

Code No. RR065

研究用

---

**Takara**

Small RNA Cloning Kit

---

说明书

# 目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	2
● 试剂盒外必备材料	2
● 保 存	3
● 使用前的准备及注意事项	3
● 实验操作	4
● Troubleshooting	9
● 引物序列	10
● 参考文献	10
● 关联产品	10

## ● 制品说明

近几年的研究表明，在细胞内发现的 RNA 中有许多是非编码 RNA，它们有着重要的功能，这些 RNA 被称为功能性 RNA，其中受到特别关注的是 18~26 个碱基的小 RNA，这些小 RNA 的功能有<sup>1,2</sup>：

- 1) mRNA 水平抑制基因表达。
- 2) 翻译水平抑制基因表达。

克隆是分析小 RNA 的有效方法之一。由于小 RNA 与 mRNA 不同，它不具有 PolyA tail，因此，在克隆时，需在小 RNA 的 5' 端和 3' 端分别加上 RNA 接头或者 RNA/DNA 杂合形式的接头，经 RT-PCR<sup>3</sup> 后进行 PCR<sup>3</sup>。

本试剂盒是进行小 RNA 克隆用 cDNA 扩增 Kit。

试剂盒通过简单的磁珠吸附操作即可纯化小 RNA 反转录得到的 cDNA，省去了在接头连接之后切胶回收等复杂操作步骤。扩增得到的 cDNA 可以直接用于 TA 克隆，或者利用接头中自带的酶切位点进行克隆。

使用本试剂盒对小 RNA (Small RNA) 进行克隆时的操作流程见图 1。起始的 Small RNA 是由总 RNA 经过电泳及切胶回收得到的。详细步骤如下：

- (1) 将 Small RNA 进行 BAP 处理，5' 端去磷酸化。
- (2) 将带有生物素标记的 RNA/DNA 杂合形式的接头与 BAP 处理后的小 RNA 的 3' 端进行连接。
- (3) 用标记 Streptoavidin 的磁珠，回收带有生物素标记接头的小 RNA，然后进行 5' 端磷酸化反应。
- (4) 将 5' 端连接上 RNA/DNA 杂合形式的接头后，使用 RT Primer 和反转录酶<sup>4</sup> 进行反转录反应。
- (5) 从磁珠上回收合成的 cDNA 后，进行 PCR 反应。
- (6) PCR 片段克隆。

