

● 常见问题及解决方案

1) 扩增曲线形状异常

- 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统校正后产生，提高模板浓度重复试验。

个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡，由于温度升高后气泡破裂，使仪器检测到的荧光值突然降低所致。处理样本时要注意离心、进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

2) 反应结束无扩增曲线出现

- 反应循环数不够：一般设置循环数为40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两部法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在72℃延伸阶段。
- 确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除引物降解的可能性。
- 模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解：重新制备模板，重复试验。

3) Ct 值出现太晚

- 扩增效率极低：优化反应条件，或者重新设计引物。
- 模板浓度太低：减少稀释度重复试验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解：重新制备模板，重复试验。
- 反应体系中存在 PCR 反应抑制剂：一般为加入模板时带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

技术咨询：

QQ/973107308

Tel/18927539098

Email/enzyvalley@163.com



Stem-loop miRNA qPCR SYBR kit

货号：T436A/B

● 产品包装

组分	T436A	T436B
2× Stem-loop miRNA qPCR SYBR ProMix	1mL	1mL×5
Uni-SL Reverse Primer	50μL	250μL

● 储存条件

收到本产品后，请立即置于-20℃下避光保存。

● 产品概述

本试剂盒采用 SYBR Green I 嵌合荧光法的原理进行 miRNA 荧光定量检测。本试剂盒包含 miRNA 荧光定量检测的所有试剂，包括 2× Stem-loop miRNA qPCR SYBR ProMix 和 Uni-SL Reverse Primer。2× Stem-loop miRNA qPCR SYBR ProMix 是专门为 miRNA 定量检测而研发的新一代预混形式的荧光定量 PCR 检测试剂，其中的 Taq DNA Polymerase 采用的是化学修饰的热启动形式，配合特殊的 Buffer 体系，使反应特异性更好，灵敏度更高，并能在更广的范围内进行准确定量。

注：本试剂盒须与 Stem-loop miRNA cDNA Synthesis kit(T435)配套使用。

● 机型选择指南

ROX Reference Dye/Dye II 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差：

- ❖ 需要使用高浓度 ROX Reference Dye 校正的仪器
Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOnePlus™;
其他需要添加高浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。
- ❖ 需要使用低浓度 ROX Reference Dye 校正的仪器
Applied Biosystems 7500, 7500 Fast, ViiA™7;
Stratagene MX4000™, MX3005P™, MX3000P™;
其他需要添加低浓度 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。
- ❖ 不需要校正的仪器
Bio-Rad 品牌：Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5等;
Roche 品牌：LightCycler 480 System;
Takara 品牌：Thermal Cycler Dice Real Time System 系列;
Eppendorf 品牌：Mastercycler® ep realplex, realplex 2 s;
其他不需要添加 ROX Reference Dye 的荧光定量 PCR 仪。

● 注意事项

- 以下为使用本试剂盒时的注意事项，使用前请**务必**认真阅读：
- 使用前请上下颠倒轻轻混匀，避免产生气泡，经短暂离心后再使用。
 - 操作时尽量减少产品在强光下的暴露时间，长时间曝光后可能会导致荧光信号减弱。
 - 反应液的配制、分装务必使用无污染的枪头、Microtube 等，尽量避免污染。
 - 特别提示：本品属于化学修饰的热启动酶，**95℃预变性满10min** 方能充分释放 DNA 聚合酶活性。

● 操作方法

1. 室温融化 2× Stem-loop miRNA qPCR SYBR ProMix 和 Uni-SL Reverse Primer。
2. 使用时请将 2× Stem-loop miRNA qPCR SYBR 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× Stem-loop miRNA qPCR SYBR ProMix	10 μL
自备 Forward Primer (10 μM)	0.5 μL
Uni-SL Reverse Primer (10 μM)	0.5 μL
cDNA 稀释液	5 μL
RNase-free ddH ₂ O	补充至20 μL

注意：

- ◆ 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。
 - ◆ 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。