



## miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒

货号: MR0201

储存温度: -20° C, 避光保存至少 6 个月, 使用前充分混匀

### 产品组分

组成	125T
2x miRNA qPCR Mix(with SYBR Green)	1.25ml
Reverse primer(10uM)	55ul

### 制品说明

miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒采用 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×miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer。2×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 第一链合成试剂盒 (MF0201) 配套使用。

### 需自备试剂:

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通原则
2. 以成熟的 miRNA 序列为基础, 将 U 替代为 T,
3. 试剂盒中提供的下游引物的 Tm 值为 65° C
4. 若按照原则 2 中的方式直接设计的引物其 Tm 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' 端加 1 个或者几个 A 碱基; 或者在 5' 端和 3' 端同时修饰;
5. 若按照原则 2 中的方式直接设计的引物其 Tm 值过高, 可以在引物 5' 端或 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 体积的 1/10
2. 对于特殊的检测体系, 高含量的 cDNA 模板易导致非特异性扩增, 根据所检测的 miRNA 的丰度适当的稀释 cDNA(10 倍或 100 倍)
3. 本品种含有荧光染料 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, 客户可根据 qPCR 仪器指导决定是否加 ROX, 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。

### 操作步骤



1. 在室温融化 2x miRNA qPCR Mix(with SYBR Green)和 Reverse primer(10uM)。

2. 使用时请将 2x miRNA qPCR Mix 上下颠倒轻轻均匀混合，避免气泡，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（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

试剂	使用量		终浓度
Taq SYBR® Green qPCR Premix	25ul	10ul	1×
Forward primer (10uM)	1ul	0.4ul	0.2uM
Reverse primer(10uM)	1ul	0.4ul	0.2uM
miRNA 第一链 cDNA	X ul	X ul	--
Nuclease-Free Water	To 50ul	To 20ul	

#### PCR 循环（三步法）

步骤	温度	时间	
预变性	94°C	2-3min	
变性	94°C	10-20 sec	35-45 个循环
退火	55~65°C	10-20 sec	
延伸	72°C	20-60 sec	
熔解曲线	使用仪器默认采集程序		

#### PCR 循环（两步法）

步骤	温度	时间	
预变性	94°C	2-3min	
变性	94°C	15-20 sec	35-45 个循环
退火&延伸	60°C	40 sec	
熔解曲线	使用仪器默认采集程序		

注：提高特异性选择两步法，提高扩增效率选择三步法。