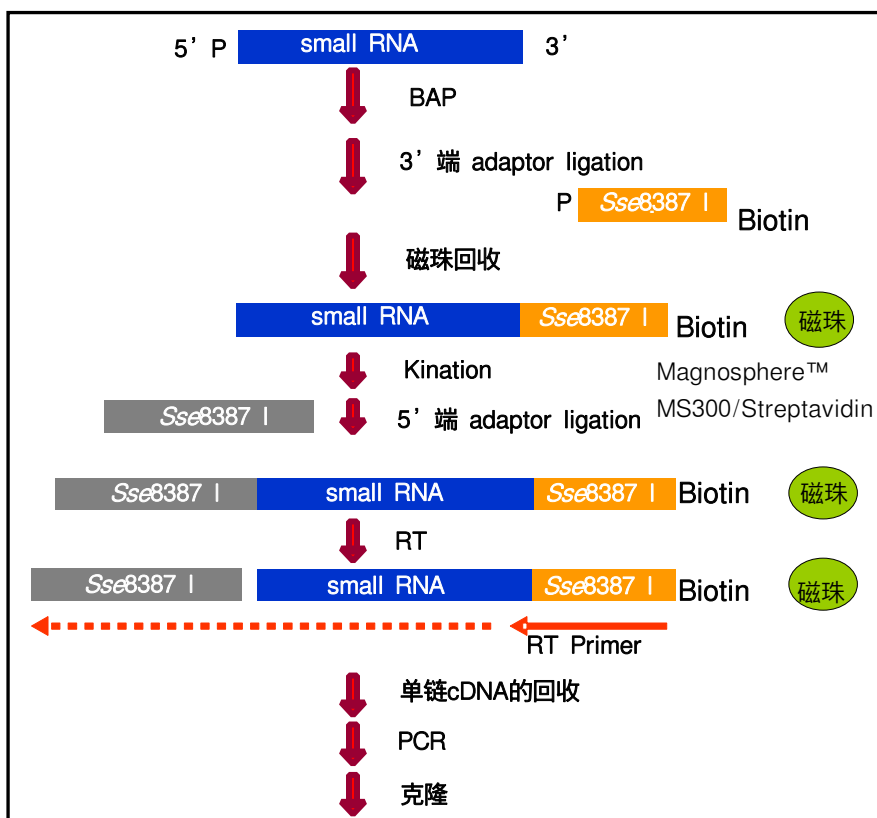


图 1 small RNA 克隆流程图

## ● 制品内容 (10 次量)

### Package1 (-20°C保存)

1. RNase Inhibitor (40 U/μl)	50 μl
2. 10X BAP Buffer	200 μl
3. Alkaline Phosphatase (BAP) (0.4 U/μl)	20 μl
4. 0.1%BSA	60 μl
5. 3' adaptor <sup>*1,2</sup>	10 μl
6. T4 RNA Ligation Buffer	600 μl
7. T4 RNA Ligase (40 U/μl)	20 μl
8. 5X T4 PNK Buffer	100 μl
9. T4 Polynucleotide Kinase (T4 PNK) (10 U/μl)	10 μl
10. 5' adaptor <sup>*1</sup>	10 μl
11. 5X RT Buffer	40 μl
12. dNTP Mixture (2.5 mM each)	90 μl
13. PCR-R & RT-Primer (50 pmol/μl) <sup>*1,3</sup>	20 μl
14. RTase (RNaseH free) (200 U/μl)	10 μl
15. 2X PCR Buffer	250 μl
16. PCR Primer F (50 pmol/μl) <sup>*1</sup>	10 μl
17. TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μl)	10 μl
18. Control RNA (5 pmol/μl) <sup>*4</sup>	10 μl

### Package2 (4°C保存)

19. 3 M Sodium Acetate (pH5.2)	200 μl
20. Dr.GenTLE Precipitation Carrier <sup>*5</sup>	80 μl
21. 2X B/W Buffer	2.7 ml
22. Magnosphere™ MS300/Streptavidin	100 μl
23. RNase free dH <sub>2</sub> O	10 ml

\*1 3' adaptor、5' adaptor、PCR Primer F 及 PCR-R&RT-Primer 上都带有 *Sse8387* I 酶切位点 (引物序列详见第 10 页), 使用 *Sse8387* I 酶切后的 PCR 产物可以与 *Pst*I 酶切的载体进行连接克隆。本试剂盒中不备有限制酶和克隆用载体, 请另外准备。

\*2 3' adaptor 已用生物素标记。

\*3 PCR 用的 Reverse Primer, 也可以作为反转录引物使用。

\*4 Control RNA 是一条 21 mer、5' 端磷酸化的 RNA。

\*5 Dr. GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094)。

## ● 试剂盒外必备材料

### ※ 试剂

苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1, v/v/v)

氯仿/异戊醇 (24: 1, v/v)

乙醇

TE Buffer(10 mM Tris-HCl/1 mM EDTA、pH8.0)

0.1 N NaOH

DNA Size Marker: 如 20 bp DNA Ladder(Code No. 3409)等

RNA Size Marker: 如 14–30 ssRNA Ladder Marker(Code No. 3416)等

10% Polyacrylamide gel (非变性)

15% Polyacrylamide gel (变性)

*Sse8387* I 限制酶 (Code No. 1183A/B)

克隆用载体

*E. coli* 感受态细胞

Ligation 用试剂盒: 如 DNA Ligation Kit, Mighty Mix (Code No. 6023)等

RNA 纯化试剂: 如 RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)\*等

#### ※ 器具

微型离心机

恒温水浴或加热块 (需适用于 15°C、25°C、37°C、42°C、70°C等温度的设定)

微量移液器

Microcentrifuge Tube

Thermal Cycler

PCR 用 0.2 ml Tube

带过滤嘴的 Tips

琼脂糖凝胶电泳装置

聚丙烯酰胺凝胶电泳装置

Magnetic Stand: 如 Magnetic Stand (6 tubes) (Code No. 5328)等

#### ● 保 存:

Package1: -20°C

Package2: 4°C

#### ● 使用前的准备及注意事项

##### 1. 器具灭菌方法

购买的一次性塑料器具通常认为 RNase-free, 在实验中可以直接使用。但离心 Tube 和微量移液器用 tips 等必须经过高压灭菌处理后才可使用。玻璃器具、刮勺等要 160°C 干热灭菌 2 小时以上。不能进行干热灭菌的要用 DEPC 处理水在 37°C 处理 12 小时后再高压灭菌处理 (防止 RNA 甲基化) 后才能使用。RNA 实验用的器具要与其它器具严格分开。由于汗液和唾液是 RNase 污染的主要来源, 因此, 在进行 RNA 相关实验时, 必须戴手套和口罩等。

