

SuperRT III miRNA RT Kit (by Stem-loop)

SuperRT III miRNA 反转录试剂盒（茎环法）

| 产品编号 | 产品名称 | 规格 |
|---------|-------------------------------|-------|
| BL1522A | SuperRT III miRNA 反转录试剂盒（茎环法） | 20 T |
| BL1522B | SuperRT III miRNA 反转录试剂盒（茎环法） | 100 T |

产品简介:

本产品基于 SuperRT III 反转录酶开发,采用茎环结构的逆转录引物与 miRNA 分子 3'端结合,在 SuperRT III 反转录酶的作用下,获得人为加长的 miRNA 第一链 cDNA。推荐使用通用的茎环序列为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC-3',也可根据实验需求选择其它茎环序列。通常情况下,逆转录引物只需在茎环序列上添加目的 miRNA 3'端的 6 个反向互补碱基即可。此方法特异性高,只对成熟的 miRNA 进行反转录,不受其前体干扰,序列高度同源的 miRNA 也可以精确区分。使用本产品获得的逆转录产物可直接用于后续的染料法或探针法荧光定量检测。

产品特点:

- ✧ **特异性高:** qPCR 检测时,通过调整 miRNA 的上游引物,可有效避免 pre-miRNA 的干扰,序列高度同源的 miRNA 也可通过上游引物的自行设计精确区分。
- ✧ **灵敏度高:** 试剂盒中使用 SuperRT III 反转录酶,检测更灵敏,可对低至 10 pg 的 total RNA 进行检测。
- ✧ **使用方便:** 试剂盒中提供人、大鼠、小鼠通用的 U6 内参的逆转录引物(U6 Stem-loop RT Primer)、U6 内参的 qPCR 检测上游引物(U6 qPCR-F)、通用茎环的下游引物(Universal miRNA qPCR-R),可直接使用。

产品组分:

| 组分名称 | BL1522A | BL1522B |
|--|-------------|-------------|
| SuperRT III miRNA-L Enzyme Mix | 20 μ L | 100 μ L |
| 2 \times SuperRT III miRNA-L Buffer | 200 μ L | 1 mL |
| U6 Stem-loop RT Primer (5 μ M) ^a | 20 μ L | 100 μ L |
| U6 qPCR-F (10 μ M) ^b | 20 μ L | 100 μ L |
| Universal miRNA qPCR-R (10 μ M) ^c | 30 μ L | 150 μ L |
| Nuclease-free Water | 1 mL | 1.5 mL |

^a U6 Stem-loop RT Primer 为人、大鼠、小鼠通用的 U6 内参的逆转录引物,其它物种或其它内参需要根据物种序列重新设计。

^b U6 qPCR-F 为人、大鼠、小鼠通用的 U6 内参上游引物,可与通用下游引物 Universal miRNA qPCR-R 可在 qPCR 检测搭配使用。

^c Universal miRNA qPCR-R 为通用茎环下游引物,在检测目标 miRNA 时可设计 qPCR 上游引物与之搭配使用。如需更多引物量,请参考补充说明 3 自行合成。

操作步骤:

1. 在 DNase/RNase-free 离心管中配制下列反应体系,进行第一链 cDNA 的合成步骤:

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
注意:在体外研究使用,不用于诊断或治疗用途,本产品不是医疗装置。



| 组分 | 体积 |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| RNA 模板 | 10 pg-1 μg Total RNA or 100 ng miRNA |
| U6 Stem-loop RT Primer | 1 μL |
| 2×SuperRT III miRNA-L Buffer | 10 μL |
| SuperRT III miRNA-L Enzyme Mix | 1 μL |
| Nuclease-free Water | 补足至 20 μL |

用移液器轻轻吹打充分混匀后，短暂离心。

2. 反应条程序：

| 温度 | 时间 |
|-------|--------|
| 25°C | 5 min |
| 50°C* | 15 min |
| 85°C | 2 min |

3. 反应结束后所得的 cDNA，请置于冰上进行后续实验或冷冻保存。

引物设计：

1. 茎环逆转录引物设计：

逆转录引物只需在茎环序列上添加待测 miRNA 3'端的 6 个反向互补碱基即可。推荐使用通用的茎环序列为：

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC-3'。

以 mature hsa miR15-5p (5'-TAGCAGCACGTAAATATTGGCG-3') 为例，3'端的 6 个碱基为“TTGGCG”，反向互补序列为“CGCCAA”，则逆转录引物为：

5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCGCCAA-3'。

2. qPCR 上游引物的设计：

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)，注意将原有的 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。如 miR15-5p，前 16 个碱基为 TAGCAGCACGTAAATA，GC 含量为 37.5%，Tm 值为 38.5°C。故引物设计时在其 5'端添加保护性碱基“CGCG”，即：

| 引物名称 | 引物序列 (5' -3') | GC 含量 | Tm 值 |
|-----------------|----------------------|-------|--------|
| miR15-5p qPCR-F | CGCGTAGCAGCACGTAAATA | 50% | 58.0°C |

3. qPCR 下游引物的设计：

本试剂盒推荐使用通用的茎环序列及通用下游引物 (Universal miRNA qPCR-R，序列为 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3')。当使用其它茎环序列时，需自行设计合成 qPCR 下游引物。

4. 检测

引物设计好后，需要通过预试验检测引物的特异性。一般需要做溶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 2%以上的琼脂糖胶)。

注意事项：

1. 实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证 RNase-free。
2. RNA 应置于-70°C以下保存，cDNA 合成产物应置于-20°C保存。
3. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。
4. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

有效期：

-20°C保存，保质期 12 个月。

Note: For in vitro research use only, not for diagnostic or therapeutic use, This product is not a medical device.
 注意：在体外研究使用，不用于诊断或治疗用途，本产品不是医疗装置。

