



StarScript III miRNA RT Kit (by Poly A)

StarScript III miRNA 反转录试剂盒（加尾法）

版本号: V230201

货号: A238
 保存: -20°C
 运输: 低温

| 货号 | 规格 |
|---------|---------|
| A238-02 | 20 rxn |
| A238-10 | 100 rxn |

【产品概述】

本试剂盒适用于加尾法 microRNA（简称 miRNA）cDNA 第一链合成的专用试剂盒，包含了 miRNA 加 A 尾反应和逆转录反应的所有原料，并经过精心优化，可保证 miRNA 3'末端的 Poly(A)修饰过程和逆转录过程同时高效进行。StarScript III miRNA-A Enzyme Mix 中含有 Poly(A) Polymerase（简称 PAP）和 StarScript III 反转录酶。PAP 加 A 尾效率高，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；StarScript III 反转录酶经过改造，丧失了 RNase H 活性，增加了与 RNA 的亲合力，使得 miRNA 的逆转录效率和灵敏度大幅提高。

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。染料法推荐使用本公司的 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix（Cat#A301），探针法推荐使用本公司的 2×RealStar Fast Probe Mix（Cat#A351），以获得更优的实验结果。

【产品特点】

1. 特异性高：只针对单链的 miRNA 进行修饰和逆转录反应，可避免具有二级结构的 pre-miRNA 的干扰；
2. 适用广泛：可针对几乎所有材料提取的 miRNA 进行逆转录反应；
3. 灵敏度高：试剂盒中使用 StarScript III 反转录酶，检测更灵敏，可对低至 10 pg 的 total RNA 进行检测；
4. 省时省力：Poly(A)加尾和 cDNA 合成在同一反应体系中一步完成，节省时间且简化操作；
5. 使用方便：试剂盒中提供人、小鼠、大鼠通用的 U6 内参的 qPCR 检测上游引物（U6-A qPCR-F）、qPCR 检测下游通用引物（Universal miRNA-A qPCR-R），大大简化实验设计流程。

【产品组分】

| 产品组分 | 组分名称 | A238-02 | A238-10 |
|-----------|--|---------|---------|
| ZA238-101 | StarScript III miRNA-A Enzyme Mix | 20 μl | 100 μl |
| ZA238-102 | 2×miRNA-A RT Reaction Buffer | 200 μl | 1 ml |
| ZA238-103 | Universal RT Primer | 60 μl | 300 μl |
| ZA238-104 | Universal miRNA-A qPCR-R (10μM) ^a | 200 μl | 1 ml |
| ZA238-105 | U6-A qPCR-F (10μM) ^b | 100 μl | 500 μl |
| ZA220-101 | Nuclease-free Water (DEPC-treated) | 1 ml | 1.5 ml |

^a加尾法通用下游引物 Universal miRNA-A qPCR-R，在检测目标 miRNA 时设计 qPCR 上游引物与之搭配使用。

^b人、小鼠、大鼠通用的加尾法 U6 内参上游引物 U6-A qPCR-F，可与通用下游引物 Universal miRNA-A qPCR-R 在 qPCR 检测搭配使用。

【保存条件】

-20°C保存，保质期 12 个月。



【操作步骤】

1. 在上述的反应管中，直接添加如下的反转录反应所需组分，进行第一链 cDNA 的合成步骤：

| 组分 | 体积 |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| RNA 样品 | 10 pg-1µg Total RNA or 200 ng miRNA |
| Universal RT Primer | 3 µl |
| 2×miRNA-A RT Reaction Buffer | 10 µl |
| StarScript III miRNA-A Enzyme Mix | 1 µl |
| Nuclease-free Water (DEPC-treated) | 补足至 20 µl |

用移液器轻轻吹打充分混匀后，短暂离心。

2. 反应条件如下：

| 温度 | 时间 |
|------|--------|
| 37°C | 50 min |
| 85°C | 5 min |

3. 反应结束得到 cDNA 可立即用于 qPCR 检测，对于高丰度表达的 miRNA，可根据 CT 值，稀释 10-1,000 倍后进行使用。
注：合成的 cDNA 建议直接用于下游实验，可有效避免非特异性扩增。尽量避免反复冻融，若想短期保存 (<2 天)，可存放于 -20°C 或 -70°C。

【补充说明】

qPCR 检测引物设计

- 上游引物的设计：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。
 - 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。
 - 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。
 - 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。
- 下游引物实验：本产品提供用于 qPCR 检测的反向通用引物 Universal miRNA-A qPCR-R，退火温度约为 60°C。qPCR 检测推荐使用 GenStar 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix (Cat#A301) 反应体系如下：

| 组分 | 体积 |
|---------------------------------|-----------|
| 逆转录所得 cDNA(根据实验需求可稀释) | 1-2 µl |
| 2×RealStar Fast SYBR qPCR Mix | 10 µl |
| Universal miRNA-A qPCR-R (10µM) | 0.5 µl |
| miRNA-F/内参 qPCR-F (10µM) | 0.5 µl |
| Sterile Water | 补足至 20 µl |

注：本试剂盒提供人、小鼠、大鼠通用的加尾法 U6 内参上游引物 U6-A qPCR-F，其他物种可根据个人实验要求选择合适内参。

反应条件如下：

| 温度 | 时间 | 循环数 |
|------|-------|-----|
| 95°C | 2 min | |
| 95°C | 15 s | 40 |
| 60°C | 40 s | |

溶解曲线（仪器自动设置）

注：具体注意事项请参考 GenStar Cat#A301 说明书。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。在所有情况下，本公司对此产品所承担的责任，仅限于此产品的价值本身。