



产品描述

ProQ™ miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit 采用在 miRNA 3' 末端加多聚 A 尾 Poly(A), 再使用 Anchored 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。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 20pg-2 μg 的 total RNA 中有效制备 miRNA 对应的 cDNA 第一链。一次合成的 cDNA 可检测多个 microRNA, 节约了样品和成本。该试剂盒须与 ProQ™ miRNA 荧光定量检测试剂盒 (PQ711) 配套使用。

产品应用

用于 miRNA cDNA 第一链合成试。

产品组成

组份	PQ611-01 25rxn(20μ l/rxn)	PQ611-02 50rxn(20μ l/rxn)
<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	50U	
10 × Poly(A) Polymerase Buffer	100 μl	
10 × rATP solution	50 μl	
25μ mol RT primer	50 μl	
HiPro™ (H-) Reverse Transcriptase (200U/μl)	5000 U	
5×RT Reaction Mix	200 μl	
RNase free H ₂ O	1 ml	PQ611-01×2

产品储存

-20°C储存。

注意事项

1. 本制品不含参比染料 ROX, 客户并根据 qPCR 仪器技术指导决定是否要加 ROX 参比染料, 用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, 配套 Rox Reference Dye (货号 : PQ914) 可另行购买。
2. 本制品含有 4 mM MgCl₂ (反应体系终浓度是 2 mM Mg²⁺), 可用 25mM MgCl₂ 优化 Mg²⁺ 浓度。



操作步骤

1. 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)

Components	Volume (50 μ l)	Final Concentration
ddH ₂ O	to 20 μ l	
Total RNA	x μ l	Up to 2 μ g
10 \times Poly(A) Polymerase Buffer	2 μ l	1 \times
10 \times rATP solution	2 μ l	1 \times
<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase (5U/ μ l)*	0.4 μ l	2U

★ *E.coli* Poly(A) Polymerase (5U/ μ l)非常粘稠和微量，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照 0.3 μ l 使用，也不影响使用效果。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 μ l ~4 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°C反应 30-60 min。所得的 Poly(A)反应液可以立即进行第一链合成，也可以放置-20°C短暂保存。如需长期保存建议存放于-80°C。

2. 加Poly (A)修饰后的miRNA 进行逆转录反应 (第一链合成)

1). 按照下表组分冰上进行反应液的配制

ddH ₂ O	to 20 μ l
上述 Poly(A) 反应液	2 -4 μ l
25 μ mol RT primer	2 μ l
5 \times RT Reaction Mix	4 μ l
HiPro (H-) Reverse Transcriptase (200U/ μ l)*	0.8-1 μ l

★ HiPro™ (H-) Reverse Transcriptase 非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照 0.8 μ l 使用，也不影响使用效果。

2). 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在 42°C反应 50min。

3). 70°C加热 15 min 失活 HiPro™ (H-) Reverse Transcriptase。合成的 cDNA 反应液可放置于-20°C保存；也可以直接进行下游 PCR 或者荧光定量 PCR 检测。

注：按照上述操作步骤得到的 cDNA 模板用于下游 PCR 或者荧光定量 PCR 检测时，可以根据实际情况选择使用量，如果发现非特异扩增条带，或者融链曲线显示非特异扩增，往往提示 cDNA 模板过量，可以将上述 cDNA 模板稀释几十到几百倍甚至上千倍再使用。