

Version: AG 4.0 (2023.06.29修订)

SPARKScript miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(Tailing Reaction)

目录号: AG0501

01/产品组分

序号	组分	AG0501 25 rxn(20 µL/rxn)
1	SPARKscript III miRT Enzyme Mix	25 µL
2	2×miRT Reaction Buffer	250 µL
3	RT Primer	75 µL
4	Universal miRNA qPCR-R (10µM)	250 µL
5	RNase Free H ₂ O	1 mL

02/保存条件

本产品所有组分-20℃保存。

03/产品概述

SPARKScript miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(Tailing Reaction)是适用于 microRNA (miRNA) 加尾法 cDNA 第一链合成的专用试剂盒, 包含 miRNA 加 A 尾反应和反转录反应的所有原料。本产品以 miRNA 或总 RNA 为模板, 在 Poly(A) Polymerase (简称 PAP) 的作用下, 对 miRNA 3' 末端加 Poly(A) 尾, 再使用通用反转录引物 RT Primer 进行反转录反应, 最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链。PAP 加 A 尾效率高, 可特异性识别单链 RNA, 有效避免具有双链或者茎环结构的 miRNA 前体的逆转录反应; SPARKscript III 反转录酶经过改造, 丧失了 RNase H 活性, 增加了与 RNA 的亲合力, 使得 miRNA 的反转录效率和灵敏度大幅提高, 一次合成的 cDNA 可检测多个 miRNA, 节约了样品和成本。

试剂盒中带有定量下游引物 Universal miRNA qPCR-R, 后续定量试剂推荐使用本公司的 2×SYBR Green qPCR Mix (With ROX) (目录号: AH0104), 以获得最优实验结果。

04/适用范围

加尾法 miRNA cDNA 第一链合成。

05/注意事项

请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项

- ◇ 防止 RNase 污染：保持实验区洁净；所用耗材均需保证 RNase-Free。
- ◇ 在反应中使用的 Total RNA 必须含有 miRNA。
- ◇ 反应液的配置请在冰上操作进行。
- ◇ 使用的样本为 miRNA 时，由于 miRNA 无法直接用分光光度计定量，建议加入量为 1-6 μL ，可根据目的 miRNA 丰度决定加入量，但是对于低丰度 miRNA 样品而言，可直接加入最大体积。

06/实验流程

1. 准备工作：

将模板 RNA 在冰上解冻，RNase Free H₂O 在室温（15-25℃）解冻，解冻后迅速置于冰上，所有组分置于冰上备用。使用前将每种溶液轻弹或者颠倒混匀，短暂离心收集残留在管壁的液体到管底。

2. 第一链 cDNA 合成：

在 RNase Free 管中加入以下成分，建议使用 PCR 管冰上配制。

Components	Volume
Total RNA	10 pg-1 μg
2×miRT Reaction Buffer	10 μL
RT Primer	3 μL
SPARKscript III miRT Enzyme Mix	1 μL
RNase Free H ₂ O	up to 20 μL

用移液器轻轻吹打或者轻弹混匀后，短暂离心收集至管底。

3. 反应程序

温度	时间
37 °C	60 min
85 °C	5 min

4. 产物可立即或稀释后用于 qPCR 反应，对于高丰度表达的 miRNA，可根据具体的 CT 值，稀释 10-1000 倍后使用；短期保存建议存放 -20℃ 保存，长期保存建议分装后在 -70℃ 保存，cDNA 应避免反复冻融。

07/引物设计

qPCR 检测引物设计:

1、上游引物设计

- 1) 建议根据完整 miRNA 序列设计 miRNA 上游特异性引物，并将其中的 U 替换为 T。
- 2) 若根据 miRNA 序列设计上游引物退火温度过低，建议在上游引物 5'端增加几个碱基（以 G 和 C 为主），增加碱基后需验证引物特异性，以免造成非特异性扩增。
- 3) 若引物退火温度过高，建议删去 5'端几个碱基。
- 4) 为了避免 miRNA 前体等长片段非特异性扩增，建议在上游引物 3'端增加 1-3 个 A 碱基。
- 5) 对于序列相似的 miRNA，建议上游引物 3'端终止于差异碱基。
- 6) 若使用 U6 作为检测内参，荧光定量 PCR 时直接投入内参上下游引物即可。

2、下游引物

本产品提供用于 qPCR 检测的下游通用引物 Universal miRNA qPCR-R (10 μM)，退火温度约为 60℃。

08/相关产品

- AC0101 SparkZol Reagent
- AC0205 SPARKeasy 细胞RNA快速提取试剂盒
- AC1501 SPARKeasy 动物组织细胞microRNA快速提取试剂盒
- AC1505 SPARKeasy 血清血浆microRNA提取试剂盒
- AC1705 高效固体表面RNase清除剂
- AC1709 RNase Free and DNase Free 纯水
- AH0104 2×SYBR Green qPCR Mix (With ROX)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

