

# microRNA Reverse Transcription Kit 操作说明

Cat. No.: EZB-miRT2

## 一、试剂盒简介

本试剂盒采用 Poly(A)加尾反应和逆转录反应同步进行的方法来进行 microRNA cDNA 第一链的合成。具体过程是，先通过 Poly(A) Polymerase 在 microRNA 的 3'末端加 Poly(A)尾，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 microRNA 的 cDNA 第一链。

本试剂盒为包含去除基因组 DNA 的高效 DNase 的快速逆转录试剂盒，主要含有 3 管试剂：gDNA Remover、miRNA RT Enzyme Mix、4× miRNA RT Buffer。其中，gDNA Remover 试剂中包含浓缩的 DNase 和 buffer，仅需室温（19 ~ 27℃）反应 5 分钟，就能降解 95%以上的基因组 DNA，极大的降低了可能残留的基因组对结果的干扰。

miRNA RT Enzyme Mix 试剂中包含 Poly(A) Polymerase、逆转录酶、RNase Inhibitor。其中的 Poly(A) Polymerase 不但具有高效的 Poly(A)加尾反应效率，还可特异性识别成熟的单链 miRNA，从而避免了具有双链结构的 miRNA 前体的逆转录反应；逆转录酶采用新型 M-MLV 突变体逆转录酶，具有很强的抗干扰能力及扩增能力，扩增效率优异。

4× miRNA RT Buffer 试剂中包含 Poly(A)加尾反应和逆转录反应的所有原料和引物，包括 Oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物、buffer 和 dNTPs，并经过精心优化，可保证 miRNA 3'末端的 Poly(A)加尾反应和逆转录反应同步高效进行。

## 二、试剂保存条件

本试剂盒建议置于-20℃保存。

## 三、产品组分

产品组分	EZB-miRT2-S (20 次)	EZB-miRT2-L (50 次)
gDNA Remover	22 µl	55 µl
miRNA RT Enzyme Mix	44 µl	110 µl
4× miRNA RT Buffer	110 µl	275 µl
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml

注：以上表格中的反应次数对应于 20 µl 反应体系的用量。

## 四、简要操作步骤

### 去除基因组 DNA 反应

1、用 gDNA Remover 处理 RNA: 取 100 ng ~ 1 µg 含 miRNA 的总 RNA 或者 10 ng ~ 20 ng miRNA (一般建议用 0.5 µg 的总 RNA)，加入 1 µl 的 gDNA Remover (如果 RNA 浓度

较高，加入后体积少于 5  $\mu\text{l}$ ，则需要加 ddH<sub>2</sub>O 补足至 5  $\mu\text{l}$ ），用移液器轻柔吹打 10 次左右使之充分混匀，室温（19 ~ 27°C）反应 5 分钟，反应结束后置于冰上。

### 加尾和逆转录反应

2、按照如下体系配制加尾和逆转录同步反应体系：

成分	体积（20 $\mu\text{l}$ 体系）
gDNA Remover 处理过的 RNA	上述体积（X $\mu\text{l}$ ）
4× miRNA RT Buffer	5 $\mu\text{l}$
miRNA RT Enzyme Mix	2 $\mu\text{l}$
Nuclease free ddH <sub>2</sub> O	补足到 20 $\mu\text{l}$

3、按照上表加好试剂后，必须用移液器轻柔吹打 10 次左右使之充分混匀（很重要，混匀时建议将移液器量程调到 18  $\mu\text{l}$  左右）。

4、逆转录反应条件：37°C 反应 15 分钟，42°C 反应 10 分钟，95°C 反应 3 分钟，即可得到包含所有 miRNA 的 cDNA 第一链。

5、逆转录反应得到的 cDNA 可直接作为模板进行 qPCR 反应，或者稀释 5 ~ 10 倍后再使用（具体的稀释倍数根据基因表达丰度来确定）。在 20  $\mu\text{l}$  的 qPCR 反应体系中：如果模板 cDNA 不稀释，建议使用 0.4  $\mu\text{l}$  的 cDNA（0.2 ~ 0.8  $\mu\text{l}$ ）；如果模板 cDNA 稀释 5 倍，建议使用 2  $\mu\text{l}$  的 cDNA（1 ~ 4  $\mu\text{l}$ ）；如果模板 cDNA 稀释 10 倍，建议使用 4  $\mu\text{l}$  的 cDNA（2 ~ 8  $\mu\text{l}$ ）。如不立即进行 qPCR 实验，建议将 cDNA 冻存于 -80°C 冰箱中。