

Enhanced miRNA First-Strand Synthesis RT-PCR Kit

使用说明书

包装量:

| 目录编号 | 包装单位 |
|----------|-----------|
| MP101-01 | 25 次*20ul |

| 试剂盒组成 | MP101-01 |
|------------------------------------|----------|
| miRNA RT Enzyme Mix | 50μL |
| 2× miRNA RT Reaction Mix | 250μL |
| Reverse primer(10μM) | 200μL |
| 2× miRNA qPCR Mix(With Sybr Green) | 5mL |
| ROX Reference Dye | 100μL |
| RNase free Water | 1mL |

储存温度: -20°C 保存, 保质期 12 个月。

制品说明:

1. 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。
2. 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× 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(100×)参比染料(货号: FP307), 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× 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20μL(最后加入miRNA RT Enzyme Mix)。

| Components | Volume | Final Concentration |
|----------------------------------|-------------|---------------------|
| Total RNA* | × μL | Up to 2μg |
| 2× miRNA RT Reaction Mix | 10μL | 1× |
| miRNA RT Enzyme Mix | 2μL (见注意事项) | - |
| RNase free Water to final volume | 20μL | - |

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 1.8μL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8μL。

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。

操作步骤:

1. 在室温融化2× miRNA qPCR Mix和Reverse primer(10μM)。

- 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。

- 按照下表组分冰上进行反应液的配制：

| Components | Volume | | Final Concentration |
|-------------------------------------|--------|-------|---------------------|
| 2× miRNA qPCR Mix (With Sybr Green) | 25μL | 10μL | 1× |
| Forward primer(10μM) | 1μL | 0.4μL | 0.2μM |
| Reverse primer(10μM) | 1μL | 0.4μL | 0.2μM |
| miRNA 第一链cDNA | × μL | × μL | — |
| ddH ₂ O to final volume | 50μL | 20μL | |

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

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

注：提高特异性可选择两步法。提高扩增效率可选择三步法。

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× 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，配套爱普科学的ROX Reference Dye(100×)参比染料(货号：FP307)。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 本制品仅供科研使用，严禁用于临床和诊断等用途。



扫码关注我們