

## 产品简介

miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 通过加尾法给样品中的 RNA 加上一段 poly(A)，通过带有特异序列的 RT 引物进行逆转录，将所有 miRNA 在一个反应中全部逆转录成 cDNA，并通过 miRNA 的特异性正向引物与通用反向引物进行特异性的 miRNA qPCR 检测。该方法能够从单一样品中快速、准确地定量检测多种 miRNA 及其他 RNA，具有操作简便，灵敏度高，特异性好等优点。

表 1 试剂盒包含试剂内容

试剂	浓度	C10712-1 (20T+20T+200T)
<b>Poly(A) Tailing</b>		
Poly(A) Polymerase (red)	-	20 μL
5X Poly(A) Polymerase Buffer (blue)	5 X	40 μL
<b>Uni-RT</b>		
RTase mix (yellow)	-	80 μL
5X RTase Buffer (violet)	5 X	80 μL
miDETECT A Track™ Uni-RT Primer	5 μM	40 μL
<b>qPCR</b>		
2X SYBR Green Mix (brown)	2 X	1 mL × 2
miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer	10 μM	100 μL × 2

注：需搭配 miDETECT A Track™ miRNA Forward Primer 使用（需另外购买）。

## 运输保存

本试剂盒产品为**低温运输**。收到产品后，请于**-20℃以下低温保存**，可以稳定保存一年。所有试剂使用前需先混匀再**瞬时离心**后取用。

## 使用前须知

- 1) 实验过程中，产品请于冰上放置，使用完毕后请于-20℃以下小心保存，以避免引物降解或酶失活。
- 2) 推荐搭配锐博生物的 miDETECT A Track™ miRNA qPCR Primer 及同系列参照基因引物（详见说明书相关产品部分）进行实验，其他来源的引物请自行判断并测试使用效果。

## 实验方法

以下是搭配锐博生物 miDETECT A Track™ miRNA qPCR Primer 进行检测的实验方法。

### 1. Poly(A) Tailing

- 1) 冰上制备反应体系，按表 2 的配制比例配制所需的反应体系：

表 2 polyA 加尾反应体系（冰上配制）

试剂	用量(10 μL 体系)
Total RNA	1 μg
5X Poly(A) Polymerase Buffer (blue)	2 μL
Poly(A) Polymerase (red)	1 μL
RNase-free water	Up to 10 μL

注：①RNA 模板可使用 total RNA、富集过的小分子 RNA 及化学合成的 miRNA 标准品等，若使用 miRNA 标准品作为 RNA 模板，请参考 miRNA 标准品说明书；②体系可按照需求放大，20 μL 反应体系建议不超过 5 μg 的 Total RNA。

- 2) 混匀上述反应体系，37 °C 反应 1 h；  
3) 反应完成后置于冰上备用或者于-80 °C 保存。

### 2. 逆转录反应

- 1) 冰上制备逆转录反应体系，按表 3 的配制比例配制所需的反应体系：

表 3 加尾产物逆转录反应体系（冰上配制）

试剂	用量
RTase mix (yellow)	4 μL
5X RTase Buffer (violet)	4 μL
miDETECT A Track™ Uni-RT Primer	2 μL
Poly(A) Tailing 产物	10 μL

- 2) 混匀上述反应体系，42 °C 反应 1 h，然后于 72 °C 孵育 10 min；  
3) 反应完成后所得 cDNA 置于冰上备用或者于-20 °C 保存。

### 3. qPCR 反应

- 1) 冰上制备 qPCR 反应体系，按表 4 的配制比例配制所需的反应体系：

表 4 qPCR 反应体系（冰上配制）

试剂	用量
miDETECT A Track™ miRNA Forward Primer (10μM)	0.5 μL
miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer (10μM)	0.5 μL
2X SYBR Green Mix (brown)	10 μL
cDNA	2 μL
RNase-free water	Up to 20 μL

注：①cDNA 最高使用不稀释的逆转录产物 2 μL (20 μL 体系)，对于表达丰度较高的 miRNA，可将 cDNA 稀释后再进行 qPCR，稀

释比例可以在 10–1000 倍之间，请根据具体的 Ct 值进行调整；②请搭配使用 *miDETECT A Track™* miRNA Forward Primer 进行 qPCR 扩增。  
 ③本试剂盒不含 ROX 染料。使用 ABI PRISM® 7000/7700/7900HT/7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 等需额外添加 ROX 染料作为校正荧光的仪器，需用户自行准备所需的 ROX 染料。具体使用方法请参考仪器说明及 ROX 染料试剂说明。

