

Version: AG 4.0 (2023.02.09修订)

SPARKScript II miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(By stem-loop)

目录号: AG0502

01/产品组分

序号	组分	AG0502-A 50 rxn(20μL/rxn)	AG0502-B 100 rxn(20μL/rxn)
1	RNase Free H ₂ O	1 mL	1 mL
2	SPARKScript II miRNA Enzyme mix	50 μL	100 μL
3	2×SPARKScript II miRNA Buffer	500 μL	1 mL
4	Universal miRNA qPCR-R (10μM)	50 μL	100 μL

02/保存条件

本产品所有组分-20℃保存。

03/产品概述

本试剂盒是适用于茎环法 miRNA cDNA 第一链合成的专用试剂盒，采用含有茎环结构的逆转录引物与 miRNA 分子 3'端结合，在 SPARKScript II 反转录酶的作用下，获得人为加长的 miRNA 第一链 cDNA。茎环法反转录特异性高，只对成熟的 miRNA 进行反转，不受其前体干扰，序列高度同源的 miRNA 也可精确区分。

本试剂盒采用预混酶和 2×浓缩的预混缓冲体系，使用方便，缩短了操作时间，降低污染，获得的逆转录产物可直接用于后续的定量检测；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

茎环法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

- ◇ 避免 RNase 污染。保持实验区域洁净；操作时需穿戴干净的手套、口罩；实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证无 RNase。
- ◇ 所有试剂使用前请轻弹管壁或者颠倒混匀，并经短暂离心后使用。不应使枪头插入液面过深，否则会因枪头壁的粘附造成酶量的损失。
- ◇ 反应液的配制请在冰上进行。

06/实验流程

以20 µL反应体系为例：

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
Stem-loop primer (2-5 µM)	1 µL
2×SPARKScript II miRNA Buffer	10 µL
SPARKScript II miRNA 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
25 °C	5 min
50 °C	15 min
85 °C	5 min

4. 产物可立即用于 qPCR 反应，或在 -20℃ 保存，长期存放建议分装后在 -70℃ 保存，cDNA 应避免反复冻融。

07/引物设计

1. 茎环法逆转录引物设计：

本试剂盒使用的茎环序列为：5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC-3'，通常情况下逆转录引物只需在上述茎环序列上添加目的 miRNA 3'端的 6 个反向互补碱基即可。若选择 U6 等较长的基因作为内参基因，由于序列相对较长，无需设计茎环逆转录引物，直接使用常用的引物设计软件设计其扩增的上下游引物即可，逆转录时加入下游引物（2-5μM 浓度）。

举例：（以 hsa-miR-16-5p 和内参 U6 为例）

miRNA 序列为：5'-TAGCAGCACGTAAATATTGGCG-3'（此序列已将 miRNA 序列原有的碱基 U 替换成 T）

miRNA 茎环逆转录引物：5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC（通用茎环序列）+CGCCAA（miRNA 3'的 6 个反向互补碱基）-3'

内参 U6 逆转录引物（下游引物）：5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTTCAT-3'

2. qPCR 上游引物设计：

qPCR 上游引物为“保护性碱基+miRNA 5'端的 13-16 个碱基（除去 miRNA 3'端的 6 个碱基）”，注意将 miRNA 序列原有的碱基 U 替换成 T。如果 miRNA 分子中 GC 含量偏高时，可在 miRNA 序列的 3'端适当减少 3-4 个碱基，从而降低引物的 Tm 值；反之，当 miRNA 分子中 GC 含量偏低时，可在 miRNA 序列的 5'端添加几个 GC 碱基，从而提高引物的 Tm 值。

举例：（以 hsa-miR-16-5p 为例为例）

miRNA 前 16 个碱基为 TAGCAGCACGTAAATA（将原有的碱基 U 替换成 T），GC 含量为 37.5%，Tm 值为 38.5℃。故引物设计时在其 5'端添加保护性碱基“CGCG”，添加后其 GC 含量为 50.0%，Tm 值为 58.0℃。miRNA qPCR 上游引物：CGCG（保护性碱基）+TAGCAGCACGTAAATA（miRNA 5'端 13-16 个碱基）。

3. qPCR 下游引物设计：

miRNA qPCR 下游引物为茎环序列上的一段，本试剂盒中通用下游引物 Universal miRNA qPCR-R 序列为：AGTGCAGGGTCCGAGGTATT（Tm 值为 58.5℃）。若使用 U6 作为检测内参，荧光定量 PCR 时直接投入上下游引物即可（反转录引物就是荧光定量 PCR 扩增的下游引物）。

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

