

miRNA Real-Time PCR Assay kit



北京艾德莱生物科技有限公司
Aidlab Biotechnologies Co., Ltd

地址：北京市海淀区上地紫成创业园 C126--130

电话：010-82796972/82795296 (Fax)

网址：www.aidlab.cn 邮箱：info@aidlab.cn

使用说明书

包装量：

目录编号	包装单位
PC4901	125次×20 μl

组成	PC4901
2 × miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	1.25 ml
Reverse primer(10μM)	55 μl

产品组成、储存： -20°C 避光保存至少 12 个月，使用前充分融解混匀。2 × miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)短期使用可放在 4°C，避免反复冻融。Reverse primer(10μM)每次用置-20°C 保存。

制品说明： 增强型 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 × 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： 该试剂盒须与增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (PC4801) 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 Tm 值为 65°C，设计上游引物的 Tm 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 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' 端添加一个或几个 A 碱基；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 Tm 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 (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。
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 × 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 PC38 Rox Reference Dye。

操作步骤:

1. 在室温融化2 × miRNA qPCR Mix和Reverse primer (10μM)。
2. 使用时请将2 × 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	Volume		Final Concentration
2 × 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)

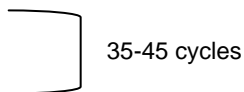
94°C 2-3 min

94°C 10-20 sec

60°C 10-20 sec

72°C 20 sec

Dissociation Stage



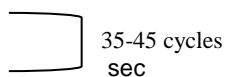
PCR 循环 (二步法)

94°C 2-3 min

94°C 10 sec

60°C 30-34

Dissociation Stage



注: 提高特异性选择两步法。提高扩增效率选择三步法。