SynB™ miRNA Poly(A) qRT-PCR SYBR Kit

货号：T427S/L

【产品内容】

组　分	T427S	T427L
Poly(A) Polymerase	20 μL	60 μL
5×Poly(A) Polymerase Buffer	40 μL	120 μL
PreScript II Enzyme Mix	40 μL	120 μL
5×PreScript II RT Buffer	80 μL	240 μL
Universal RTase Primer	45 μL	130 μL
2×FQ miRNA SYBR qPCR ProMix	1 mL×2 支	1 mL×6 支
mRQ Universal Reverse Primer	105 μL	310 μL

【储存条件】

-20℃保存。

本产品仅供科研使用

【产品概述】

MicroRNA (miRNA)是一类长度为19-23 nt 的内源性非编码单链小分子 RNA，是一种重要的基因表达调控因子。本试剂盒采用在 miRNA 3'末端加多聚 A 尾 Poly(A)，再使用 Oligo(dT)-universal tag 通用逆转录引物进行逆转录反应，生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链，最后采用 miRNA 的特异性正向引物和通用反向引物进行特异性的 miRNA qPCR 检测。该试剂盒能够从单一样品中快速、准确地定量检测 miRNA，具有反应特异性好，灵敏度高，检测范围宽广等优点。

【使用前注意事项】

1. 产品请于冰上放置使用，实验结束后请将产品于-20℃以下小心保存，以免引物降解或酶失活。
2. 操作时应预防 RNase 污染。注意经常更换新手套，因为皮肤经常带有细菌，可能导致 RNase 污染；使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染；配制溶液应使用无 RNase 的水。
3. 自行设计的正向引物可能可以搭配其它品牌加尾法试剂盒使用，效果未知且不能保证； 逆转录引物和反向引物需搭配使用，无法各自搭配其它供应商引物。

【操作方法】

一、 miRNA 3' 末端进行加 Poly (A)处理

1. 室温融化 5× Poly(A) Polymerase Buffer，使用时上下颠倒轻轻均匀混合 5× Poly(A) Polymerase Buffer 和 Poly(A) Polymerase，轻微离心后置于冰上，并按照下表配制比例在冰上配制所需的反应体系：

Total RNA	1 μg
5× Poly(A) Polymerase Buffer	2 μL
Poly(A) Polymerase	1 μL
RNase-free ddH_2O	补充至10 μL

注：RNA 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；10 μL 反应体系建议不超过 2 μg 的 Total RNA。

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后 37℃反应 60 min。所得所得的反应液可以直接进行下游实验，也可以放置-20℃短暂保存。如需长期保存建议存放于-80℃。

二、Poly (A)修饰的 miRNA 进行逆转录反应

1. 冰上配制下表所示反应体系：

上一步 Poly(A) 反应液	10 μL
Universal RTase Primer	2 μL
5× PreScript II RT Buffer	4 μL
PreScript II Enzyme Mix	2 μL
RNase-free ddH_2O	2 μL

2. 移液器轻轻混匀上述配制的反应液，短暂离心后 42℃反应 45 min，然后 70℃变性 15 min。合成的 cDNA 反应液用 RNase-free ddH2O 稀释至 100 μL 后，可进行下游荧光定量 PCR 检测。

三、荧光定量 PCR 检测

1. 室温融化 2× FQ miRNA SYBR qPCR ProMix 和 mRQ Universal Reverse Primer。
2. 使用时请将 2× FQ miRNA SYBR qPCR ProMix 上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并轻微离心后使用。
3. 将试剂置于冰上，并按下表配制反应体系：

2× FQ miRNA SYBR qPCR ProMix	10 μL
自备 Forward Primer（10 μM）	0.5 μL
mRQ Universal Reverse Primer（10 μM）	0.5 μL
cDNA 稀释液	5 μL
RNase-free ddH_2O	补充至20 μL

注：本试剂盒不含 ROX 染料。使用 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。

4. 轻轻混匀上述反应体系（避免剧烈涡旋振荡），短暂离心后进行 qPCR 反应：

阶段	温度设计	荧光信号采集	循环数
预变性	95 ℃ 10 min	否	1×
PCR 反应	95 ℃ 10 s	否	40×
	60 ℃ 20 s	否	
	70 ℃ 10 s	是	
熔解曲线生成			

注：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。

【常见问题及解决方案】

1. 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）出现融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（调整延伸时间，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。

2. 无扩增信号是什么原因?

   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。

3. 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) 逆转录引物和反向引物需搭配使用，无法各自搭配其它供应商引物。