

二、Poly(A)修饰的 microRNA 进行逆转录反应

按照下表组分进行反应液的配置

反应组分	体积
Poly A 反应液	2ul
RT 酶 (MMLV 酶)	1 μ L
逆转录 5 \times 反应液	4 ul
10mM dNTP mix	1 μ L
Recombinant RNasin (200units/ul)	0.5 μ L
RT Primer (10 \times)	2 ul
DEPC 水	9.5 ul
共计	20 ul

1. 移液器轻轻混匀上述配置的反应液, 短暂离心后在 42 $^{\circ}$ C 反应 60min;
2. 95 度, 灭活 5 分钟;
3. 合成的 cDNA 反应液可放置于 -20 $^{\circ}$ C 保存, 也可以直接进行下游荧光定量检测。

三. Poly (A) 加尾法逆转录的 CDNA, QPCR 引物和 PCR array 实验; BioTNT 独特设计的 poly (A) 加尾法, 请配套 BioTNTmicroRNA 荧光定量检测试剂盒 (加尾法) A2030A001 。

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



BioTNT - 科研好助手

版本号: 20160001

microRNA 逆转录试剂盒 (加尾法)

目录号:

cat. A2030A201 (25T)

cat. A2030A201X2 (50T)

产品简介:

本试剂盒采用在 miRNA 3' 末端加多聚 A 尾 Poly(A), 再使用 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。

MicroRNA 逆转录试剂盒 (加尾法) 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-2ug 的 total RNA 中有效制备 miRNA 对应的 cDNA 第一链。

注: 该试剂盒须与 **microRNA 荧光定量检测试剂盒 (加尾法) A2030A001**

配套使用

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C 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; 误食或其他紧急情况, 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；
- 3、避免多次反复冻融 miRNA；
- 4、试剂盒的各组成成分应在-20℃保存；
- 5、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：

试剂盒组成	(25 次)	(50 次)
5Units/ul Poly(A) 聚合酶	14ul	28ul
10×Poly(A) 聚合酶 buffer 液	35ul	70ul
10mM ATP (10×)	35ul	70ul
RT 酶 (MMLV)	30ul	60ul
逆转录 5×反应液	120ul	240ul
Recombinant RNasin (200units/ul)	20ul	40ul
RT Primer (10×)	60ul	120ul
10mM dNTP mix	30ul	60ul
DEPC 水	1ml	1ml 两管
说明书	1 份	1 份

其他需要自己准备的：

1. 仪器：混匀器，PCR 仪，离心机（冷冻）；移液器（10 μL，200 μL，1000 μL）；冰盒；
2. 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）；
3. 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；
4. 手套，口罩。

预防 RNase 污染，应注意以下几个方面：

1. 经常更换新手套，以防止 RNase 污染；
2. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染；
3. 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）；
4. 配制溶液应使用 RNase-free ddH₂O（货号 A2010B0X01）

操作步骤：

一、microRNA 3' 末端进行加 Poly(A)处理

在冰上预冷 RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积 10ul（最后加入 E.coli Poly(A)Polymerase）

	加样 1	终浓度
总 RNA	---	1ug RNA
5Units/ul Poly(A) 聚合酶	0.4ul	含量为 2U
10mM ATP 溶液 (10×)	1ul	1mM ATP
10×Poly(A) 聚合酶 buffer 液	1ul	1×
补 DEPC 水	---	---
polyA 反应液总体积	10ul	

***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 2ul~5ul。请根据目的 miRNA 丰度决定加入量）。

1. 移液器轻轻混匀上述配置的反应液，短暂离心后在 37℃反应 30 分钟。
2. 热失活：65℃ 20 分钟。所得的反应液可以直接进行下游实验，也可放置-20℃短暂保存，如需长期保存建议存放于-80℃。