

版本号: FP160303

miRcute miRNA qPCR Detection Kit (SYBR Green)

miRcute miRNA荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green)

目录号: FP401

产品内容

产品组成	FP401-01 (20 μ l \times 125 rxn)	FP401-02 (20 μ l \times 500 rxn)
2 \times miRcute miRNA Premix (with SYBR & ROX)	1.35 ml	4 \times 1.35 ml
Reverse Primer (10 μ M)	55 μ l	220 μ l
50 \times ROX Reference Dye	250 μ l	1 ml
RNase-Free ddH ₂ O	2 \times 1 ml	5 \times 1 ml

运输条件

干冰运输

储存条件

-20 $^{\circ}$ C 避光保存。本制品使用后, 2 \times miRcute miRNA Premix (with SYBR&ROX) 请置于4 $^{\circ}$ C 避光保存, 可存放6个月; Reverse Primer (10 μ M) 仍置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

产品简介

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× miRcute miRNA Premix、50× ROX Reference Dye和Reverse Primer。

2× miRcute miRNA Premix (with SYBR&ROX) 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miRcute miRNA cDNA 第一链合成试剂盒（KR201/KR211）配套使用

注意事项 请务必在使用本试剂盒之前阅读此注意事项。

使用产品前请认真阅读

1. 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。
2. 反应液的配制和分装中，请一定使用新的（无污染的）枪头等耗材，尽量避免污染。

需自备的试剂

PCR上游引物（Forward Primer）（可选购TIANGEN CD201、CD202系列产品）

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，这是最基础的设计方法。
 3. 试剂盒中提供的下游引物的T_m值为65℃，设计上游引物的T_m值要尽量保证在65℃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（只可加A）；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。
-

操作步骤

1. 室温融化2× miRcute miRNA Premix和Reverse Primer。
2. 使用时请将2× miRcute miRNA Premix上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并经过离心后使用。

注：如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降，且不要使用振荡器混匀。

3. 将试剂置于冰上，并按表a配制反应体系：

注：使用ABI 公司：PRISM7000/7300/7700/7900HT，Step one/Step one plus PCR System荧光定量仪器需按照表b进行加样。

表a

组成成分	50 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2× miRcute miRNA Premix (with SYBR&ROX)	25 μ l	10 μ l	1×
Forward Primer (自备)	-	-	200 nM
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ l	200 nM
miRNA第一链 cDNA	-	-	-
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μ l	至20 μ l	-

表b

组成成分	50 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2× miRcute miRNA Premix (with SYBR&ROX)	25 μ l	10 μ l	1×
Forward Primer (自备)	-	-	200 nM
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ l	200 nM
miRNA第一链 cDNA	-	-	-
50× ROX Reference Dye	5 μ l	2 μ l	5×
RNase-Free ddH ₂ O	至50 μ l	至20 μ l	-

注：miRNA 第一链cDNA的加入量不要超过Real time PCR体积1/10。

高浓度cDNA易导致非特异扩增，可对cDNA适当稀释（10倍或者100倍）。

适用的Real Time PCR扩增仪

ABI PRISM 7000/7700/7900HT, 7300/7500 Real-Time PCR System, 7500 Fast Real-Time PCR System, Step one/Step one plus PCR System (Applied Biosystems)

OPTICON™ / CFX96 (BIORAD)

Light Cycler480 (Roche)

Smart Cycler® System (Cepheid)

Mx3000P/Mx3005P (Stratagene)

Line-Gene (Bioer, 杭州博日)

其它各种Real Time PCR扩增仪

PCR反应程序设置

2 × miRcute miRNA Premix (with SYBR&ROX)中含有抗体介导的DNA Polymerase, 该酶与其他热启动Taq酶不同之处是需要很短的热激活处理时间, 缩短了整个PCR所需时间。

循环	温度	时间	内容
1 ×	94°C	2 min	起始模板变性
40-45 ×	94°C	20 sec	PCR循环中模板变性
	60°C	34 sec	退火, 延伸
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)			
