

miRNA 逆转录试剂盒 (含gDNA去除试剂，茎环法)

货号：500-113

产品保存及运输：保存温度：-20℃保存 运输温度：干冰运输

产品简介：

miRNA 逆转录试剂盒(含gDNA去除试剂，茎环法)是一款利用茎环法合成miRNA第一链cDNA的逆转录试剂盒，miRNA逆转录酶Mix和buffer mix含有逆转录反应所需的所有组分（Buffer，dNTP，M-MLV Reverse Transcriptase，RNase inhibitor），只需加入RNA模板和水(DEPC-treated Water或DNase/RNase-Free Water)就能进行反转录反应。

本产品中使用的逆转录酶具有高稳定性，适用于miRNA样品的反转录。dsDNase配合10x dsDNase buffer可去除RNA模板中残留的基因组DNA污染，保证后续结果更加可靠。dsDNase能够特异性消化双链DNA（dsDNA或DNA-RNA杂合链中的DNA链），并且具有热敏感性，在逆转录温度下即可快速不可逆地失活。

与传统使用DNase I去除基因组DNA污染的方法相比，dsDNase无需额外加入EDTA进行失活，不仅节省实验时间，而且降低了对逆转录反应的抑制。

实验原理：

微RNA（microRNAs，miRNA）是一类进化上保守的非编码小分子RNA，长度一般在21-23个核苷酸之间，具有在翻译水平调控基因表达的功能。因其序列仅20 nt左右，通常正向引物就会覆盖其全长甚至会有多余部分，反向引物就无处安置了。

因此，本试剂盒采用茎环法合成miRNA cDNA第一链，其原理是以折叠为茎环结构的通用序列作为引物合成加长的miRNA对应cDNA第一链，后续扩增过程中，茎环结构在适宜的温度下会被打开，和相关扩增引物结合（[茎环引物设计见<注意事项- miRNA茎环引物及qPCR引物设计>](#)），后续搭配本公司SYBR green荧光定量PCR试剂盒对其精确定量，图1为逆转录及检测原理示意图。

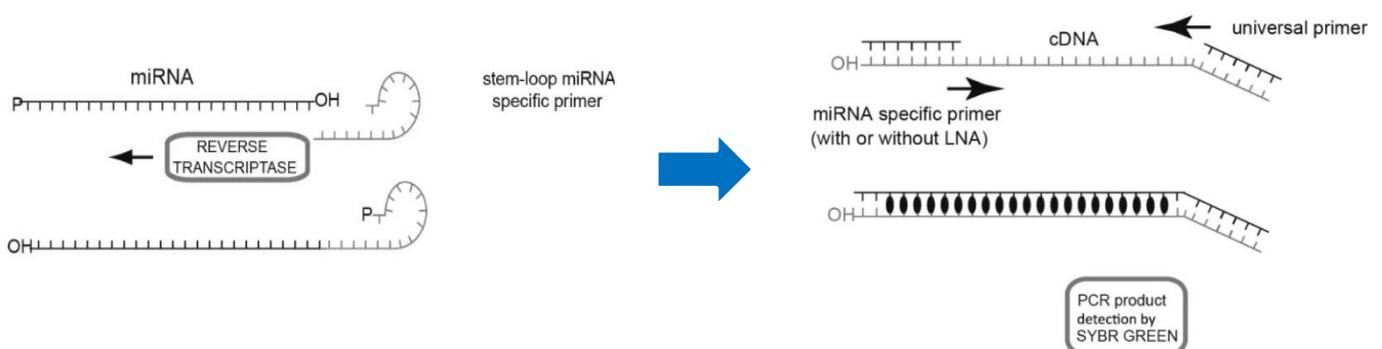


图1. miRNA 第一链cDNA逆转录及检测示意图（茎环法）

产品组成：

货号	组分	规格（100 rxns / 20 μ L）
500-113-1	miRNA 逆转录 Enzyme Mix	100 μ L
500-113-2	miRNA逆转录 buffer Mix	400 μ L
500-113-3	dsDNase	100 μ l
500-113-4	10 \times dsDNase Buffer	200 μ L

使用说明：**◆ 实验前准备**

- PCR仪，离心机，混匀仪，1.5 ml 离心管（RNase-free）、PCR管（RNase-free）
- 冰盒，移液器、枪头（RNase-free）
- 合成Stem-loop引物

◆ 操作流程

本试剂盒可以在反转录反应前去除RNA中残留的gDNA，随后利用Stem-loop RT Primer，对miRNA或Total RNA进行反转录合成cDNA的。进行反转录时主要包括2个步骤：[<操作步骤-去基因组DNA>](#)和[<操作步骤-反转录反应>](#)。如需进行下一步定量PCR反应，可配合本公司相关定量产品使用。

