

版本号: KR151125

miRcute miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit

miRcute miRNA cDNA第一链合成试剂盒

目录号: KR201

产品内容

产品组成	KR201-01 (25 rxn)	KR201-02 (50 rxn)
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase(5 U/μl)	14 μl	28 μl
10× Poly(A) Polymerase Buffer	60 μl	120 μl
5× rATP Solution	120 μl	240 μl
10× RT Primer(10 μM)	60 μl	120 μl
10× RT Buffer	70 μl	150 μl
Super Pure dNTPs (2.5 mM each)	30 μl	60 μl
RNasin (40 U/μl)	30 μl	2× 30 μl
Quant RTase	15 μl	30 μl
RNase-Free ddH ₂ O	1 ml	1 ml

储存条件

-20℃ 保存

产品简介

本试剂盒采用在miRNA 3'末端加多聚A尾Poly(A)，再使用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。

miRcute miRNA cDNA第一链合成试剂盒包含miRNA 3'末端Poly(A)修饰过程和逆转录过程的所有试剂，该试剂盒具有高效的Poly(A)修饰和逆转录效率，可从20 pg-2 μg的total RNA中有效制备miRNA对应的cDNA第一链。

注：该试剂盒须与miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒（FP401）配套使用

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

预防RNase污染，应注意以下几方面：

1. 经常更换新手套。因为皮肤经常带有细菌，可能导致RNase污染。
 2. 使用无RNase的塑料制品和枪头避免交叉污染。
 3. RNA在裂解液中不会被RNase降解。但提取后继续处理过程中应使用不含RNase的塑料和玻璃器皿。玻璃器皿可在150℃烘烤4 h，塑料器皿可在0.5 M NaOH中浸泡10 min，然后用水彻底清洗，再灭菌，即可去除RNase。
 4. 配制溶液应使用无RNase的水。（将水加入到干净的玻璃瓶中，加入DEPC至终浓度0.1%(v/v)，放置过夜，高压灭菌。）
-

操作步骤

一、miRNA 3' 末端进行加Poly (A)处理

1. 在冰上预冷RNase Free 的反应管内加入以下试剂至总体积20 μ l (最后加入 *E. coli* Poly(A) Polymerase)

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA*	-	可达2 μ g
<i>E. coli</i> Poly(A) Polymerase(5 U/ μ l)	0.4 μ l	2 U
10 \times Poly(A) Polymerase Buffer	2 μ l	1 \times
5 \times rATP Solution	4 μ l	1 \times
RNase-Free ddH ₂ O	补水至20 μ l	-

***在反应中使用的Total RNA 必须含有小分子RNA.**

此过程也可以使用小分子RNA (建议加入量为2-5 μ l。请根据目的miRNA丰度决定加入量)。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在37 $^{\circ}$ C反应60 min。所得的反应液可以直接进行下游实验，也可以放置-20 $^{\circ}$ C短暂保存。如需长期保存建议存放于-80 $^{\circ}$ C。
-

二、Poly (A)修饰的miRNA 进行逆转录反应

1. 按照下表组分进行反应液的配制

试剂组分	体积
Poly(A) 反应液	2 μ l
10 \times RT Primer	2 μ l
10 \times RT Buffer	2 μ l
Super Pure dNTPs (2.5 mM each)	1 μ l
RNasin (40 U/ μ l)	1 μ l
Quant RTase	0.5 μ l
RNase-Free ddH ₂ O	11.5 μ l
Total 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37 $^{\circ}$ C反应60 min。

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荧光定量检测。