##### 2. 试剂配制方法

试剂尽可能用 0.1% 的 DEPC 处理水进行配制、高压灭菌后使用。如果含有不能高压灭菌的试剂时, 用预先灭菌的器具和水配制后, 再进行过滤灭菌操作。所有的溶液和蒸馏水均应 RNA 专用。

##### 3. RNA 样品的制备

应尽量避免 Total RNA 的降解。在获得细胞或组织等样品后, 应尽快进行 RNA 提取。若不能及时进行 RNA 提取, 细胞或组织等样品应保存在 -80°C 冰箱或液氮中。

###### (1) Total RNA 的制备

使用氯化铯密度梯度离心法和 AGPC 法或者商业化 RNA 分离精制用试剂和试剂盒。使用商业化试剂时, 首先要确认是否能够回收低分子 RNA。推荐使用如: RNAiso Plus(Code No. 9108/9109)、NucleoSpin<sup>®</sup> miRNA (Code No. 740971.10) 和 NucleoSpin<sup>®</sup> miRNA Plasma (Code No. 740981.10) 等。

## (2) Small RNA 的纯化

Small RNA 分离纯化经常使用聚丙烯酰胺变性凝胶 (15%acrylamide: bisacrylamide (19:1) / 7 M Urea/0.5X TBE 凝胶等)。Marker 可以使用 14–30 ssRNA Ladder Marker (Code No. 3416)。Small RNA 分离纯化可以采用“碎胶浸泡 (crush and soak)”方法。进行乙醇沉淀浓缩样品后, 请使用 10  $\mu$ l RNase free dH<sub>2</sub>O 溶解 RNA。(乙醇沉淀时, 推荐使用 Dr. GenTLE Precipitation Carrier (Code No. 9094) 辅助乙醇沉淀。)

## (3) RNA 纯度

使用本试剂盒每次反应需要约 1–100 ng(大约 0.1–10 pmol)small RNA。虽然很难准确定量纯化的 Small RNA, 但是使用 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) 和 RNA6000 Pico LabChip Kit (Agilent Technologies)等可以准确估算纯化的 Small RNA 数量以及大小的分布 (见图 2)。此外, 可以使用分光光度计测定纯化的 Small RNA 的 OD<sub>260</sub> 值来进行定量。

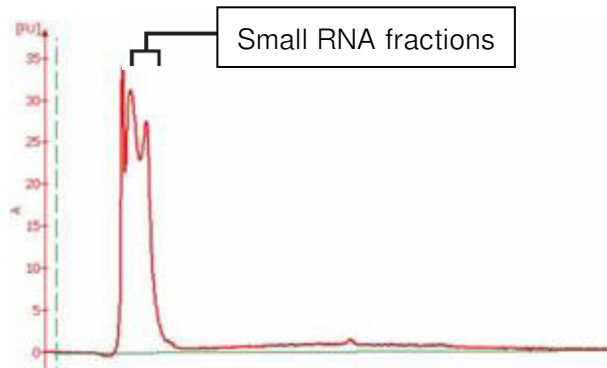


图 2 使用 Agilent Bioanalyzer 分析 Small RNA 的示例

## ● 实验操作

### 1. Small RNA 的 BAP 处理

- 1) 在 1~100 ng 的 Small RNA 中加入 [23]RNase free dH<sub>2</sub>O, 总量至 42  $\mu$ l。
- 2) 在 microcentrifuge tube 中配制如下反应液:

试剂	使用量
Small RNA	42 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[2] 10X BAP Buffer	5 $\mu$ l
[3] BAP	2 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

