

microRNA Reverse Transcription Kit

说明书

Cat. No.: EZB-miRT4

一、产品简介

本试剂盒采用 Poly(A)加尾反应和逆转录反应同步进行的方法来进行 microRNA cDNA 第一链的合成，与 microRNA 的探针法 qPCR 系列试剂盒(货号: EZB-miProbe / EZB-miProbe-R0 / EZB-miProbe-R1 / EZB-miProbe-R2)配套使用。具体过程是，先通过 Poly(A) Polymerase 在 microRNA 的 3'末端加 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 3 管试剂: gDNA Remover、miRNA RT Enzyme Mix 和 4× miRNA RT Buffer。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 Poly(A)加尾反应效率，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 Poly(A)加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)加尾过程和逆转录过程同步高效进行。

二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZB-miRT4-S (20 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZB-miRT4-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
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 μ l 体系）
gDNA Remover 处理过的 RNA	13 μ l
4 \times miRNA RT Buffer	5 μ l
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l

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 μ l 左右）。

4. 逆转录反应程序：37°C 反应 15 min，42°C 反应 10 min，95°C 反应 3 min，反应结束后即可得到包含所有 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 μ l 的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 0.4 μ l 的 cDNA（0.2 ~ 0.8 μ l）；如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 2 μ l 的 cDNA（1 ~ 4 μ l）；如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 4 μ l 的 cDNA（2 ~ 8 μ l）。如不立即进行 qPCR 实验，建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中。