1. miRNA逆转录**(1) 去除基因组DNA**

在冰上按照表1配置去除基因组DNA的反应混合液，并按照表2中程序进行反应。将反应混合液轻柔吸打混匀，瞬离；置于37 $^{\circ}$ C温育2 min，以去除基因组DNA污染；65 $^{\circ}$ C温育2 min，使dsDNase失活，冰上放置。

表1 去除基因组DNA反应体系

组分	推荐使用量
miRNA	10 pg~200 ng
dsDNase	1 μ L
10 \times dsDNase Buffer	1 μ L
Nuclease-Free Water	Add to 10 μ L

表2 去除基因组DNA反应程序

反应步骤	反应温度	反应时间
去除gNDA	37°C	2 min
灭活dsDNase ^{a*}	65°C	2 min

a*：若RNA中基因组DNA污染严重，可适当延长37°C温育时间至5 min。

(2) 逆转录反应

按照表3在冰上配制好反应液，置于PCR仪中，按照表4进行逆转录反应^(b,c*)

表3 逆转录反应体系

组分	使用量
实验(1)产物	10 μL
miRNA 逆转录 Enzyme Mix	1 μL
miRNA逆转录 buffer Mix	4 μL
Stem-loop primer(10 μM) ^(d*)	0.5 μL
Nuclease-Free Water	Add to 20 μL

表4 去除基因组DNA反应程序

反应步骤	反应温度	反应时间
逆转录	55°C	20 min ^(e*)
灭活逆转录酶	85°C	5 min

b*：配制反转录反应液时，各组分溶液可预先配制成预混液，再分装10μl到上述步骤<操作步骤-去除基因组DNA>反应液中。如不配制预混液，向<操作步骤-去除基因组DNA>反应液中添加试剂顺序：RNase free water、miRNA逆转录 buffer Mix，miRNA 逆转录 Enzyme Mix，Stem-loop RT Primer 轻柔混匀进行反转录反应，确保发挥反转录酶最大活性。

c*：反转录获得的cDNA可立即用于后续qPCR反应或置于-20°C暂存，若需长期保存建议放置于-80°C。

d*：Stem-loop RT Primer 根据miRNA序列设计，可参考<注意事项-引物设计>，推荐使用量为0.25μM，可根据实际情况在0.1 ~ 0.4μM范围内调整。

e*：逆转录反应时间可在15-30 min之间调整，根据实验结果进行调整，一般推荐20 min。

注意事项：

1. 所有试剂使用前请轻轻上下颠倒混匀，尽量避免起泡，并经短暂离心后使用；尤其miRNA 逆转录 Enzyme Mix和dsDNase的黏度较大，混匀后必须离心。
2. 为了防止RNase污染，请保持实验区域洁净；
3. 操作时需穿戴干净的手套、口罩；
4. 实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证RNase-free。
5. miRNA茎环引物及qPCR引物设计

Stem-loop RT 引物设计：基于通用的茎环结构，只需要按照不同的miRNA序列修改最末端6个碱基即可。通用茎环结构序列为：GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC；

以 miR-1-5p为例，其序列为CAUACUCCUUACAUGCCCAUA，只需在通用茎环序列后加上miRNA 3'末端的6个碱基的反向互补序列，即：GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC “TATGGG”；

qPCR 上游引物设计：miRNA序列除去3'端6个碱基的剩余部分作为上游引物，如miR-1-5p的上游引物为(注意把U改为T)：CATACTTCCTTACATG。检查引物的Tm值，如果Tm值较低，则在5'端加GC使Tm值接近60°C（或加入LNA修饰来提高退火温度）。因此miR-1-5p的上游引物可设计为：

GCCGCCATACTTCCTTACATG, 60.3°C；

下游引物是通用的，序列为GTGCAGGGTCCGAGGT；

引物设计好后，需要通过预试验检测引物的特异性。一般需要做熔解曲线来检测引物的特异性；同时最好将PCR产物进行电泳检测产物是否单一（产物长度很短，需要3%以上的琼脂糖胶）。

6. miRNA检测内参引物

small nucleolar RNA (snoRNA) 长度约为60 ~ 300 nt左右，在多种组织细胞中高表达，不涉及miRNA的调节途径，所以snoRNA是很好的内参选择。通常使用U6作为miRNA检测内参。

U6-F: GCTTCGGCAGCACATATACTAAAA；

U6-R: CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT；

研究证实常用的snoRNA assays包括：

Human: U6、RNU48、RNU44、U47；

Mouse: U6、snoRNA-202、snoRNA-234、snoRNA-420；

还有一类是在不同实验条件下变化差异很小的miRNA：

Human/mouse tissues: miR-152、-186、-25、-92、-26b、-16；

Human/mouse cell lines: miR-374、-16、-93、-186、-26b；