

4× microRNA Reverse Transcription Mix

说明书

Cat. No.: EZB-miRT3

一、产品简介

本试剂盒是基于茎环法合成 miRNA cDNA 第一条链的专用试剂盒，含有基因组 DNA 去除步骤，在室温条件下反应 5 min 即可去除基因组 DNA 的污染，保证了后续实验结果更加准确。本试剂盒主要包含两管试剂：gDNA Remover 试剂中主要包含浓缩的 DNase 及 Buffer；4× miRNA RT Mix 试剂中主要包含了逆转录所需的除引物以外的所有成分（逆转录酶、Buffer、RNase Inhibitor、dNTPs 等）。只需根据本试剂盒提供的茎环序列和目的 miRNA 的序列设计针对目标 miRNA 的特异性逆转录引物，就可快速合成 miRNA cDNA 第一链。

本试剂盒采用的新型 M-MLV 突变体逆转录酶具有很强的抗干扰能力及扩增能力，扩增效率尤佳，15 min 得到的扩增产物量可以达到 AMV 逆转录酶大约 1 h 的产物量（Ct 值相同），因此极大的提高了 miRNA 的逆转录效率。后续逆转录产物建议用于 PCR、qPCR 等实验。

二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZB-miRT3-S (50 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZB-miRT3-L (100 Rxns, 20 µl/Rxn)
gDNA Remover		55 µl	110 µl
4× miRNA RT Mix		275 µl	550 µl
Nuclease free ddH ₂ O		1 ml	2 ml

三、保存条件

本产品所有组分建议置于-20℃保存。过期日期详见产品标签中的有效期信息。

四、茎环引物设计

本试剂盒适用于茎环法逆转录，需要根据每一种目的 miRNA 的序列合成特异性的逆转录引物。本试剂盒推荐的通用逆转录茎环序列为 5' - GTCGTATCCAGTGCAGGG - TCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC - 3'。因此，针对每一种目的 miRNA 的特异性逆转录引物序列可以设计为：5' - GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACT - GGATACGAC - 3' + **miRNA RCS** (Reverse Complementary Sequence, 即每一种成熟的目的 miRNA 3'末端 6~8 个碱基的反向互补序列)【成熟 miRNA 的序列可以从 NCBI 基因数据库或者 miRBase 中查询获取】。

五、操作步骤

使用前将 gDNA Remover 和 4× miRNA RT Mix 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 μ l 的 gDNA Remover，加 Nuclease free ddH₂O 至 14 μ l (RNA 最大体积为 13 μ l)，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、逆转录反应

2. 上述步骤反应结束后，按照如下体系配制逆转录反应体系：

成分	体积 (20 μ l 体系)
gDNA Remover 处理过的 RNA	14 μ l
4 \times miRNA RT Mix	5 μ l
Stem-loop primer (2 μ M)	1 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. 逆转录反应条件：42°C 反应 15 min，95°C 反应 30 sec，即可得到目的 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。

六、关于 microRNA 的 qPCR 引物的设计

正向 qPCR 引物序列的设计原则如下：

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/TGCCCCG 等)，使上下游引物的 T_m 值相近，得到最终的正向引物序列。

反向 qPCR 引物序列可以设计如下：

5' - GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC - 3' (从通用逆转录茎环序列中根据正向 qPCR 引物的 T_m 值选择 18 ~ 23 个核苷酸)。