

miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop)

MR101

Version 22.1



产品概述

miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit(by stem-loop)是适用于茎环法miRNA cDNA一链合成的专用试剂盒，含基因组DNA去除步骤，可以在42°C 2 min条件下快速去除基因组DNA的污染，保证后续结果更加可靠。Kit基于的HiScript II Reverse Transcriptase具有极高的热稳定性，配以针对优化的缓冲体系，均有利于miRNA特异性逆转录产物的生成。cDNA产物后续定量，推荐使用本公司的miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme #MQ101)，以获得最优的实验结果。

产品组分

| 组 分 | MR101-01 (50 rxns/20 µl reaction) | MR101-02 (100 rxns/20 µl reaction) |
|---|-----------------------------------|------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> RNase-free ddH ₂ O | 1 ml | 1 ml |
| <input checked="" type="checkbox"/> 5 × gDNA Wiper Mix | 100 µl | 200 µl |
| <input checked="" type="checkbox"/> 10 × RT Mix ^a | 100 µl | 200 µl |
| <input checked="" type="checkbox"/> HiScript II Enzyme Mix ^b | 100 µl | 200 µl |

a. 包含dNTP

b. 包含RNase inhibitor

保存条件

-30 ~ -15°C保存，≤0°C运输。

适用范围

适用于茎环法miRNA、cDNA一链合成。

注意事项

1. 防止RNase污染

保持实验区域洁净；操作时需穿戴干净的手套、口罩；实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证RNase-free。

2. 5 × gDNA Wiper Mix的使用

5 × gDNA Wiper Mix含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心收集到反应管底部，并用移液器轻轻吹打混匀。不应使枪头插入液面过深，否则会因枪头壁的粘附造成酶量的损失。

3. 反应液的配制请在冰上操作完成

实验流程

1. 基因组DNA去除

a. 在RNase-free离心管中配制如下混合液：

| | | |
|-------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| RNase-free ddH ₂ O | to 10 µl | <input type="checkbox"/> |
| 5 × gDNA Wiper Mix | 2 µl | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Total RNA | 10 pg - 1 µg | |

用移液器轻轻吹打混匀。

b.按下列条件进行基因组DNA去除反应：

42°C 2 min

2. 第一链cDNA合成

a. 在RNase-free离心管中配制如下混合液:

| | | |
|-------------------------------|---------------|-------------------------------------|
| RNase-free ddH ₂ O | to 20 μ l | <input type="checkbox"/> |
| 上一步的混合液 | 10 μ l | |
| Stem-loop primer(2 μ M)* | 1 μ l | |
| 10 \times RT Mix | 2 μ l | <input checked="" type="checkbox"/> |
| HiScript II Enzyme Mix | 2 μ l | <input checked="" type="checkbox"/> |

* 茎环引物推荐使用本公司miRNA Design软件进行设计, 此时, cDNA产物后续定量产品--miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme #MQ101)中配套的逆向qPCR引物可直接使用, 无需另外设计合成。

用移液器轻轻吹打混匀。

b. 按下列条件进行第一链cDNA合成反应:

| | |
|------------------|--------|
| 25 $^{\circ}$ C | 5 min |
| 50 $^{\circ}$ C* | 15 min |
| 85 $^{\circ}$ C | 5 min |

* 如果模板具有复杂二级结构或高GC区域, 可将反应温度提高至55 $^{\circ}$ C, 有助于提高产量。

产物可立即用于qPCR反应, 或在-20 $^{\circ}$ C保存, 并在半年内使用; 长期存放建议分装后在-70 $^{\circ}$ C保存; cDNA应避免反复冻融。

引物设计

本品适合茎环法逆转录, 推荐通用的茎环序列为GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC。通常情况下, 逆转录引物只需根据miRNA序列在茎环序列上添加6个碱基即可。也可使用本公司推出的引物设计软件miRNA Design (免费下载地址: www.vazyme.com)进行逆转录和qPCR引物设计, 该软件使用时只需输入miRNA序列即可获得引物序列。



1. 在①处输入miRNA序列(miRNA序列可从miRBase数据库中查询得到);
2. 点击②处设计引物;
3. 分别在③、④处得到逆转录引物和qPCR引物。

*所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。