



miRNA cDNA Synthesis Kit

目录号：CW2141S (25 rxns)

保存条件：-20℃

产品内容

Component	CW2141S 25 rxns
Tris-HCl, 1 mM, PH8.0	1 ml
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase, 5U/μl	15 μl
10×Poly(A) Polymerase Buffer	80 μl
ATP, 10 mM	15 μl
RT Primer, 25 μM	90 μl
5×SuperRT Buffer	120 μl
UltraPure dNTP Mix, 10 mM each	30 μl
SuperRT, 200 U/μl	15 μl
RNase-Free Water	1 ml

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。

miRNA cDNA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1 ng-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（CW2142）配套使用。

自备实验材料：1 ng-2 µg的总RNA，或0.1 ng-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0.5 M 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1 mM Tris (PH8.0) 来稀释10 mM ATP:

$$\text{ATP稀释系数} = 5000 / \text{ng的总RNA}$$

例: 如果总RNA的起始用量为100 ng, 那么ATP稀释系数=5000/100=50。即将ATP稀释50倍 (1 μ l的10 mM ATP加49 μ l的1 mM Tris, 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 μ l。

试剂	25 μ l反应体系	终浓度
total RNA*	X μ l	可达2 μ g
10 \times Poly(A) Polymerase Buffer	2.5 μ l	1 \times
第“1”步中稀释好的ATP	1 μ l	—
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase, 5U/ μ l	0.5 μ l	2.5 U
RNase-Free Water	up to 25 μ l	—

*反应中使用的total RNA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 μ l。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 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C暂存。如需长期保存, 建议存放于-80 $^{\circ}$ C。

B. 修饰后的miRNA cDNA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 μ l:

试剂	20 μ l反应体系
上述Poly(A)反应液	4 μ l
UltraPure dNTP Mix, 10 mM each	1 μ l
RT Primer, 25 μ M	3 μ l
5 \times SuperRT Buffer	4 μ l
SuperRT, 200 U/ μ l	0.5 μ l
RNase-Free Water	7.5 μ l

2. 轻轻混匀上述反应液, 短暂离心将液体收集于管底。42 $^{\circ}$ C, 孵育50分钟。
3. 85 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C保存备用。

本产品仅供科研使用, 请勿用于临床诊断及其它用途