



miRNA qPCR Assay Kit

目录号：CW2142S (125 rxns)

保存条件：-20℃

产品内容

Component	CW2142S
	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GoldStar Taq 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（CW2141）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	} 40-45个循环
预变性	95℃	10 min ¹⁾	
变性	95℃	15 s	
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℃、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。

本产品仅供科研使用，请勿用于临床诊断及其它用途