

注：如果 n 份 RNA 要进行 microRNA 的逆转录；建议增加 10% 的余量，以便进行分装；1 种特异性茎环逆转录引物 (20×) 需要配一份逆转录反应体系；
举例，如果有 10 个样本要进行目的 microRNA 的逆转录和内参 U6B 的逆转录；建议各配 11 个人份；

3. 逆转录反应体系分装：每管分装量为 4.1ul；
4. 1 份逆转录反应体系 4.1ul 与 5.9ul 稀释过的 RNA，进行混匀，42℃ 反应 60min；95 度 5 分钟；
5. cDNA 产物如不马上进行 real time PCR 实验，应置于 -20℃ 保存。或者保存于 -80 度，可以保存 6 个月。

问题指南：

CDNA 质量验证	建议直接用 real time PCR 进行内参验证。
Test	本试剂盒中 1 个 Test 体积为 10ul；如需要检测更多基因，即需要更多 CDNA 模板，可以按比例多转录一定体积。
CDNA 的使用量	建议在 PCR 或者 real time PCR 试验中初始 CDNA 使用量为 5%，如果浓度过高，请稀释使用；如果浓度过低，请加倍使用，但最高使用量不能超过体积的 10%；如果 real time PCR 内参的 CT 值太大，建议重新逆转录或者重新抽提 RNA。

电话： 4008801880 或 0086 21 51692391 传真： 0086 21 51692391
Email: biotnt@biotnt.com 主页： www.biotnt.com
微信公众平台： 搜索“BioTNT”可加入
在线支持 QQ 群： 47468567
联系地址： 上海市闵行区罗锦路 98 号 2 号楼 5 楼 邮编:200237

版本号： 20180001

microRNA 逆转录试剂盒（茎环法）

目录号：

A2030A001（120T）

A2030A001x3（360T）

产品简介：

microRNA 逆转录试剂盒（茎环法）包括了一种全新高效逆转录酶、反应缓冲液及该实验中必需的反应组分。使用该试剂盒能够以 microRNA 为模板高效逆转录成互补的 cDNA 第一链，进而开展后继的相关实验。

保存条件：

-20℃ 避光保存。

警告： 本产品仅供科研使用，请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等其他用途。

安全提示： 本产品中部分试剂有腐蚀性或毒性，请勿直接接触皮肤或吞咽；操作时请穿戴实验服、防护镜和手套；如果接触皮肤，应立即用洗涤剂和大量清水冲洗；误食或其他危急情况，请及时到医院就医；部分试剂易燃，请注意消防安全。

注意事项：

- 1、用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理，并在高压灭菌后使用，有些试剂不能高压灭菌时，首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后，再将溶液进行过滤除菌处理；
- 2、miRNA 样品要避免基因组 DNA 污染；

- 避免多次反复冻融 miRNA;
- 试剂盒的各组成成分应在-20℃保存;
- cDNA 产物应置于-20℃保存,或者保存于-80℃,可以保存6个月。

试剂盒组成:

货号	试剂	120T 说明	360T 说明
A2030A001-A1	5×逆转录 Buffer	1.0ml/1 支	1.0ml/1 支, 3 支
A2030A001-A2	高效逆转录酶	60ul/1 支	180ul/1 支
A2030A001-A3	重组 RNA 酶抑制剂	35ul/1 支	105ul/1 支
A2030A001-A4	dNTP mix	120ul/支	360ul/支
A2030A001-A5	Dd 水 (Rnase , Dnase free)	1.25ml/支, 3 支	1.25ml/支, 9 支

其他需要自己准备的:

- 仪器: 混匀器, PCR 仪, 离心机 (冷冻); 移液器 (10 μL , 200 μL , 1000 μL); 冰盒;
- 耗材: 1.5mL Eppendorf 管(无菌、无酶、RNase-free; 货号 A2010B0X04) Tips(RNase-free) (1000 μL、200 μL 的枪头; 货号 A2010B0X09);
- DEPC ddH₂O (Biotnt 统一货号 A2010B0X01): 也可以自己配制; 配法如下: 配 1000ml 的 DEPC 处理水, 超纯水 1000ml, 加 1ml 100% DEPC, 磁力搅拌器搅拌过夜。第二天高压蒸汽灭菌 121 度, 25min DEPC 分解成二氧化碳和酒精, 封闭冷藏备用。最好分装小瓶来用, 尽量避免污染;
- 手套, 口罩。

预防 RNase 污染, 应注意以下几个方面:

- 经常更换新手套, 以防止 RNase 污染;

- 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染;
- RNA 在 Rnazol 试剂中短时间内不会被 RNase 降解, 但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料或玻璃器皿 (玻璃器皿可在 150℃ 烧烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟, 然后用 DEPC 水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除 RNase);
- 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O (货号 A2010B0X01)。

操作步骤:

一、逆转录步骤(PART A, 货号为 A2030A001(120T)):

1. RNA 样本准备:

在 0.5ml 微量离心管中 (无菌无 RNA 酶, 货号 A2010B0X04), 加入总 RNA 1 μg (简易方式: 如果不检测浓度值, 可以直接加入 1 ul RNA); **注:** 总 RNA 中应含有小 RNA (small RNA); 总 RNA 的量应在 1ng-5ug, 之间; 如果采用特殊的专门抽提小 RNA 的试剂盒, RNA 的量应在 0.1ng-1ug 之间;

自备	RNA	1ug (最多 2ul)
A2030A001-A5	Dd 水 (Rnase , Dnase free)	补到 5.9ul
总体积		5.9ul

备注: 不同的抽提方式中 RNA 抽提后的其他残余量是不一样的, 所以 RNA 上样量最多可以加到 5.9ul (满足 1ug 要求); 某些抽提方式不推荐上样量超过 2ul, 避免残余带来影响。

计算 1 种 RNA 要检测的 microRNA 数量, 根据数量进行配置 RNA 稀释液;

2. 配制逆转录反应体系总液体

货号	名称	10ul 体系
A2030A001-A1	5×逆转录 Buffer	2 μl
A2030A001-A4	dNTP mix	1 μl
A2030A001-A3	重组 RNA 酶抑制剂	0.2 μl
A2030A001-A2	高效逆转录酶	0.4 μl
PART C 或 PARTD 提供	特异性茎环逆转录引物 (20×)	0.5 ul
	总体积	4.1ul