

产品简介

miDETECT A Track™ miRNA qPCR Kit 为 miRNA 加尾法 qRT-PCR 检测试剂盒 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 的补充 qPCR 试剂。本试剂盒包括了含 SYBR Green 及热启动酶等的 qPCR 混合液及通用反向引物 miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer, 需搭配 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 加尾逆转录得到的 cDNA 以及 miDETECT A Track™ miRNA Forward Primer 进行 miRNA 的 qPCR 检测。

表 1 C10711 试剂盒包含试剂内容

试剂	浓度	C10711 (200T)
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 qRT-PCR Starter Kit 加尾逆转录得到的 cDNA 以及锐博生物 miDETECT A Track™ miRNA Forward Primer 使用。

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

本试剂盒需搭配 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 加尾逆转录得到的 cDNA 以及锐博生物 miDETECT A Track™ miRNA Forward Primer 进行 miRNA 的 qPCR 检测。

实验方法

以下为 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 的实验方法，本试剂盒用于其中的 qPCR 反应。

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 (10 μM)	0.5 μL
miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer (10 μM)	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	熔解曲线生成	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
C10712-1	<i>miDETECT A Track™</i> miRNA qRT-PCR Starter kit (20T+ 20T+200T)
Variant ¹	<i>miDETECT A Track™</i> miRNA Forward Primer
miRAN0001 ²	<i>miDETECT A Track™</i> 5S Forward Primer
miRAN0002 ²	<i>miDETECT A Track™</i> U6 Forward Primer
miRAN0004 ²	<i>miDETECT A Track™</i> h-SNORD48 Forward Primer
miRAN0005 ²	<i>miDETECT A Track™</i> h-SNORD44 Forward Primer
Variant ¹	<i>miDETECT™</i> miRNA qRT-PCR Standard RNA

注：1, 根据 miRNA 不同或规格不同编号不同； 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。

1, 是否可以搭配其他公司的逆转录试剂盒及引物?

若不使用 miDETECT A Track™ miRNA qPCR Kit 中的 miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer 进行实验, 可将 2X SYBR Green Mix 作为常规 SYBR Green qPCR Mix 使用。miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer 则只能搭配 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 反应产生的 cDNA 使用。

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 或标准品) 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, 建议更换为其它样品或模型再进行相应 miRNA 的实验。

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, qPCR 的设定程序中预变性 10min 时间太长, 是否可以缩短?

预变性主要目的为激活热启动酶, 需根据热启动酶的性质设置, 不能缩短; 如果采用其他热启动 Taq 酶或试剂盒, 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。