

miRNACDNASynthesisKit

项目号: M665754

储存条件: -20℃。

产品内容

Component	M665754 25rxns
Tris-HCl, 1mM, PH8.0	1ml
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase, 5U/ μl	15 μl
10× Poly(A) Polymerase Buffer	80 μl
ATP, 10mM	15 μl
RT Primer, 25 μM	90 μl
5× SuperRT Buffer	120 μl
UltraPured NTP Mix, 10mM each	30 μl
SuperRT, 200U/μl	15 μl
RNase-Free Water	1ml

产品简介

本试剂盒采用在 miRNA 3' 末端加多聚 A 尾的方法来使 miRNA 具有 Poly(A) 尾, 之后再使用 Oligo(dT)-Universal tag 通用逆转录引物进行逆转录反应, 最终合成 miRNA 对应的第一链 cDNA。

miRNACDNA 第一链合成试剂盒包含 miRNA 3' 末端 Poly(A) 尾修饰过程及修饰后逆转录过程需要的全部试剂。该试剂盒具有非常高的 Poly(A) 修饰和逆转录效率, 可以从 1ng-2 μg 的 total RNA 中有效获得 miRNA 对应的 cDNA 第一链。并且操作简便、快捷, 可以用于从一个反应合成的 cDNA 中同时检测多种 miRNA, 不仅减少了误差、节约了样品, 同时还实现了检测的高通量。

备注: 本试剂盒须与 miRNA 荧光定量检测试剂盒配套使用。

自备实验材料: 1ng-2 μg 的总 RNA, 或 0.1ng-1 μg 的小分子 RNA。

注意事项

预防 RNase 污染, 应注意以下几方面:

1. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头, 避免交叉污染。
2. 玻璃器皿应在使用前于 180℃ 高温下干烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟, 用水彻底冲洗后高压灭菌。
3. 配制溶液应使用无 RNase 的水。

4. 操作人员戴一次性口罩和手套，实验过程中要勤换手套。

使用方法

A. miRNA 加 Poly(A) 尾的过程：

1. 首先根据所用 RNA 的量，按如下公式，用 1mMTris (PH8.0) 来稀释 10mMATP：ATP 稀释系数=5000/___ng 的总 RNA

例：如果总 RNA 的起始用量为 100ng，那么 ATP 稀释系数=5000/100=50。即将 ATP 稀释 50 倍（1 μl 的 10mMATP 加 49 μl 的 1mMTris, PH8.0）。

2. 向冰浴中预冷的无 RNase 反应管中加入以下试剂至总体积 25 μl。

试剂	25 μl 反应体终浓度	
	系	
totalRNA*	X μl	可达 2 μg
10 Poly(A)PolymeraseBuffer	×2.5 μl	1×
第“1”步中稀释好的 ATP	1 μl	
E. coliPoly(A)Polymerase, 5 U/μl	0.5 μl	2.5U
RNase-FreeWater	upto25 μl	—

*反应中使用的 totalRNA 必须含有小分子 RNA。

此过程也可以直接使用小分子 RNA（建议加入量为 2-5 μl。请根据目的 miRNA 的丰度来确定加入量）。

3. 轻轻混匀上述反应液，短暂离心将液体收集于管底。37℃，孵育 15 分钟。此过程结束后，立刻进行第一链 cDNA 的合成，或于-20℃暂存。如需长期保存，建议存放于-80℃。

B. 修饰后的 miRNAcDNA 第一链合成的过程：

1. 向冰浴中预冷的无 RNase 反应管中加入下表中试剂，至终体积 20 μl：

试剂	20 μl 反应体
	系
上述 Poly(A) 反应液	4 μl
UltraPuredNTPMix, 10mMeachl μl	
RTPPrimer, 25 μM	3 μl
5×SuperRTBuffer	4 μl
SuperRT, 200U/μl	0.5 μl
RNase-FreeWater	7.5 μl

2. 轻轻混匀上述反应液，短暂离心将液体收集于管底。42℃，孵育 50 分钟。

3. 85℃，孵育 5 分钟，终止反应。合成的 cDNA 反应液可以直接进行荧光定量检测实验，也可以于-20℃保存备用。

