

miRNA qPCR Assay Kit

项目号: M665794

储存条件: -20℃。

产品内容:

Component	M665794
	125 rxns
2×miRNA qPCR Mixture (ROX)	2×750 μl
Reverse Primer , 10 μM	60 μl
ddH ₂ O	1.5 ml

产品简介

本试剂盒采用 SYBR Green I 嵌合荧光染料法的原理来进行 miRNA 荧光定量 PCR 检测。试剂盒包括检测所需的 2×miRNA qPCR Mixture 和 Reverse Primer。

2×miRNA qPCR Mixture 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, 所含的荧光染料 SYBR Green I 可以与所有的双链 DNA 结合, 使该产品可用于不同靶序列的检测而不需合成特异性标记探针。其中的 GoldStarTaq DNA polymerase 是经化学修饰的高效热启动酶, 配合独特的缓冲体系, 使反应特异性更好, 灵敏度更高, 并能在更广的范围内对 miRNA 进行准确定量。2×miRNA qPCR Mixture 含有 ROX 染料, 适用于需要 ROX 作为校正染料的荧光定量 PCR 仪。

备注: 本试剂盒须与 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒配套使用。

自备实验材料: 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 63.6℃, 设计上游引物的 T_m 值要尽量保证在 63.6℃ 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. 试剂使用前请上下颠倒轻轻混匀, 尽量避免起泡, 并经短暂离心后使用。
2. miRNA 第一链 cDNA 的加入量不要超过 Real time PCR 体积 10%。
3. 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 miRNA 的丰度适当的稀释 cDNA (稀释 10 倍或者 100 倍)。

4. 本产品中的 2×miRNA qPCR Mixture 中含有 SYBR Green I 和 ROX 染料, 保存本产品 或 配制 PCR 反应液时应避免强光照射。

5. 避免反复冻融本品, 反复冻融可能使产品性能下降, 本产品长期保存可置于-20℃。如果在短期内需要频繁使用, 2×miRNA qPCR Mixture 可于 2-8℃ 保存。而 Reverse primer 仍需置于-20℃ 保存。

操作步骤:

1. 室温融化 2×miRNA qPCR Mixture 和 Reverse primer (10 μM)。

2. 使用时请将 2×miRNA qPCR Mixture 上下颠倒轻轻均匀混合, 避免起泡, 并经短暂离心后使用。如果试剂没有混匀, 其反应性能会有所下降。

3. 将试剂置于冰上, 并按下表配制反应体系:

试剂	体积	终浓度
2×miRNA qPCR Mixture (ROX)	10 μl	1×
Forward primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
Reverse primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
miRNA 第一链 cDNA	X μl	—
ddH ₂ O	up to 20 μl	—

4. 反应程序设置如下:

注意! 本产品预变性反应必须在 95℃ 10 分钟下完成!

步骤	温度	时间	
预变性	95℃	10 min ¹⁾	
变性	95℃	15 s	} 40-45 个循环
退火/延伸	60℃	1 min	
溶解曲线分析	根据PCR仪要求设定		

注意:

1) 本产品所采用的热启动酶须在预变性 95 °C、10 min 条件下实现酶的活化。

2) 退火温度请以 60-64℃ 作为设定范围的参考, 发生非特异性反应时, 可提高退火温度。