

miRNA RT/qPCR

Detection kit



北京艾德莱生物科技有限公司

Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 邮箱：info@aidlab.cn

使用说明书

组成	PC6301
E.coli Poly(A) Polymerase(5U/μl)	50U
TRUEScript H ⁻ RTase (200U/μl)	5000 U
2 × miRT Reaction Mix	250 μl
Reverse primer(10μM)	200 μl
2 x miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	5 ml
ROX Reference Dye	100 μl
RNase free H ₂ O	1 ml

产品组成、储存： -20℃ 保存。

制品说明： miRNA 反转录/荧光定量检测试剂盒含 miRNA 检测的全部试剂。以 miRNA 为模板，采用特殊优化预混合 mix 将 Poly(A)加尾和反转录一步法高效完成 cDNA 合成；miRNA 检测使用 2 x miRNA qPCR Mix。适用于 Total RNA 或者 small RNA 等包含 miRNA 的样品。

制品特点：

- 最佳的 Poly(A)加尾酶和反转录酶配比及优化的反应 buffer，确保 miRNA 的反转录效率。
- PolyA 加尾和反转录 cDNA 合成在同一管内一步法完成。
- 2×miRNA qPCR Mix 扩增效率高，特异性强和灵敏度高。
- 配套 ROX Reference Dye，可以用于各种需要高低 ROX 参比染料的机型。

操作步骤：

一、miRNA 3' 末端进行 Poly (A)加尾和逆转录反应（第一链合成）

1. 加入以下试剂至总体积20μl（最后加入*E.coli* Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻ RTase）

Components	Volume	Final Concentration
Total RNA	x μl	Up to 2μg
2 × miRT Reaction Mix	10 μl	1 ×
<i>E.coli</i> Poly(A) Polymerase(5U/μl)	0.3-0.4 μl(见注意事项)	2U
TRUEScript H ⁻ RTase (200U/μl)	0.8-1μl (见注意事项)	200U
RNase free H ₂ O to final volume	20 μl	

注意事项： *E.coli* Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁻ RTase 非常粘稠和微量，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心后使用，并且避免吸头外壁沾附损失。*E.coli* Poly(A) Polymerase可以每次按照0.3μl使用，TRUEScript H⁻ RTase 可以每次按照0.8μl使用，也不影响使用效果。

*在反应中使用的total RNA 必须含有小分子RNA。

*此过程也可以使用小分子RNA， miRNA无法直接用分光光度计定量，建议加入量为2μl~5μl。可根据目的miRNA丰度决定加入量，但是对于低丰度miRNA 样品而言(如血清血浆提取物)，可直接加入最大体积8 μl。

- 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在42℃反应60 min。
- 85℃加热5秒钟失活*E.coli* Poly(A) Polymerase 和 TRUEScript H⁺ RTase。合成的cDNA反应液可放置于-20℃保存；也可以直接进行下游PCR或者荧光定量PCR检测。

二、进行荧光定量PCR检测。

Forward Primer设计原则：

- 遵循引物设计的最普遍原则。
- 以成熟的miRNA 序列为基础，将U 替换成T，这是最基础和最简单的设计方法。
- 试剂盒中提供的下游引物的T_m 值为65℃，设计上游引物的T_m 值要尽量保证在65℃左右。
- 若按照原则2 的方式直接设计的引物其T_m 值过低，可以在引物的5' 端添加几个碱基（最好为G 或C 碱基）；也可以在3' 端添加1 个或几个A 碱基（只可加A）；或者5' 端和3' 端同时修饰。
- 若按照原则2 的方式直接设计的引物其T_m 值过高，可以在引物的5' 或3' 端去掉几个碱基。

注意事项：

- miRNA 第一链cDNA 的加入量不要超过real time PCR 体积1/10。
- 对于特殊的检测体系中，高含量的cDNA 模板易导致非特异性扩增，根据所检测miRNA 的丰度适当的稀释cDNA（5-10倍或者100倍）。使用富集的miRNA做起始模板，可降低非特异扩增，提升敏感度。
- 2 x miRNA qPCR Mix不含参比染料ROX，客户并根据qPCR仪器技术指导决定是否需要加ROX参比染料，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，配套ROX产品货号为PC38 Rox Reference Dye。


操作步骤：

- 在室温融化2 x miRNA qPCR Mix和Reverse primer（10μM）。
- 使用时请将2 x miRNA qPCR Mix上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并轻轻离心后使用。如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。注：请不要使用振荡器混匀。
- 按照下表组分冰上进行反应液的配制

Components	Volumn		Final Concentration
2 x miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	25 μl	10 μl	1x
Forward primer(10μM)	1 μl	0.4 μl	0.2μM
Reverse primer(10μM)	1 μl	0.4 μl	0.2μM
miRNA第一链cDNA	x μl	x μl	—
ddH2O to final volume	50 μl	20 μl	

PCR 循环（三步法）

94℃ 2-3 min
 94℃ 10-20 sec
 60℃ 10-20 sec
 72℃ 20 sec




35-45 cycles

Dissociation Stage

PCR 循环（二步法）

94℃ 2-3 min
 94℃ 15-20 sec
 60℃ 40 sec



35-45 cycles

Dissociation Stage

注：提高特异性可选择两步法。提高扩增效率可选择三步法。