

## 增强型 miRNA 第一链合成试剂盒

货号：MF0201

储存温度：-20 °C

### 产品组成

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| 组成                    | 25T    |
| miRNA RT Enzyme Mix   | 50 ul  |
| 2 × miRT Reaction Mix | 250 ul |
| RNase free H2O        | 1 ml   |

### 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 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-2ug 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 增强型荧光定量检测试剂盒 (MR0201) 配套使用

### 操作步骤

#### 一、miRNA3' 末端进行 Poly (A)加尾和逆转录反应 (第一链合成)

1. 解冻 2× 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 20μl(最后加入 miRNA RT Enzyme Mix)。

| Components                     | Volume       | Final Concentration |
|--------------------------------|--------------|---------------------|
| Total RNA                      | x μl         | Up to 2μg           |
| 2 × miRT Reaction Mix          | 10 μl        | 1 ×                 |
| miRNA RT Enzyme Mix            | 2 μl (见注意事项) | -                   |
| RNase free H2O to final volume | 20 μl        | -                   |

#### 注意事项：

(1) 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，用前请点甩离心，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 1.8μl 使用，也不影响使用效果。

(2) 在反应中使用的 total RNA 必须包含有小分子 RNA(miRNA)。此过程也可以使用富集的 miRNA，单纯 miRNA 无法直接用分光光度计定量，建议直接加入 2μl ~5μl。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 8μl。





2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在 42°C 反应 60 min。
3. 85°C 加热 5 秒钟失活 E.coli Poly(A) Polymerase 和 Labscript H<sup>-</sup> RTase。合成的 cDNA 反应液可放置于 -20°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 LABLEAD miRNA 增强型荧光定量试剂盒 (货号: MR0201) 进行定量 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。如果发现有非特异扩增条带，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。

