



StarScript III miRNA RT Kit (by Stem-loop)

StarScript III miRNA 反转录试剂盒（茎环法）

版本号: V230201

货号: A237

保存: -20°C

运输: 低温

货号	规格
A237-02	20 rxn
A237-10	100 rxn

【产品概述】

本试剂盒基于 StarScript III 反转录酶开发的, 采用茎环结构的逆转录引物与 miRNA 分子 3'端结合, 在 StarScript 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'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAC-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。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: 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。
2. 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。
3. 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	A237-02	A237-10
StarScript III miRNA-L Enzyme Mix	20 µl	100 µl
2×StarScript III miRNA-L Buffer	200 µl	1 ml
U6 Stem-loop RT Primer (5µM) ^a	20 µl	100 µl
U6 qPCR-F (10µM) ^b	20 µl	100 µl
Universal miRNA qPCR-R (10µM) ^c	30 µl	150 µl
Nuclease-free Water (DEPC-treated)	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。

【保存条件】

-20°C 保存, 保质期 12 个月。



【操作步骤】

1. 在 RNase-free 离心管中配制如下反应体系，进行第一链 cDNA 的合成步骤：

组分	体积
RNA 样品	10 pg-1μg Total RNA or 100 ng miRNA
miRNA/内参 U6 Stem-loop RT primer ^d	1 μl
2×StarScript III miRNA-L Buffer	10 μl
StarScript III miRNA-L Enzyme Mix	1 μl
Nuclease-free Water (DEPC-treated)	补足至 20 μl

^d Stem-loop RT primer 用量可根据实验需求在 2-5 μM 之间调整。

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
25°C	5 min
50°C	15 min
85°C	5 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。

【补充说明】

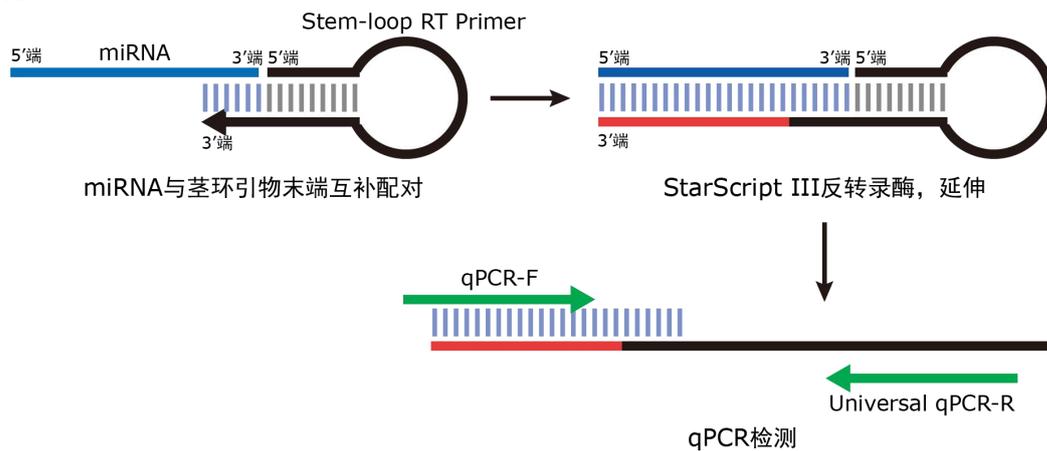


图 1. 茎环法逆转录实验原理

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'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC-3'。

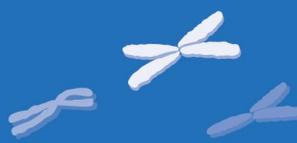
以 mature hsa miR15-5p (5'-TAGCAGCACGTAATATTGGCG-3') 为例，3'端的 6 个碱基为“TTGGCG”，反向互补序列为“**CGCCAA**”，则逆转录引物如下表。

引物名称	Sequence (5'-3')
Stem-loop RT Primer	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC CGCCAA

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 TAGCAGCACGTAATA，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**”，如下表。



引物名称	Sequence (5'-3')	GC Content	Tm 值
miR15-5p qPCR-F	CGCG TAGCAGCACGTAAATA	50.0%	58.0°C

3. qPCR 下游引物的设计:

为茎环序列上的一段, 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, 序列如下表)。当使用其它茎环序列时, 需自行设计合成 qPCR 下游引物。

引物名称	Sequence (5'-3')
Universal miRNA qPCR-R	AGTGCAGGGTCCGAGGTATT

4. 设计好的引物, 建议进行预实验, 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; 亦可将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测产物是否单一 (产物长度很短, 建议使用 2% 的胶)。

5. 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 qPCR-R (10 μ M), 退火温度约为 60°C。qPCR 检测推荐使用 GenStar 2 \times 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 μ l
2 \times RealStar Fast SYBR qPCR Mix	10 μ l
Universal miRNA qPCR-R (10 μ M)	0.5 μ l
miRNA-F/内参 qPCR-F (10 μ M) ^e	0.5 μ l
Sterile Water	补足至 20 μ l

^e 本试剂盒提供人、小鼠、大鼠通用的茎环法 U6 内参上游引物 U6 qPCR-F (10 μ M), 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。