ABScript miRNA First-Strand Synthesis Kit (by tailing A)

产品目录号：RK30170

产品组分

组分名称	组分编号	规格 20 RXN
ABScript miRNA-A Enzyme Mix (20X)	RM30271	20 μL
ABScript miRNA-A Reaction Buffer (2X)	RM30272	200 μL
Universal RT Primer	RM30273	60 μL
Universal miRNA-A qPCR Primer R (10 μM)*	RM30274	2 × 200 μL
U6 qPCR Primer F (10 μM)**	RM30275	2 × 100 μL
Nuclease-free ddH_2O	RM30276	1 mL

*加尾法反向通用引物 Universal miRNA-A qPCR Primer R，在检测目标 miRNA 时设计 qPCR 正向引物与之搭配使用。

**人、小鼠、大鼠通用的加尾法 U6 内参正向引物 U6 qPCR Primer F，可与通用反向引物 Universal miRNA-A qPCR Primer R 在 qPCR 检测时搭配使用。

产品说明

本试剂盒适用于 microRNA cDNA 加尾法第一链合成，即 miRNA 3' 末端的 Poly(A)加尾反应和逆转录反应可同时高效进行。ABScript miRNA-A Enzyme Mix 中含有 Poly(A) Polymerase（PAP）和反转录酶。PAP 主要用于在 RNA 分子 3'末端添加 Poly(A)尾，亦可特异性识别单链 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。反转录酶经过改造，丧失了 RNase H 活性，增加了与 RNA 的亲和力，使得 miRNA 的逆转录效率和灵敏度大幅提高。使用本产品而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。

保存温度

-20℃

操作说明

1. 在冰上按下述推荐加入各组分到 RNase-free PCR 管中，混匀并瞬时离心。

组分	加入量
RNA 模板	10 pg-1 μg Total RNA or 200 ng miRNA
Universal RT Primer	3 μL
ABScript miRNA-A Reaction Buffer	10 μL
ABScript miRNA-A Enzyme Mix	1 μL
Nuclease-free ddH_2O	Up to 20 μL

2. 在 PCR 仪上按以下反应程序进行加尾和逆转录反应。

温度	时间
37 ℃	50 min
85 ℃	5 min

逆转录产物可立即进行后续 qPCR 反应，或置于-20℃ 保存并在半年内使用；长期存放建议分装后在-80℃ 保存。cDNA 应避免反复冻融。

qPCR检测引物设计

正向引物

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。

1. 若上游引物退火温度过低，建议在引物 5'端增加 2-3 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；若引物退火温度过高，建议删去 5'端 2-3 个碱基。
2. 为了避免 miRNA 前体等长片段非特异性扩增，建议在引物 3'端增加 1-3 个 A 碱基。
3. 对于序列相似的 miRNA，建议引物 3'端终止于差异碱基，若由于引物长度过短而导致退火温度过低，可在引物 5'端增加 2-3 个碱基，使上下游引物 Tm 值匹配。

反向引物

本产品提供用于 qPCR 检测的反向通用引物 Universal miRNA-A qPCR Primer R，退火温度约为 60℃。qPCR 检测推荐使用 2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix（RK21203）。

E-mail:cn.market@abclonal.com
TEL:400-999-6126

For research purposes only. Not for therapeutic or diagnostic purposes.
Please visit http://abclonal.com.cn for a complete listing of recommended products.