

M5 HiPer Stem-loop miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 HiPer Stem-loop miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒	1ml	MF879-T
M5 HiPer Stem-loop miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒	5x1ml	MF879-01

本试剂盒须与 M5 Stem-loop miRNA cDNA Synthesis Kit (MF878-01) 配套使用。

【储存条件】 长期保存，请置于-20°C。

【产品简介】

本试剂盒采用 SYBR® Green 嵌合荧光法的原理进行 miRNA 荧光定量检测。试剂盒中的 2xmiRNA SYBR QPCR Mixture 是针对 miRNA 定量检测而优化的预混式的荧光定量 PCR 检测试剂，可保证 miRNA 检测的特异性更好，灵敏度更高。

Uni-R Primer (10μM)是与 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒 (PolyA 尾法) 的 miRNA 逆转录产物匹配的通用反向引物，研究者只需要设计出待检测 miRNA 的特异正向引物即可 (具体设计原则见操作步骤)。

若是用茎环法进行的 miRNA cDNA 第一链合成，与 Uni-R Primer (10μM) 相匹配的通用茎环结构序列为：5'CTCAACTGGTGTCTGGAGCGTGTCTGCCAGTTGAGC3'。若使用其他茎环结构序列，您需根据所使用的茎环序列 设计合适的反向引物，不能使用试剂盒提供的 Uni-R Primer。

2xmiRNA SYBR QPCR Mixture 不含 ROX，适用于所有无需 ROX 校正的 QPCR 仪。若您使用的 QPCR 仪需要 ROX 校正时，请根据仪器型号预先加入 ROX，然后再配制 反应体系。一般可参见如下说明。

ROX 使用说明：

1. 需要 Low ROX 校正的仪器：向每 ml 的 2xSYBR QPCR Mixture 加入 2ul ROX reference dye，即按 1:500 预混 ROX。
2. 需要 High ROX 校正的仪器：向每 ml 的 2xSYBR QPCR Mixture 加入 20ul ROX reference dye，即按 1: 50 预混 ROX。

ROX 适配仪器型号说明：

1. 不需要 ROX 校正的仪器： Roche LightCycler 480, Roche LightCycler 96, Bio-rad iCycler iQ, iQ5, CFX96 等。
2. 需要 Low ROX 校正的仪器： ABI Prism7500/7500 Fast, QuantStudio® 3 System, QuantStudio® 5 System, QuantStudio® 6Flex System, QuantStudio® 7 Flex System, ViiA 7 system, Stratagene Mx3000/Mx3005P, Corbett Rotor Gene 3000 等。
3. 需要 High ROX 校正的仪器： ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One/Step One Plus 等。

【产品组份】

2xmiRNA SYBR QPCR Mixture	5x1 ml
Uni-R Primer (10 μM)	200 μl
ROX reference dye (50 μM)	150 μl

【自备实验材料】： qPCR 上游引物 (Forward primer)。

【Forward Primer 设计原则】

- 以成熟的 miRNA 序列为基础，将 U 替换成 T。
- 试剂盒中提供的下游引物的 Tm 值为 62°C，设计上游引物的 Tm 值应尽量在 58-65°C 范围。
- 若设计的引物其 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)来调整 Tm 值；若引物其 Tm 值过高，可以在引物的 5' 或 3' 端去掉几个碱基。但要避免引入二级结构。

【操作步骤】

1. 室温融化试剂盒中的所有试剂，上下颠倒轻轻混匀，尽量避免起泡，并短暂离心后使用。于 8 孔板或 96 孔板中按照下表配制反应体系至总体积为 20 μl：

试剂	20 μl 体系*	终浓度
2×miRNA SYBR QPCR Mixture	10 μl	1×
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	0.2 μM
Uni-R Primer (10 μM)**	0.4 μl	0.2 μM
适当稀释后的逆转录产物	4 μl***	--
ddH ₂ O	补足 20 μl	--

注意：

* 可以根据实际实验需求按比例扩大或者缩小反应体系，推荐 反应体系为 15-50 μl。

** 适用于 PolyA 尾法逆转录。茎环法逆转录时请自行选择与所用茎环 序列匹配的反向引物。

*** 模板加液量建议 4ul，可以保证移液的准确性，减少误差。逆转录产 物建议稀释 10-1000 倍后使用。

2. 用移液枪混匀反应液，若加样时有液体挂于管内侧壁可将其进 行短暂离心，短暂震荡后再离心数秒即可。反应液混匀后转至 QPCR 仪中进行下述条件反应（建议一般采用两步法 PCR 程序。 若需要调整退火温度时，可用三步法 PCR 程序扩增）：

两步法程序：

步骤	温度	时间	} 35-45 cycles
预变形	95°C	10 min	
变形	95°C	10 s	
退火/延伸	60°C	30 s ¹⁾	
溶解曲线分析 ²⁾	10 s		

注意：1) 200bp 以内 30s 退火/延伸时间足够。miRNA 的 cDNA 扩增产 物更短，若仪器允许，可缩短此时间。

2) 具体实验时请根据自己所使用的荧光定量 PCR 仪设定融解曲线分析 程序。

三步法程序：

步骤	温度	时间	} 35-45 cycles
预变形	95°C	10 min	
变形	95°C	10 s	
退火	55-64°C	10 s	
延伸	72°C	30 s ¹⁾	
溶解曲线分析 ²⁾			

注意：1) 200bp 以内 30s 延伸时间足够。miRNA 的 cDNA 扩 增产 物更短，若仪器允许，可缩短此时间。

2) 具体实验时请根据自己所使用的荧光定量 PCR 仪设定融解曲 线分析程序。

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：

温度	时间	} 5 cycles 转到“设置”以激活 Windows。
95°C	15 min	
95°C	10 s	
62-65°C	15 s	
72°C	20 s	

【备注】

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。