

Enhanced miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit

说明书

产品型号：ALPC-48S001

品牌：RDland

规格：25 次反应

储存条件：-20℃避光保存

适用说明：本试剂盒需与 Enhanced miRNA Real-Time PCR Detection Kit 配套使用

一、产品组成

组分名称	规格
miRNA RT Enzyme Mix	50 μ l
2 $\times$ miRT Reaction Mix	250 μ l
RNase Free H ₂ O	1 ml

二、产品简介

本试剂盒采用 Poly (A) 加尾法原理，实现 microRNA (miRNA) 的高效第一链 cDNA 合成。

- Poly (A) 加尾：**为 miRNA 的 3' 端添加 Poly (A) 尾。
- 逆转录反应：**使用 Anchored oligo (dT)-universal tag 通用逆转录引物合成 cDNA 第一链。
- 优势特点：**将加尾与逆转录步骤合二为一，操作简便、效率高，可从 20 pg-2 μ g 总 RNA 中高效制备 miRNA 对应的 cDNA，一份 cDNA 可用于多个 miRNA 的后续检测，节约样品与成本。

三、操作步骤

步骤 1：miRNA 3' 端 Poly (A) 加尾与逆转录反应 (20 μ l 体系)

操作要点： 全程冰上操作，最后加入 miRNA RT Enzyme Mix

组分	体积	终浓度 / 说明
Total RNA*	x μ l	总量不超过 2 μ g
2 × miRNA RT Reaction Mix	10 μ l	1 ×
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l	注：酶液粘稠，易吸附管壁，使用前请离心；酶 为过量配置，实际可按 1.8 μ l 使用，不影响效果
RNase Free H ₂ O	补足至 20 μ l	—

* 注：反应所用 Total RNA 需包含小分子 RNA (miRNA)，也可使用富集的 miRNA。

- 普通样品：建议直接加入 2-5 μ l Total RNA (无需分光定量)
- 低丰度样品 (如血清 / 血浆提取物)：可直接加入最大体积 8 μ l

步骤 2：反应程序

1. 移液器轻轻混匀反应液，短暂离心
2. 42°C 反应 60 min
3. 85°C 加热 5 sec，灭活 miRNA RT Enzyme Mix

步骤 3：产物保存与下游应用

- 合成的 cDNA 可直接用于下游 PCR 或荧光定量 PCR 检测
- 长期保存：置于 -20°C 环境，避免反复冻融

四、下游定量 PCR 操作说明

请按照配套的 Enhanced miRNA Real-Time PCR Detection Kit (货号 ALPC-48S001) 说明书进行操作。

模板用量建议：

- 常规检测：可直接使用未稀释的 cDNA
- 高丰度检测 / 出现非特异性扩增：建议将 cDNA 模板按 5-10 倍、100 倍或更高倍数（几十到上千倍）稀释后使用，以避免模板过量导致的非特异性扩增。

五、注意事项

1. **酶液使用：**miRNA RT Enzyme Mix 粘稠度高，易吸附在管壁和吸头外，使用前请短暂离心收集液体，避免吸头外壁沾染导致酶量损失。
2. **无酶环境：**全程使用无 RNase 的耗材和试剂，防止 RNA 降解。
3. **样品选择：**低丰度 miRNA 样品可适当增加上样体积，最高不超过 8 μ l。
4. **配套使用：**本试剂盒需与指定的 Enhanced miRNA Real-Time PCR Detection Kit 配套使用，以保证检测效果。