天净沙系列

CAT#:931042-2

低温运输，-20℃保存

天净沙

miRNA RT 试剂盒（加尾法）

miRNA RT Kit (Tailing Method)

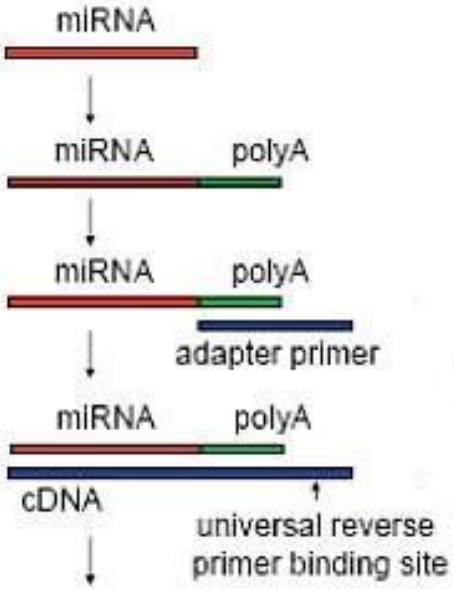
使用手册 V0.5

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

本试剂盒采用E.coli polyA聚合酶对miRNA加尾，然后用特异引物进行逆转录，其原理示意图如下：



本产品具有下列特点：

1. 一步完成加尾-逆转录，得到的 cDNA 可以做上百次 PCR。
2. 直接用总 RNA 为模板，不需要专门纯化 miRNA，简单快捷。
3. 检测灵敏度可以达到几百个拷贝/反应。
4. 能区分有 2-3 个碱基不同的 miRNA。
5. 所得到的 cDNA 既可以用于定性，也可以用于定量。定量时线性范围至少有 5 个数量级，但需要自备标准品。
6. 既可以用总 RNA 为模板，也可以用总 miRNA 为模板。
7. 用户需要自备 miRNA 专一性的一条 PCR 上游引物。
8. 本产品足够 25 次 20 μL 体系的加尾和逆转录反应。

本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品使用 logo 热封袋包装

成分	编号	规格	包装
加尾和逆转录 Mix (含 dNTP 和 ATP)	931042-2a	150 μL	0.5 mL 绿盖管
miRNA-polyA RT 引物	931042-2b	干粉	0.5 mL 本色管
E.coli polyA 聚合酶和 M-MLV 逆转录酶混合液	931042-2c	40 μL	0.5 mL 红盖管
超纯水	980403	1 mL	2.0 mL 蓝盖管
使用手册	931042-2sc	1 份	无

运输及保存	低温运输，-20℃保存，有效期一年。
自备物品	总 RNA、miRNA 专一性上游引物（5 pmol/μL in 水中）。
使用方法	**一、 设计、合成和分析自备的 miRNA 专一性上游引物** 1. 本试剂盒需要用户自行设计一条 miRNA 靶分子专一性的上游引物跟试剂盒提供的通用引物共同使用，用超纯水稀释到 5 pmol/μL 待用。 2. **miRNA 专一性上游引物的 Tm 值决定后续 PCR 的复性温度，非常重要，故必须准确**。可以通过网上的在线分析软件（如 oligoanalyzer）计算 Tm，但最好实验测定，做法是将 100 pmol miRNA 专一性上游引物和等量的互补引物（不是下游引物）在 20 μL 的自备的 2×SYBR PCR MasterMix 反应体系中混合，直接进行溶解曲线分析，测出在本试剂盒提供的反应体系中的 Tm 值。当软件计算的 Tm 值和实验测试的 Tm 值有差异时，以后者为准。 3. miRNA 专一性上游引物最好在 3 端比 miRNA 短几个碱基。 4. 可以选择一个所研究物种的 5.8S rRNA 作为内参，设计一条 5.8S rRNA 专一性的引物，同时做平行实验。 **二、 准备总 RNA** 5. 用自选方法和试剂纯化总 RNA，测定其浓度，最后用超纯水将其稀释到 100 ng/μL。总 RNA 样品中残留的 DNA 污染由于并没有下游通用引物（miRNA-polyA RT 引物）的结合位点，所以一般不会干扰基于本方法的 miRNA PCR 检测。 **三、 加尾及逆转录反应** 6. 按下表设置 RNA 加尾和逆转录反应，以 1 个样品为例：

加入组分	体积
自备的总 RNA，100 ng/μL	2.0 μL
加尾和逆转录 Buffer （含 dNTP 和 ATP）	5.5 μL
miRNA-polyA RT 引物	1.0 μL
E.coli polyA 聚合酶和 M-MLV 逆转录酶混合液	1.5 μL
合计	10 μL

7. 37℃保温 1 小时。
8. 加入 190 μL 超纯水使得总体积为 200 μL（稀释 20 倍），此样品将作为 cDNA 模板用于 PCR。未用完的 cDNA 20 倍稀释样品可以放-20℃至少两年以上。

关联产品	miRNA 纯化试剂盒

20260119qjy