

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 | 50次 |

| 组成 | PC4901 |
|-------------------------------------|------------|
| 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C，避免反复冻融。Reverse primer(10 μ M)每次用完置-20 $^{\circ}$ 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 $^{\circledR}$ 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 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 $^{\circ}$ C，设计上游引物的Tm 值要尽量保证在65 $^{\circ}$ 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 (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PC38 Rox Reference Dye。

操作步骤:

1. 在室温融化2 x miRNA qPCR Mix和Reverse primer (10 μ M)。
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 μ l | 10 μ l | 1x |
| Forward primer(10 μ M) | 1 μ l | 0.4 μ l | 0.2 μ M |
| Reverse primer(10 μ M) | 1 μ l | 0.4 μ l | 0.2 μ M |
| miRNA第一链cDNA | x μ l | x μ l | — |
| ddH ₂ O to final volume | 50 μ l | 20 μ l | |

PCR 循环 (三步法)

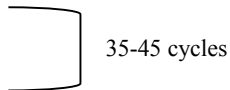
94°C 2-3 min

94°C 10-20 sec

55-65°C 10-20 sec

72°C 20-60 sec

Dissociation Stage



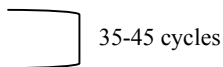
PCR 循环 (二步法)

94°C 2-3 min

94°C 15-20 sec

60°C 40 sec

Dissociation Stage



注: 提高特异性选择两步法。提高扩增效率选择三步法。