

M5 miRNA qPCR Assay Kit

miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒（升级版）

使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 miRNA qPCR Assay Kit	125T	MF307-01（升级版）

本试剂盒须与 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒（MF283-01 升级版）配套使用。

【储存条件】 长期保存，请置于-20°C。

【产品简介】

miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒采用本试剂盒采用 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 2xmiRNA qPCR Mix 和 Reverse primer。2xmiRNA qPCR Mix（含 Sybr Green）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。

【产品组份】

2x M5 miRNA qPCR Mixture
Reverse Primer, 10 μM

MF307-01（升级版）
1250 μl
55 μl

【自备实验材料】： qPCR 上游引物（Forward primer）和分子生物学实验级别的水（无核酸酶）。

【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 65°C，设计上游引物的 T_m 值要尽量保证在 65°C 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'端同时添加。
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. miRNA 第一链 cDNA 的加入量不要超过 real time PCR 体积 1/10。
2. 对于特殊的检测体系中，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（5-10 倍或者 100 倍）。使用富集的 miRNA 做起始模板，可降低非特异扩增，提升敏感度。
3. 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。
4. 2 x miRNA qPCR Mix **不含参比染料 ROX**，客户并根据 qPCR 仪器技术指导决定是否需要加 ROX 参比染料，用于消除信号本底以及校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，配套 ROX 产品货号为 MF625 Rox Reference Dye。

【操作步骤】

1. 在室温融化2 x M5 miRNA qPCR Mix和Reverse primer (10 μ M)。
2. 使用时请将2 x M5miRNA qPCR Mix上下颠倒轻轻均匀混合，避免起泡，并经轻微离心后使用。如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降。

注意：请不要使用振荡器混匀！

3. 按照下表组分冰上进行反应液的配制：

Components	Volume	Final Concentration
2 x M5 miRNA qPCR Mix	10 μ l	1x
Forward primer(10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse primer(10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
miRNA第一链cDNA	x μ l	—
ddH ₂ O to final volume	20 μ l	

PCR 循环（三步法）

94°C 2-3 min

94°C 10-20 sec

60°C 10-20 sec

72°C 20 sec

Dissociation Stage

35-45 cycles

**PCR 循环（二步法）**

94°C 2-3 min

94°C 10 sec

60°C 30-34

Dissociation Stage

35-45 cycles
sec

注：提高特异性选择两步法。提高扩增效率选择三步法。

【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。