

MiRNA第一链合成试剂盒

KM408 25次

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM408(25 次)
miRNA RT Enzyme Mix	-20°C	50µl
2 *miRT Reaction Mix	-20°C	250µl
RNase free H ₂ O	-20°C	1ml

本试剂盒在-20°C储存 12 个月不影响使用效果。

产品介绍:

增强型 miRNA 第一链合成试剂盒本试剂盒采用 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 miRNA RT Enzyme 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-2µg 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。
3. 该试剂盒须与增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (KM410) 配套使用。

操作步骤: (实验前请先阅读注意事项)

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 * 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	Final Concentration
Total RNA*	x μ l	Up to 2 μ g
2 *miRNA RT Reaction Mix	10 μ l	1 x
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l (见注意事项)	-
RNase free H ₂ O to final volume	20 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°C反应60min。
3. 85°C加热5秒钟失活miRNA RT Enzyme Mix。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。

注意事项: 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。