

版本号: FP160303

# miRcute Plus miRNA qPCR Detection 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 $\mu$ l $\times$ 125 rxn)	FP411-02 (20 $\mu$ l $\times$ 500 rxn)
2 $\times$ miRcute 增强型 miRNA 定量预混试剂 (含 SYBR&ROX)		
2 $\times$ miRcute Plus miRNA Premix (with SYBR&ROX)	1.25 ml	4 $\times$ 1.25 ml
反向引物(10 $\mu$ M) Reverse Primer(10 $\mu$ M)	55 $\mu$ l	220 $\mu$ l
50 $\times$ ROX 对照染料 50 $\times$ ROX Reference Dye	250 $\mu$ l	1 ml
无 RNA 酶双蒸水 RNase-Free ddH <sub>2</sub> 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-20  $^{\circ}$ C 下避光保存。从-20  $^{\circ}$ 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-20  $^{\circ}$ 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 (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(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<sub>m</sub>值为65℃，设计上游引物的T<sub>m</sub>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<sub>m</sub>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T<sub>m</sub>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T<sub>m</sub>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 $\mu$ l 体系	20 $\mu$ l 体系	终浓度
2× miRcute Plus miRNA Premix(with SYBR&ROX)	25 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1×
Forward Primer(自备)	-	-	200 nM
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	200 nM
miRNA第一链 cDNA	-	-	-
ddH <sub>2</sub> O	至50 $\mu$ l	至20 $\mu$ l	-

表b

组成成分	50 $\mu$ l 体系	20 $\mu$ l 体系	终浓度
2× miRcute Plus miRNA Premix (with SYBR&ROX)	25 $\mu$ l	10 $\mu$ l	1×
Forward Primer(自备)	-	-	200 nM
Reverse Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	0.4 $\mu$ l	200 nM
miRNA第一链 cDNA	-	-	-
50× ROX Reference Dye	5 $\mu$ l	2 $\mu$ l	5×
ddH <sub>2</sub> O	至50 $\mu$ l	至20 $\mu$ 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)。

## 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°C	15 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
溶解曲线分析 (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°C	15 min	起始模板变性
5 ×	94°C	20 sec	富集低丰度目标miRNA, 无需收集荧光信号
	63~65°C	30 sec	
	72°C	34 sec	
40~45 ×	94°C	20 sec	PCR循环中模板变性
	60°C	34 sec	退火, 延伸
溶解曲线分析 (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