- 3) 使用移液器轻轻吹吸混匀后, 37°C 反应 1 小时。
- 4) 加入 50  $\mu$ l 的 [23]RNase free dH<sub>2</sub>O, 将总体积调至 100  $\mu$ l 后, 再加入等量 (100  $\mu$ l) 的苯酚/氯仿/异戊醇, 在振荡器上振荡 5~10 秒钟, 使其充分混匀。
- 5) 4°C 15,000 rpm 离心 5 分钟, 将上清 (水层) 转移到新 tube 中。避免接触中间层。
- 6) 再次加入等量的苯酚/氯仿/异戊醇混匀后, 4°C 15,000 rpm 离心 5 分钟, 将上清 (水层) 转移到新的 microcentrifuge tube 中。
- 7) 加入等量的氯仿/异戊醇, 在振荡器上混匀 5~10 秒钟。
- 8) 4°C 15,000 rpm 离心 5 分钟, 将上清 (水层) 转移到新的 microcentrifuge tube 中。
- 9) 向上清中加入 1/10 体积的 [19]3 M Sodium Acetate、4  $\mu$ l 的 [20]Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2.5 倍体积的乙醇, 充分混匀。
- 10) -80°C 放置 1 小时后, 4°C 15,000 rpm 离心 1 小时, 轻轻倒掉上清, 保留沉淀。

- 11) 用 80%乙醇清洗沉淀。
- 12) 风干后 (注意不要过度干燥), 用 14  $\mu$ l 的[23]RNase free dH<sub>2</sub>O 溶解。

## 2. 3' Adaptor 的连接

- 1) 在 microcentrifuge tube 中配制如下反应液。

试剂	使用量
[4] 0.1% BSA	3 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[5] 3' Adaptor	1 $\mu$ l
BAP 处理 Small RNA	14 $\mu$ l
Total	19 $\mu$ l

- 2) 加入 30  $\mu$ l 的[6]T4 RNA Ligation Buffer, 用移液器吹吸混匀 (此 Buffer 比较粘, 吹吸混匀时要轻缓、仔细)。
- 3) 加入 1  $\mu$ l 的[7]T4 RNA Ligase, 用移液器吹吸充分混匀。
- 4) 15°C反应 1 小时。

## 3. Magnetic Beads 的吸附

- 1) 移取 210  $\mu$ l 的[21]2X B/W Buffer 到 microcentrifuge tube 中, 再加入 210  $\mu$ l 的[23]RNase free dH<sub>2</sub>O 配制成 1X B/W Buffer。
- 2) 将[22]Magosphere™ MS300/Streptavidin (magnetic Beads) 充分混匀后, 取 10  $\mu$ l 至新的 microcentrifuge tube 中。
- 3) 将 3-2) 的 tube 置于 Magnetic Stand 上, 静置 30 秒钟后去上清。
- 4) 在 3-3) 的 tube 中加入 10  $\mu$ l 的[21]2X B/W Buffer, 在振荡器上轻轻混匀后, 置于 Magnetic Stand 上, 静置 30 秒钟。(B/W Buffer 中含有 Triton X-100, 易起泡, 但对反应没有影响。)
- 5) 移去 3-4) tube 中的上清, 再加入 50  $\mu$ l 的[21]2X B/W Buffer 后混匀。
- 6) 向上述 2-4) 的连接反应液中加入 50  $\mu$ l 3-5) 中制备的 Magnetic beads, 充分混匀。
- 7) 25°C反应 1 小时。
- 8) 反应结束后, 将 tube 在 Magnetic Stand 上静置 30 秒钟。
- 9) 弃上清后, 加入 100  $\mu$ l 的 1X B/W Buffer, 用 Vortex 短时间振荡, 清洗 Beads。
- 10) 将 tube 在 Magnetic Stand 上静置 30 秒钟, 弃上清。
- 11) 加入 100  $\mu$ l 的[23]RNase free dH<sub>2</sub>O, 轻轻混匀。此水溶液在进行 4-2) 实验之前不要去除。

## 4. 5' 末端磷酸化

- 1) 在 microcentrifuge tube 中于冰上配制如下反应液。

试剂	使用量
[23] RNase free dH <sub>2</sub> O	38 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[8] 5X T4 PNK Buffer	10 $\mu$ l
[9] T4 Polynucleotide Kinase	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

- 2) 将上述 3-11) 中制备的 Beads 水溶液在 Magnetic Stand 上静置 30 秒钟后去上清, 然后加入 50  $\mu$ l 4-1) 配制的反应液, 用移液器轻轻吹吸混匀。

