

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

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(10 μM)	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)每次用完置-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值不需要完全相同。
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. 本制品已加入特殊的通用ROX参比染料，具有高通用性，可用于各种仪器。无论是需要添加ROX的仪器（如ABI 的各种需要高ROX或者低ROX机型），还是不需要添加ROX的仪器（如Roche Light Cycler、Bio-Rad CFX96等机型），均适用于本制品。

操作步骤:

1. 在室温融化2×miRNA qPCR Mix和Reverse primer (10 μM)。
2. 使用时请将2×miRNA qPCR Mix上下颠倒轻轻均匀混合, 避免起泡太多, 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	1×
Forward primer(10 μM)	1 μl	0.4 μl	0.2 μM
Reverse primer(10 μM)	1 μl	0.4 μl	0.2 μM
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



35-45 cycles

Dissociation Stage

PCR 循环 (二步法)

94°C 2-3 min

94°C 10 sec

60°C 30-34 sec



35-45 cycles

Dissociation Stage

注: 首选两步法, 可提高特异性好。提高扩增效率可选择三步法。