

# 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 <sub>2</sub> 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 <sup>1)</sup> |                |
| 溶解曲线分析 <sup>2)</sup> | 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 <sup>1)</sup> |                |
| 溶解曲线分析 <sup>2)</sup> |         |                    |                |

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<br>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。