- 3) 37°C反应 30 分钟。
- 4) 在Magnetic Stand 上静置 30 秒钟。
- 5) 弃上清，加入 100  $\mu$ l 的 1X B/W Buffer，用 Vertex 短时间振荡使 Beads 混匀。
- 6) 将 tube 在 Magnetic Stand 上静置 30 秒钟，弃上清。
- 7) 加入 100  $\mu$ l 的 [23]RNase free dH<sub>2</sub>O，轻轻混匀。此水溶液在进行 5-2)实验之前不要去除。

#### 5. 5' Adaptor 的连接

- 1) 在 microcentrifuge tube 中于冰上配制如下反应液，充分混匀。

试剂	使用量
[23] RNase free dH <sub>2</sub> O	14 $\mu$ l
[6] T4 RNA Ligation Buffer*	30 $\mu$ l
[4] 0.1%BSA	3 $\mu$ l
[10] 5' Adaptor	1 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[7] T4 RNA Ligase	1 $\mu$ l
Total	50 $\mu$ l

\*此 Buffer 比较粘，吸取时应轻缓、仔细。

- 2) 将上述4-7)中制备的Beads水溶液在Magnetic Stand 上静置30秒钟后去上清, 然后加入 50  $\mu$ l 5-1) 配制的反应液，用移液器轻轻吹吸混匀。
- 3) 15°C反应 1 小时。
- 4) 加入 50  $\mu$ l 的[23]RNase free dH<sub>2</sub>O 充分混匀后，在 Magnetic Stand 上静置 30 秒钟。
- 5) 弃上清，加入 100  $\mu$ l 的 1X B/W Buffer，用 Vertex 短时间振荡使 Beads 混匀。
- 6) 将 tube 在 Magnetic Stand 上静置 30 秒钟，弃上清。
- 7) 加入 100  $\mu$ l 的[23]RNase free dH<sub>2</sub>O，轻轻混匀。此水溶液在进行 6-2)实验之前不要去除。

#### 6. 反转录反应

- 1) 在 microcentrifuge tube 中于冰上配制如下反应液。

试剂	使用量
[11] 5X RT Buffer	4 $\mu$ l
[12] dNTP Mixture	4 $\mu$ l
[1] RNase Inhibitor	1 $\mu$ l
[13] PCR-R & RT-Primer	1 $\mu$ l
[14] RTase (RNaseH free)	1 $\mu$ l
Total	11 $\mu$ l

- 2) 将上述5-7)中制备的Beads水溶液在Magnetic Stand 上静置30秒钟后去上清, 然后加入 9  $\mu$ l 的 [23]RNase free dH<sub>2</sub>O，70°C处理 5 分钟后，冰上静置 1~2 分钟。
- 3) 加入上述 6-1) 中配制的反应液 11  $\mu$ l，总体积为 20  $\mu$ l。均匀混合后 42°C反应 1 小时。
- 4) 在 Magnetic Stand 上静置 30 秒钟。
- 5) 去除上清，加入 100  $\mu$ l 的 1X B/W Buffer，用 Vertex 短时间振荡使 beads 混匀。
- 6) 将 tube 在 Magnetight Separation Stand 上静置 30 秒钟，弃上清。
- 7) 加入 100  $\mu$ l 的[23]RNase free dH<sub>2</sub>O，轻轻混匀。此水溶液在进行 7-2)实验之前不要去除。



7. PCR

1) 在 microcentrifuge tube 中于冰上配制如下反应液。

试剂	使用量
[23] RNase free dH <sub>2</sub> O	12 μl
[15] 2X PCR Buffer	25 μl
[12] dNTP Mixture	5 μl
[16] PCR-Primer F	1 μl
[13] PCR-R & RT-Primer	1 μl
[17] <i>TaKaRa Ex Taq</i> HS	1 μl
Total	45 μl

2) 将上述6-7)中制备的Beads水溶液在Magnetic Stand上静置30秒钟后去上清，然后加入5 μl的0.1 N NaOH，用手指轻弹tube混匀（注意不能用移液器吹吸混匀，因为磁珠会吸附于Tip壁上）。

3) 25°C放置5分钟后，在Magnetic Stand上静置30秒。

4) 取上清移至PCR用0.2 ml tube中。

5) 加入45 μl上述7-1)中配制的反应液，充分混匀。

6) 在Thermal Cycler PCR仪上按以下条件进行PCR反应。

94°C 2 min.  
 94°C 30 sec. } 15 Cycles  
 60°C 30 sec. }  
 72°C 30 sec. }  
 72°C 3 min.  
 4°C

