



## 产品描述

ProQ™ miRNA Real Time PCR Assay kit 是专为高特异性、高灵敏度 miRNA 荧光定量检测而设计。本试剂盒包含 miRNA 荧光定量检测的所有试剂, 包括 2×miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer。2×miRNA qPCR Mix ( with 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。该试剂盒须与 ProQ™ miRNA 荧光定量检测试剂盒 ( PQ611 ) 配套使用。

## 产品应用

用于 miRNA 荧光定量 PCR 检测。

## 产品组成

组份	PQ711-01 50rxn(20μ l/rxn)	PQ711-02 100rxn(20μ l/rxn)
2 x miRNA qPCR Mix (with SYBR Green)	1.25 ml	
Reverse primer (10 μM)	55 μl	PQ711-01 x 2

## 产品储存

-20°C避光储存。使用前充分溶解混匀, 2 x miRNA qPCR Mix (with SYBR Green) 短期使用可放在 4 °C, 避免反复冻融。Reverse primer(10μ M) 每次用完置-20 °C保存。

## 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 ( 10 倍或者 100 倍 )。
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 PQ914 可另外购买。
5. 分子生物学实验级别的水 ( 无核酸酶 ) 和待检测 miRNA 对应的 qPCR 上游引物 ( Forward primer ) 需客户自备。

## 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 Tm 值为 65°C, 设计上游引物的 Tm 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 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 ); 也可以在 3' 端添加 1 个或几个 A 碱基; 或者 5' 端和 3' 端同时修饰。
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. 在室温融化 2 x miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer (10 μM)。
2. 使用时请将 2 x miRNA 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: 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(以 25, 50 μl 反应体系为例):

Components	Volume (25 μl)	Volume (50 μl)	Final Concentration
ddH <sub>2</sub> O	to 25 μl	to 50 μl	
miRNA第一链cDNA	x μl	x μl	
Forward Primer (10 μM)	0.5 μl	1 μl	0.2 μM each
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μl	1 μl	0.2 μM each
2 x miRNA qPCR Mix (with SYBR Green)	12.5 μl	25 μl	1×

#### PCR 循环 (二步法):

94°C	2-3 min	}	35-45 cycles
94°C	15-20 sec		
60°C	40 sec		
Dissociation Stage			

#### PCR 循环 (三步法):

94°C	2-3 min	}	35-45 cycles
94°C	10-20 sec		
55-65°C	10-20 sec		
72°C	20-60 sec		
Dissociation Stage			

备注：本制品兼容性强，适用于不同厂家、型号的荧光定量 PCR 仪，绝大多数情况下使用二步法和三步法均可获得良好效果。在实际使用中可以根据机型推荐和具体情况对程序加以微调。一般来说，二步法扩增特异性高，三步法扩增效率高。如果融链曲线较差，可以尝试两步法扩增；若因使用 T<sub>m</sub> 值较低的引物等原因，得不到良好的实验结果时，可尝试加长延伸时间或者进行三步法 PCR 扩增。