

miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒

包装量:

目录编号	包装单位
154901	50次

组成	154901
2 x miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	1.25 ml
Reverse primer(10 μ M)	55 μ l

产品组成、储存: -20 °C 避光保存至少 6 个月,使用前充分融解混匀。2 x miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)短期使用可放在 4 °C,避免反复冻融。Reverse primer(10 μ M)每次用完置-20 °C 保存。

制品说明: miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒采用本试剂盒采用 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 $\times$ miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer。2 $\times$ miRNA qPCR Mix (含 Sybr Green)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 DNA polymerase 采用的是抗体修饰的热启动形式,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: 该试剂盒须与 miRNA 反转录试剂盒 (154801) 配套使用。

需自备的试剂:

1. 分子生物学实验级别的水(无核酸酶)
2. 待检测miRNA对应的qPCR上游引物(Forward primer)

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. 试剂盒中提供的下游引物的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;或者5' 端和3' 端同时修饰。
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 (10倍或者100倍)。
3. 本品中含有荧光染料Sybr Green I,保存本品或配制PCR反应液时应避免强光照射。
4. 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 1538 Rox Reference Dye。

操作步骤：

- 1. 在室温融化2 x miRNA qPCR Mix和Reverse primer（10μM）。
- 2. 使用时请将2 x miRNA qPCR Mix上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并经轻微离心后使用。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	Volumn		Final Concentration
2 x miRNA qPCR Mix(With 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	

PCR 循环（三步法）

94℃ 2-3 min

94℃ 10-20 sec

55-65℃ 10-20 sec

72℃ 20-60 sec

Dissociation Stage

35-45 cycles

PCR 循环（二步法）

94℃ 2-3 min

94℃ 15-20 sec

60℃ 40 sec

Dissociation Stage

35-45 cycles

注： 提高特异性选择两步法。提高扩增效率选择三步法。