7) 取1/10量(5 μl)的PCR反应液，使用10%的Polyacrylamidegel(非变性)进行电泳，用SYBR® Green I染色后，使用FMBIO II Multi-View进行检出。结果见图3，Lane 1是不加Model RNA的反应结果，Lane 2是加入了10种Model RNA的反应结果。

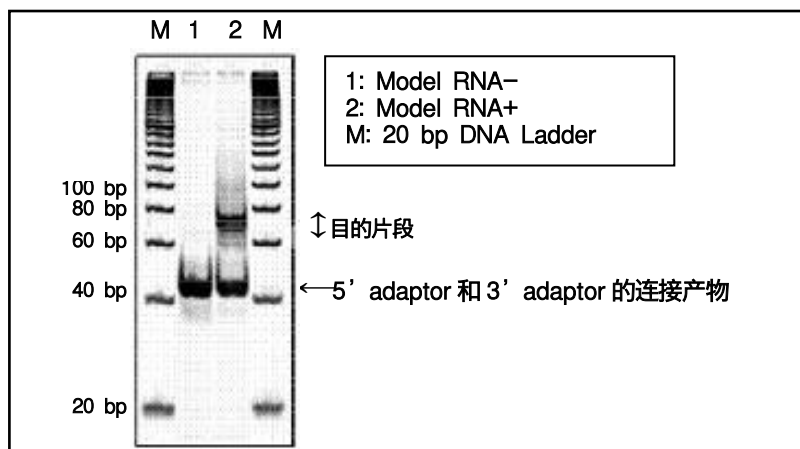


图3 10种Model RNA (16 nt-30 nt) 反应结果 (由FMBIO II Multi-view检测)

8) 在剩下的PCR反应液中加入TE Buffer定容至100 μl，再加入等量的苯酚/氯仿/异戊醇，在振荡器上振荡混匀5~10秒钟，使其充分混匀。

9) 4°C 15,000 rpm离心5分钟，将上清(水层)移至新的tube中。(注意：不要取到中间层)。

10) 加入等量的氯仿/异戊醇，在振荡器上混匀5~10秒钟。

- 11) 4°C 15,000 rpm 离心 5 分钟, 将上清(水层)移至新的 tube 中。
- 12) 向上清中加入 1/10 体积的[19]3 M Sodium Acetate、4 μl 的[20]Dr. GenTLE Precipitation Carrier、2.5 倍体积的乙醇, 充分混匀。
- 13) -80°C 放置 30 分钟后, 4°C 15,000 rpm 离心 15 分钟, 轻轻除去上清, 保留沉淀。
- 14) 用 80%乙醇清洗沉淀。
- 15) 风干后(注意不要干燥过度), 将沉淀用 5 μl 的 TE Buffer 溶解。

### 可选操作

#### A. TA Cloning 用 PCR 片段的纯化

1. 向上述实验操作 7 的 PCR 产物中加入 1 μl 的 6X Loading Buffer(36% Glycerol, 30 mM EDTA, 0.05% BPB, 0.05% XC), 进行 10%的 Polyacrylamide gel (未变性) 电泳 (Marker: 20 bp DNA Ladder; Code No. 3409)。
2. BPB 泳动至 4/5 胶长时即停止电泳。把凝胶放入新配制的染色液 (EtBr、SYBR<sup>®</sup> Green I 等) 中进行染色。
3. 用干净的刀片将目的片段切出。目的片段的长度是 RNA 长度+PCR Primer F+PCR-R & RT-Primer 的长度之和。例如: [18]Control RNA 长度为 21 mer, 目的片段的长度为 65 bp。
4. 使用“crush and soak”方法或商品化试剂盒从凝胶中纯化 DNA 片段。(例如 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up, Code No. 740609.10/.50/.250)。

#### B. *Sse8387* I 酶切及产物纯化

1. 在 microcentrifuge tube 中配制如下反应液。

试剂	使用量
灭菌蒸馏水	34 μl
10X M Buffer	5 μl
0.1% BSA	5 μl
上述实验操作 7 的 PCR 产物	5 μl
<i>Sse8387</i> I (10 U/μl)	1 μl
Total	50 μl

