

microRNA Reverse Transcription Kit PLUS

说明书

Cat. No.: EZB-miRT2-plus

一、产品简介

本试剂盒采用 Poly(A)加尾反应和 cDNA 合成反应同步进行的方法来进行 microRNA 第一链 cDNA 的合成,包含了与此配套的通用型 qPCR 反向引物 (Universal 3' qPCR Primer) 和常用内参 U6 的 qPCR 正向引物 (U6 Primer), 仅需自行设计一条目的 microRNA 的特异性正向引物, 就能够很好地用于 microRNA 的定量检测。具体过程是, 先通过 Poly(A) Polymerase 在 microRNA 的 3' 末端加多聚 Poly(A) 尾, 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 microRNA 的 cDNA 第一链。

本试剂盒为包含去除基因组 DNA 的高效 DNase 的快速逆转录试剂盒, 主要含有 5 管试剂: gDNA Remover、miRNA RT Enzyme Mix、4× miRNA RT Buffer、Universal 3' qPCR Primer 和 U6 Primer。其中, gDNA Remover 中主要包括浓缩的 DNase 和 Buffer, 仅需室温 (15 ~ 25°C) 反应 5 min, 就能降解 95% 以上的基因组 DNA, 极大的降低了可能残留的基因组对结果的干扰。

miRNA RT Enzyme Mix 中主要包含了 Poly(A) Polymerase、逆转录酶、RNase Inhibitor。其中的 Poly(A) Polymerase 不但具有高效的加 A 尾效率, 还可特异性识别成熟的单链 miRNA, 从而避免了具有双链结构的 miRNA 前体的逆转录反应; 逆转录酶采用新型 M-MLV 突变体逆转录酶, 具有很强的抗干扰能力及扩增能力, 扩增效率优异。

4× miRNA RT Buffer 包含了 miRNA 加 A 尾反应和逆转录反应的所有原料和引物, 包括 Oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物、Buffer 和 dNTPs, 并经过精心优化, 可保证 miRNA 3' 末端的 Poly(A) 修饰过程和逆转录过程同时高效进行。

二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZB-miRT2-plus-S (20 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZB-miRT2-plus-L (50 Rxns, 20 µl/Rxn)
gDNA Remover		22 µl	55 µl
miRNA RT Enzyme Mix		44 µl	110 µl
4× miRNA RT Buffer		110 µl	275 µl
Universal 3' qPCR Primer (10 µM)		300 µl	750 µl
U6 Primer (10 µM)		60 µl	150 µl
Nuclease free ddH ₂ O		1 ml	1 ml

三、保存条件

本产品所有组分建议置于 -20°C 保存。过期日期详见产品标签中的有效期信息。

四、操作步骤

使用前将 gDNA Remover、miRNA RT Enzyme Mix 和 4× miRNA RT Buffer 从冰箱中取出, 室温放置 5 ~ 10 min 或用手握紧试剂管使之充分融化, 分别上下颠倒 10 次使之充分混匀 (很重要), 然后使用离心机短暂离心将管壁上附着的液体甩下来, 置于冰上待用。

一、去除基因组 DNA 反应

1. 用 gDNA Remover 处理 RNA: 取 100 ng ~ 1 µg 含 miRNA 的总 RNA 或者 10 ~ 20 ng miRNA (一般建议用 0.5 µg 的总 RNA), 加入 1 µl 的 gDNA Remover, 加 Nuclease free ddH₂O 至 13 µl (RNA 最大体积为 12 µl), 用移液器轻柔吹打 10 次左右使之充分混匀, 使用离心机短暂离心至管底, 然后室温 (15 ~ 25°C) 反应 5 min, 反应结束后置于冰上。

二、加尾和逆转录反应

2. 上述步骤反应结束后, 按照如下体系配制加尾和逆转录同步反应体系:

成分	体积 (20 µl 体系)
gDNA Remover 处理过的 RNA	13 µl
4× miRNA RT Buffer	5 µl
miRNA RT Enzyme Mix	2 µl

3. 按照上表加好试剂后, 必须用移液器轻柔吹打 10 次左右使之充分混匀 (很重要, 混匀时建议将移液器量程调到 18 µl 左右)。

4. 逆转录反应条件: 37°C 反应 15 min, 42°C 反应 10 min, 95°C 反应 3 min, 即可得到包含所有 miRNA 的 cDNA 第一链。

5. 逆转录反应得到的 cDNA 可直接作为模板进行 qPCR 反应, 或者稀释 5 ~ 10 倍后再使用 (具体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定)。在 20 µl 的 qPCR 反应体系中: 如果模板 cDNA 不稀释, 建议使用 0.4 µl 的 cDNA (0.2 ~ 0.8 µl); 如果模板 cDNA 稀释 5 倍, 建议使用 2 µl 的 cDNA (1 ~ 4 µl); 如果模板 cDNA 稀释 10 倍, 建议使用 4 µl 的 cDNA (2 ~ 8 µl)。如不立即进行 qPCR 实验, 建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中。

五、关于 microRNA 的 qPCR 正向引物的设计

1. 首先, 在 microRNA 数据库网站 (例如 miRBase, 网址: <http://www.mirbase.org/>) 上搜索得到目的 microRNA 序列。
2. 复制目的 microRNA 序列, 将其中的 U 改成 T, 然后去掉 3' 端的最后 6 个碱基。
3. 在 5' 端加上 3 ~ 6 个碱基 (目的是提高引物的 T_m 值, 加入的序列以 GC 为主, 例如 CGGGC, GCGGGC, A/TGCCCC 等), 使上下游引物的 T_m 值相近, 得到最终的正向引物序列。