



miRcute增强型miRNA cDNA第一链合成试剂盒 (KR211) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170531

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. 总RNA样本或小RNA样本
2. 移液器及配套枪头（RNase-free）
3. 1.5 ml 离心管（RNase-free） ， 200 μ l PCR管（RNase-free）
4. 涡旋振荡器，台式离心机，金属浴/ PCR仪



试剂准备

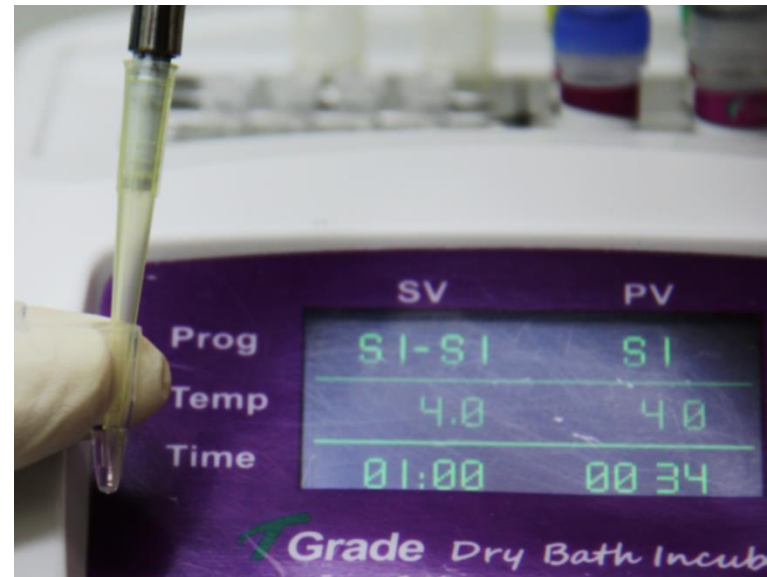


将模板RNA、2× miRNA RT Reaction Buffer解冻并混匀，然后与miRNA RT Enzyme Mix一起放于冰上备用。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 1

按下表在冰浴条件下配制反应液
（总体积20 μ l），彻底混匀。简短离心。

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA	-	可达2 μ g
2 \times miRNA RT Reaction Buffer	10 μ l	1 \times
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l	-
RNase-Free ddH ₂ O	补至20 μ l	-



Tips

1. 反应中如用Total RNA作为模板，其中必须含有小分子RNA；也可以使用小分子RNA作为模板。模板建议加入量为2-5 μl ，可根据目的miRNA丰度决定加入量。对于低丰度 miRNA 样品而言(如血清血浆提取物)，可直接加入最大体积8 μl 。
2. 配制体系时，miRNA RT Enzyme Mix务必最后加入。
3. 由于体系组分较少，建议每个体系分别配制。配制总量再分装可能导致效率降低。

Step 2

移液器轻轻混匀上述配制的反应液，按下表程序进行miRNA的逆转录反应

反应温度	反应时间	说明
42 °C	60 min	miRNA加A尾反应和逆转录反应
95 °C	3 min	酶失活反应



得到的cDNA可用于后续实验，或低温保存。保存前应分装，避免反复冻融。