2. 37°C 过夜反应。
3. 加入 5 μl 的 3 M NaOAc(pH5.2)、125 μl 的 100%乙醇混匀后, -80°C 放置 30 分钟, 4°C 15,000 rpm 离心 15 分钟。
4. 轻轻倒掉上清, 用 80%乙醇清洗沉淀。
5. 风干后(注意不要过度干燥), 将沉淀用 5 μl 的 TE Buffer 溶解。
6. 加入 1 μl 的 6X Loading Buffer 进行 15%的 Polyacrylamidegel (非变性) 电泳 (Marker: 20 bp DNA Ladder; Code No. 3409)。
7. BPB 泳动至 4/5 胶长时即停止电泳。把凝胶放入新配制的染色液 (EtBr、SYBR<sup>®</sup> Green I 等) 中进行染色。
8. 用干净刀片把目的片段切出。目的片段长度是 RNA 长度+PCR Primer F+ PCR-R & RT-Primer 之和, 再用 *Sse8387* I 酶切后的片段长度 (*Sse8387* I 酶将切去 22 bp)。例如: RNA 长度为 21 mer, PCR 片段长度为 65 bp; 用 *Sse8387* I 酶切后的长度为 43 bp。
9. 纯化片段的方法与 A 的步骤 4 相同。

## C. 载体连接及转化

1. 将纯化的 PCR 片段与 50 ng 的 T-Vector (例如 T-Vector pMD20 (Code No. 3270), T-Vector pMD19 (Simple) (Code No. 3271))混合后用于 TA 克隆。克隆 *Sse*8387 I 酶切产物时, 加入 50 ng *Pst* I-digested 载体 (例如 pUC118 *Pst* I/ BAP (Code No. 3323))。取试剂盒中的连接液 (Code No. 6023), 等体积加入, 轻柔混匀, 16°C 反应 30 分钟。
2. 取一部分连接液转化感受态细胞 (例如 *E. coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052))。(做电转化时, 建议先将连接液用乙醇沉淀之后, 再用无菌蒸馏水溶解后使用。)
3. 取适量的转化细胞涂布于含相应抗生素的选择培养基中, 37°C 培养。

## ● Troubleshooting

当实验出现问题时, 请从以下几个方面进行检查。

1. 利用 Control RNA 进行实验检测。

本试剂盒中的 Control RNA 是 5' 端磷酸化的 21mer RNA。使用此 RNA 进行实验时请确认 PCR 产物是否正确 (图 4: Lane 1,2 的结果)。如果出现像 Lane 3,4 那样二条带的情况, 通常是 RNA 的 BAP 处理不够充分, 这时需要对 RNA 重新进行 BAP 处理。

如果 Control RNA 实验没有问题, 那请在实际实验时增加使用 Small RNA 的量。

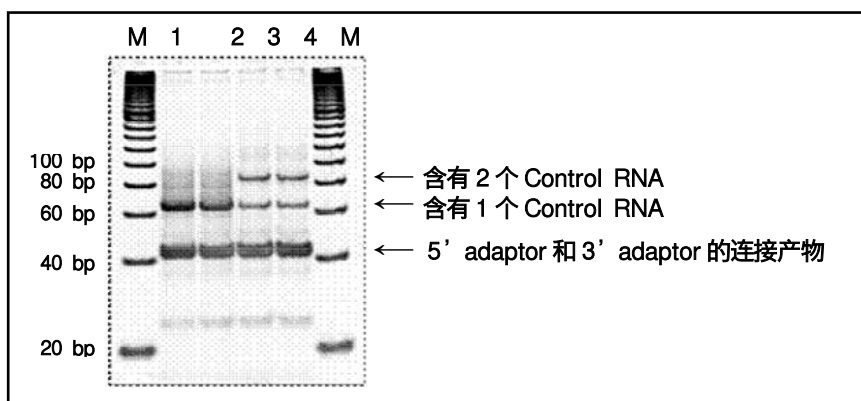


图 4 使用 Control RNA 时 PCR 产物电泳图 (由 FMBIO II Multi-view 检测)

