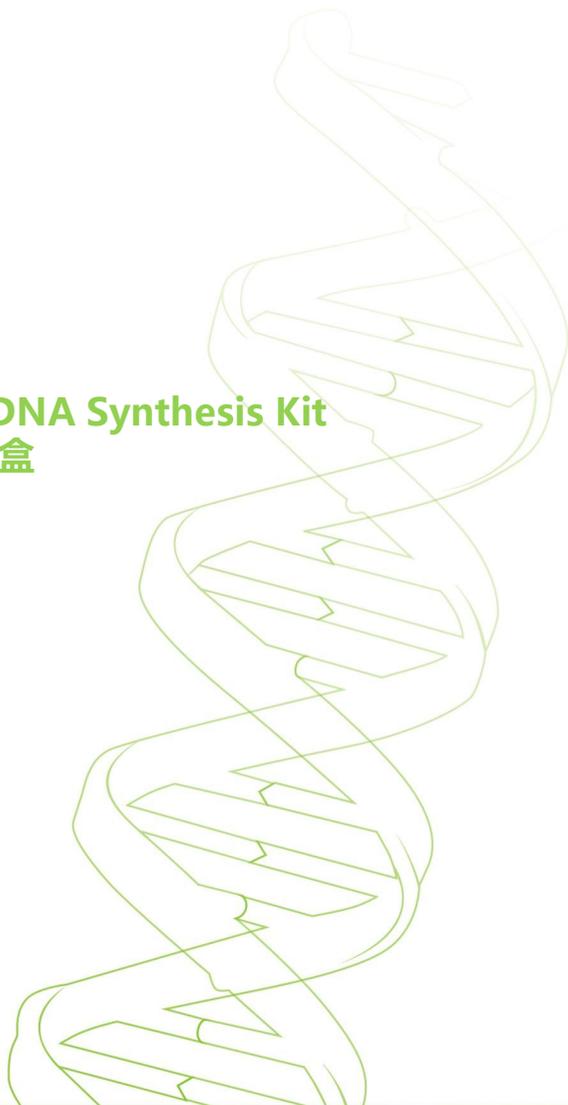


Imagene[®]

miRNA First-strand cDNA Synthesis Kit miRNA 第一链合成试剂盒



CODONX
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

miRNA First-strand cDNA Synthesis Kit

miRNA 第一链合成试剂盒

目录号: PR155

产品内容:

组成	PR155-01 (25次)
miRNA RT Enzyme Mix	50 μ l
2 \times miRT Reaction Mix	250 μ l
RNase free H ₂ O	1 ml

产品储存: -20 °C 保存。

制品说明: miRNA 第一链合成试剂盒本试剂盒采用在 Poly(A)加尾法原理, 首先 miRNA 3'末端加 Poly(A)尾, 再使用 Anchored oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物进行逆转录反应, 最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链。本试剂盒采用特殊优化预混合 mix 将 Poly(A)加尾和反转录合并为一步完成, 简化了操作步骤并提高 Poly(A)加尾和逆转录效率, 该试剂盒具有可从 20pg-2 μ g 的 total RNA 中有效制备 miRNA 对应的 cDNA 第一链。一次合成的 cDNA 可检测多个 microRNA, 节约了样品和成本。

注: 该试剂盒须与 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (PR156) 配套使用。

操作步骤:

一、miRNA 3'末端进行Poly (A)加尾和逆转录反应 (第一链合成)

1. 解冻2 \times miRNA RT Reaction Mix并混匀, miRT Enzyme Mix放于冰中备用, 加入以下试剂至总体积20 μ l (最后加入miRNA RT Enzyme Mix)。

Components	Volume (20 μ l)	Final Concentration
Total RNA	x μ l	Up to 2 μ g
2 \times miRT Reaction Mix	10 μ l	1 \times
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l (见注意事项)	-
RNase free H ₂ O to final volume	20 μ l	-

注意事项: miRNA RT Enzyme Mix 非常粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 使用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。Enzyme Mix内酶都是过量的, 即使每次按照1.8 μ l使用, 也不影响使用效果。

*在反应中使用的total RNA 必须含有小分子RNA (miRNA).此过程也可以使用富集的miRNA,单纯miRNA无法直接使用分光光度计定量, 建议加入量为2 μ l ~5 μ l。可根据目的miRNA丰度决定加入量, 但是对于低丰度miRNA 样品而言(如血清血浆提取物), 可直接加入最大体积8 μ l。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液, 短暂离心后在42 $^{\circ}$ C反应60 min。

85 $^{\circ}$ C加热5秒钟失活miRNA RT Enzyme Mix , 合成的cDNA反应液可放置于-20 $^{\circ}$ C保存; 也可以直接进行下游PCR或者荧光定量PCR检测。

二、按照 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (PR156) 进行real time PCR。

注: 按照上述操作步骤得到的cDNA模板用于下游PCR或者荧光定量PCR检测时, 可以根据实际情况选择使用量, 对于特殊的检测体系中, 高含量的cDNA模板易导致非特异性扩增, 可根据所检测miRNA的丰度适当的稀释cDNA (5-10倍或者100倍) 后使用。如果发现非特异扩增条带, 或者融链曲线显示有非特异扩增, 往往提示cDNA模板过量, 可以尝试将上述cDNA模板稀释几十到几百倍甚至上千倍再使用。



CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd

Yizhuang Biomedical Park
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic- Technological Development Area, Beijing, China
Tel: 010-56315162 www.codonx.com