

版本号: FP230630

miRcute Plus miRNA qPCR Kit (SYBR Green)

miRcute 增强型 miRNA 荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green)

目录号: FP411

产品内容

产品组成	FP411-01 (20 μ l \times 125 rxn)	FP411-02 (20 μ l \times 500 rxn)
2 \times miRcute 增强型 miRNA 定量预混试剂 (含 SYBR&ROX)	1.25 ml	4 \times 1.25 ml
2 \times miRcute Plus miRNA PreMix (SYBR&ROX)		
反向引物 (10 μ M) Reverse Primer (10 μ M)	55 μ l	220 μ l
50 \times ROX 对照染料 50 \times ROX Reference Dye	250 μ l	1 ml
无 RNA 酶双蒸水 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

收到本产品后, 请立即置于-30~-15 $^{\circ}$ C 下避光保存。从-30~-15 $^{\circ}$ C 中取出使用时, 将冻存的各个组分融解, 然后轻轻颠倒混匀, 待溶液完全均一后再行使用。如解冻后的 2 \times miRcute Plus miRNA PreMix 没有使用, 须彻底混匀后再重新冷冻 (在解冻过程中盐会出现分层现象, 未混匀进行冷冻, 盐晶体的析出将会对酶造成损害)。

本产品于-30~-15 $^{\circ}$ C 下可保存1年。

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 Plus miRNA PreMix、50× ROX Reference Dye和Reverse Primer。

2× miRcute Plus miRNA PreMix (SYBR&ROX) 是专门为miRNA定量检测而研发的一代预混形式的荧光定量PCR检测试剂，其中的DNA Polymerase采用的是化学修饰的热启动形式，配合特殊的Buffer体系，使反应特异性更好，灵敏度更高，并在更广的范围内进行准确定量。

注：本试剂盒须与miRcute Plus miRNA cDNA第一链合成试剂盒 (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. 本产品中含有荧光染料SYBR Green I，保存本品或配制PCR反应液过程中应避免强光照射。
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

1. 分子生物学实验级别的水(无核酸酶)；
2. PCR上游引物(Forward Primer)(可选购TIANGEN CD201、CD202系列产品)。

Forward Primer设计原则

1. 遵循引物设计的普遍原则。
 2. 以成熟的miRNA序列为基础，将U替换成T，这是基础的设计方法。
 3. 试剂盒中提供的下游引物的Tm值为65℃，设计上游引物的Tm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Tm值过低，可以在引物的5'端添加几个碱基(建议为G或C碱基)来调整Tm值，但应避免引入二级结构；
 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。
-

操作步骤

1. 室温融化2× miRcute Plus miRNA PreMix、50× ROX Reference Dye和Reverse Primer。
2. 使用时请将2× miRcute Plus miRNA PreMix上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并经轻微离心后使用。

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 Plus miRNA PreMix (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	-	-	-
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 Plus miRNA PreMix (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	4 μ l	1.6 μ l	5×
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体积的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)。

表b中，PreMix中的ROX和额外添加的ROX混合后，终浓度为5×。



TIANGEN 官方微信，专业服务助力科研：

- 可视化操作指南
- 技术公开课合辑
- 全线产品查询
- 在线专家客服
- 微信直播课堂
- 最新优惠活动

PCR反应程序设置

1、一般情况下，可采用如下述程序进行定量PCR反应：

循环	温度	时间	内容
1×	95℃	15 min	起始模板变性
40-45×	94℃	20 sec	PCR循环中模板变性
	60℃	34 sec	退火，延伸
熔解曲线分析（Melting/Dissociation Curve Stage）			

2、如需提高低丰度miRNA的检测特异性和检出率可采用下述程序进行定量PCR反应：

循环	温度	时间	内容
1×	95℃	15 min	起始模板变性
5×	94℃	20 sec	富集低丰度目标miRNA， 无需收集荧光信号
	63~65℃	30 sec	
	72℃	34 sec	
40~45×	94℃	20 sec	PCR循环中模板变性
	60℃	34 sec	退火，延伸
熔解曲线分析（Melting/Dissociation Curve Stage）			

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