Lane 1、2: Control RNA 经过 BAP 处理

Lane 3、4: Control RNA 连接 3' adaptor 时未经过 BAP 处理。由于 RNA 的 5' 端带有磷酸基团, RNA 产生了自连。

M: 20 bp DNA Ladder

2. RNase 污染

为了避免 RNase 的污染, 操作时要十分注意。使用的器具、试剂尽量干热灭菌或湿热灭菌。实验时必须戴手套、口罩等。

3. 有关 T4 RNA Ligation Buffer 的混合

为了提高反应效率, 本试剂盒中的 T4 RNA Ligation Buffer 中加入了 PEG。PEG 较粘稠, 在 Buffer 吸取时要慢慢吸入, 保证液体充分吸入 Tip 中 (当 Tip 离开液体时, 确保 Tip 尖端没有空气吸入)。加入 Buffer 时尽量不要起泡, 并用枪吹吸 10 次左右保证 Buffer 充分混匀。

注意: 根据末端碱基不同, T4 RNA Ligase 的 Ligation 反应效率会有所差别。此外, 在连接反应过程中, RNA 的末端核苷酸可能会丢失 1 到多个。

4. 有关 PCR 产物的切胶回收

电泳时 DNA 加样量过多或电泳时间过短, 会出现图 3 中出现的 DNA 条带的拖尾现象。这时可以减少 DNA 的加样量或使用大孔胶进行电泳。此外, 调小电压降低电泳速度也可改善拖尾现象。

切胶时注意不要切到目的片段下面的小片段 (Adaptor 之间的连接片段)。片段上下有拖尾现象时, 不要切取拖尾部分的 DNA。

#### 5. 其他方面

实验操作时, Magnetic Beads 中的溶液去除后, 应立即加入下一步溶液, 以防止 Beads 干燥影响实验结果。

### ● 引物序列

名称	碱基序列	备注说明
PCR-R & RT-Primer	5' -GTCTCTAGCCTGCAGGATCGATG-3'	反转录反应及 PCR 反应的 Reverse 引物, 含有 Sse8387 I 的识别序列 (阴影部分)。
PCR-Primer F	5' -AAAGATCCTGCAGGTGCGTCA-3'	PCR 反应的 Forward 引物, 含有 Sse8387 I 的识别序列 (阴影部分)。
Control RNA	5' p-AGAUGACGGCAACUACAAGAC-3'	用于 Control 反应。

### ● 参考文献

- 1) Bartel, D. P. (2004) *Cell*. **116**:281.
- 2) Aravin, A., *et al.* (2005) *FEBS Lett.* **579**:5830.
- 3) <http://web.wi.mit.edu/bartel/pub/protocols/miRNACloningUpdate0705.pdf>
- 4) Roth, M. J., *et al.* (1985) *J. Biol. Chem.* **260**: 9326.

### ● 关联产品

RNAiso Plus (Code No. 9108/9109)  
 NucleoSpin® miRNA (Code No. 740971.10/.50/.250)  
 NucleoSpin® miRNA Plasma (Code No. 740981.10/.50/.250)  
 NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Code No. 740609.10/50/250)  
 14-30 ssRNA Ladder Marker (Code No. 3416)  
 Dr. GenTLE® Precipitation Carrier (Code No. 9094)  
 Recombinant RNase Inhibitor (Code No. 2313A/B)  
 Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (Code No. 2120A/B)  
 T4 RNA Ligase (Code No. 2050A/B)  
 Magnetic Stand (6 tubes) (Code No. 5328)  
 T4 Polynucleotide Kinase (Code No. 2021/A/B/S)  
 PrimeScript™ Reverse Transcriptase (Code No. 2640A/B)  
 TaKaRa Ex Taq® Hot Start Version (Code No. RR006A/B)  
 dNTP Mixture (2.5 mM each) (Code No. 4030)  
 20 bp DNA Ladder (Code No. 3409A/B)  
 DNA Ligation Kit, Mighty Mix (Code No. 6023)  
 Sse8387 I (Code No. 1183A/B)  
 T-Vector pMD20 (Code No. 3270)  
 T-Vector pMD19 (Simple) (Code No. 3271)

pUC118 *Pst* I/BAP (Code No. 3323)  
*E. coli* JM109 Competent Cells (Code No. 9052)

*TaKaRa Ex Taq* is a registered trademark of Takara Bio Inc.  
SYBR is a registered trademark of Life Technologies Corporation.  
PrimeScript and Dr. GenTLE are trademarks of Takara Bio Inc

**注意**

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站[www.takarabio.com](http://www.takarabio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

**技术咨询热线：**

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

**TAKARA BIO INC.**

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>