2) 轻轻混匀上述反应体系（避免剧烈涡旋振荡），使用三步法进行 qPCR 反应(表 5):

表 5 qPCR 反应程序

步骤	程序	循环数
1	95 °C 10 min	1
2	95 °C 2 s	40
	60 °C 20 s	
	70 °C 10 s	
3	融解曲线生成	1

注：①以上程序适用于 BioRad CFX96 仪器，其它可以设置为恒温 10 秒或以内收集信号的 qPCR 仪亦可使用该程序。②部分品牌或型号 qPCR 仪在收集荧光信号时需较长的恒温时间方能收集信号，使用此类仪器建议将反应程序更改为两步法，将退火及延伸反应合并，时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。③对于用 SYBR Green I 染料法进行的 qPCR 的检测反应都需要在循环结束后立即进行熔解曲线分析，检测温度为 70°C–95°C，升温速率为 0.5°C/次，恒温时间为 5 sec/次，或采用仪器默认程序进行熔解曲线分析。

## 相关产品

表 6 相关产品

产品编号	产品名称
Variant <sup>1</sup>	<i>miDETECT A Track™</i> miRNA Forward Primer
C10711	<i>miDETECT A Track™</i> miRNA qPCR Kit (200T qPCR)
miRAN0001 <sup>2</sup>	<i>miDETECT A Track™</i> 5S Forward Primer
miRAN0002 <sup>2</sup>	<i>miDETECT A Track™</i> U6 Forward Primer
miRAN0004 <sup>2</sup>	<i>miDETECT A Track™</i> h-SNORD48 Forward Primer
miRAN0005 <sup>2</sup>	<i>miDETECT A Track™</i> h-SNORD44 Forward Primer
Variant <sup>1</sup>	<i>miDETECT™</i> miRNA qRT-PCR Standard RNA

注：1，根据 miRNA 不同或/和规格不同编号不同；2，常用内参基因正向引物，其中 miRAN0001 和 miRAN0002 适用于人、小鼠、大鼠细胞样品或以细胞为主的组织样品，miRAN0004 和 miRAN0005 仅适用于人源细胞样品或以细胞为主的组织样品。

## FAQ

1, 是否可以搭配其他公司的逆转录引物、反向引物及试剂盒?

- 1) 正向引物可能可以搭配其它加尾法试剂盒使用, 效果未知且不能保证;
- 2) 此外, 逆转录引物与反向引物需搭配使用, 无法各自搭配其它供应商引物。

2, 引物非特异扩增怎么办?

在合理的 Ct 值范围内 (15-30, 数据稳定性好的 30-35) 出现熔解曲线有杂峰的现象, 建议做如下改进:

- 1) 使用更合适的扩增条件 (控制延伸时间, 提高退火温度);
- 2) 确认 RNA 模板质量, 使用高质量高完整度的 RNA 模板;
- 3) 以上均不能解决杂峰现象, 请提供具体实验信息及数据, 我司可协助分析处理。

3, 无扩增信号是不是引物不行?

只要引物序列能够跟目的模板序列匹配上, 基本可以扩增, 建议做如下改进或检测:

- 1) 使用合适的反应体系及程序;
- 2) 使用阳性对照样品 (如对应 miRNA 的 mimic) 进行加尾、逆转录及 qPCR;
- 3) 如若反应体系、程序和引物都没有问题, 很有可能是目的 miRNA 在实验模型中表达丰度很低或不表达, 建议更换实验模型。

4, 阴性样品有信号是不是引物问题?

具体 Ct 值分析对样品扩增信号有没有影响, 若有影响, 处理同引物非特异扩增。

5, RT 前是否可以对 RNA 进行高温变性处理?

高温变性处理主要是为了打开 RNA 的二级结构, 可以在 RT 前将 RNA 在 70°C 中变性 10min, 然后冰浴 2min 再进行 RT 反应。

6, qPCR 的设定程序中预变性 10min 时间太长, 是否可以缩短?

预变性时长主要是根据 Taq 酶的热激活时间设定, 我们的试剂盒采用的是化学修饰的 Taq 酶, 热激活时长较长, 不能缩短; 如果采用其他 Taq 酶 (如抗体修饰的 Taq 酶), 热激活时间可能较短。请严格按照具体使用的 qPCR 试剂盒/Taq 酶使用说明书进行操作。