

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

组成	PC6301
miRNA RT Enzyme Mix	50 μ l
2 x miRNA RT Reaction Mix	250 μ l
Reverse primer(10 μ M)	200 μ l
2 x miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	5 ml
ROX Reference Dye	100 μ l
RNase free H ₂ O	1 ml

产品组成、储存： -20°C 保存。

制品说明： 增强型 miRNA 反转录/荧光定量检测试剂盒包含 miRNA 检测的全部试剂。本制品采用 Poly (A) 加尾法，以 miRNA 为模板，采用特殊优化预混合 miRNA RT Enzyme mix (包含 Poly(A)加尾酶和反转录酶) 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 x 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. 解冻 2 x miRNA RT Reaction Mix 并混匀，miRT Enzyme Mix 放于冰中备用，加入以下试剂至总体积 20 μ l (最后加入 miRNA RT Enzyme Mix)。

Components	Volume	Final Concentration
Total RNA*	x μ l	Up to 2 μ g
2 x miRNA RT Reaction Mix	10 μ l	1 x
miRNA RT Enzyme Mix	2 μ l (见注意事项)	-
RNase free H ₂ O to final volume	20 μ l	-

注意事项： miRNA RT Enzyme Mix 非常粘稠，溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失，用前请点甩离心，并且避免吸头外壁沾附损失。Enzyme Mix 内酶都是过量的，即使每次按照 1.8 μ l 使用，也不影响使用效果。

*在反应中使用的 total RNA 必须包含有小分子 RNA(miRNA)。此过程也可以使用富集的 miRNA，单纯 miRNA 无法直接用分光光度计定量，建议直接加入 2 μ l ~5 μ l。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 μ l。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后在 42°C 反应 60 min。

3. 85°C加热5秒钟失活miRNA RT Enzyme Mix。合成的cDNA反应液可放置于-20°C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：

1. 遵循引物设计的最普遍原则。
2. 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。
3. 试剂盒中提供的Reverse primer的Tm 值为65°C，设计上游引物的Tm 值要尽量保证在65°C左右。
4. 若按照原则2 的方式直接设计的引物其Tm 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'端同时添加。
5. 若按照原则2 的方式直接设计的引物其Tm 值过高，可以在引物的5'或3'端去掉几个碱基。

注意事项：

1. miRNA 第一链cDNA 的加入量不要超过real time PCR 体积1/10。
2. 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。
3. 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：

1. 在室温融化2 x miRNA qPCR Mix和Reverse primer（10μM）。
2. 使用时请将2 x miRNA qPCR Mix上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并经轻微离心后使用。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。
3. 按照下表组分冰上进行反应液的配制

Components	Volume		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	—
ddH ₂ O to final volume	50 μl	20 μl	

PCR 循环（三步法）


94°C 2-3 min
 94°C 10-20 sec
 60°C 10-20 sec
 72°C 20 sec
 Dissociation Stage



35-45 cycles

PCR 循环（二步法）

94°C 2-3 min
 94°C 10 sec
 60°C 30-34 sec
 Dissociation Stage



35-45 cycles

注：提高特异性可选择两步法。提高扩增效率可选择三步法。