

miRNA RT/qPCR Detection kit (by poly A)

货号: DN2215-01

规格: 25 次

保存: -20 °C

【产品简介】

本试剂盒采用 Poly(A)加尾法原理, 试剂盒包含 miRNA 检测的全部试剂。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。

【产品组分】

货号	组分	体积
DN2215-101	miRNA RT Enzyme Mix	50 ul
DN2215-102	2 × miRT Reaction Mix	250 ul
DN2215-103	Reverse primer(10μM)	200ul
DN2215-104	2 ×miRNA qPCR Mix(Sybr Green)	5ml
DN2215-105	ROX Reference Dye	100ul
DN2215-106	RNase free H ₂ O	1 ml

【产品特点】

1. 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。
2. PolyA 加尾和反转录 cDNA 合成在同一管内一步法完成。
3. 2 ×miRNA qPCR Mix 扩增效率高, 特异性强和灵敏度高。
4. 配套 ROX Reference Dye, 可以用于各种需要高低 ROX 参比染料的机型。

【保存条件】

-20 °C 恒温保存, 保质期一年。

【使用方法】

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miRNA RT Enzyme Mix)

Components	Volume	Final Concentration
Total RNA	x μl	Up to 2μg
2 × miRT Reaction Mix	10 μl	1 ×
miRNA RT Enzyme Mix	1.8-2 μl(见提示)	-
RNase free H ₂ O to final volume	20 μl	-

提示: miRNA RT Enzyme Mix 比较粘稠, 溶液容易吸附在管壁和吸头外导致损失, 用前请点甩离心后使用, 并且避免吸头外壁沾附损失。可以每次按照1.8μl使用, 不影响使用效果。

*在反应中使用的total RNA 必须含有小分子RNA (miRNA)。此过程也可以使用富集的, 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), 可加入最大体积8 μl。

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 T_m 值为 65° C，设计上游引物的 T_m 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 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' 端同时添加。
5. 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：

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 × miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer（10 μM）。
2. 使用时请将 2 × 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。
3. 按照下表组分冰上进行反应液的配制

Components	Volume		Final Concentration
2 × miRNA qPCR Mix(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	

两步法流程	温度	时间	
预变性	94°C	2 min	
变性	94°C	15 sec	} 40 个循环
退火/延伸	60°C	30 sec	
融解曲线			机器默认设置
三步法流程	温度	时间	
预变性	94°C	2 min	
变性	94°C	15 sec	} 40 个循环
退火	60°C	15 sec	
延伸	72°C	30 sec	
融解曲线			机器默认设置

注：提高特异性可选择两步法。提高扩增效率可选择三步法。

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，承诺为您更换等量合格产品，本公司对此产品所承担的责任仅限于产品价值本身。