

2*MiRNA 荧光定量一步法检测试剂盒

KM402 125次

试剂组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	KM402
2*miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	-20°C	1.25ml
Reverse primer(10 μ M)	-20°C	55ul
RNase free H ₂ O	-20°C	1ml

在-20°C储存 12 个月不影响使用效果, 使用前充分融解混匀, 避免反复冻融。

Reverse primer(10 μ M)每次用完置-20°C 保存。

产品介绍:

增强型 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 2* miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer。2 * miRNA 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。

注意事项:

1. Forward Primer 设计原则:
 - a. 遵循引物设计的最普遍原则。
 - b. 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。
 - c. 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。
 - d. 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' 端添加一个或几个A 碱基; 或者5' 端和3' 端同时添加。

- e. 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。
2. miRNA 第一链 cDNA 的加入量不要超过 real time PCR 体积 1/10。
3. 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。
4. 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。
5. 2*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。

操作步骤:

1. 在室温融化2 * miRNA qPCR Mix和Reverse primer (10 μ M) 。
2. 使用时请将2 * 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

Components	Volume		Final Concentration
2 * miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	25 μ l	10 μ l	1x
Forward primer(10 μ M)	1 μ l	0.4 μ l	0.2 μ M
Reverse primer(10 μ M)	1 μ l	0.4 μ l	0.2 μ M
miRNA第一链cDNA	x μ l	x μ l	—
ddH2O to final volume	50 μ l	20 μ l	

4. PCR 反应扩增程序

扩增程序二步法				扩增程序三步法			
循环步骤	温度	时间	循环数	循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	94°C	2-3min	1	预变性	94°C	2-3min	1
变性	94°C	10sec	40	变性	94°C	10sec	40
退火/延伸	60°C	30-34sec		退火	60°C	10-20sec	
				延伸	72°C	20sec	
溶解曲线阶段	仪器默认设置	1		溶解曲线阶段	仪器默认设置	1	

结果分析: 定量实验至少需要三个生物学重复。反应结束后需要确认扩增曲线及熔解曲线。

1. 扩增曲线: 标准扩增曲线为 S 型。Ct 值落在 20-30 之间时, 定量分析最准确; Ct 值小于 10, 需要将稀释模板后, 重新进行实验; Ct 值介于 30-35 之间时, 需要提高模板浓度, 或者增大反应体系的体积, 以提高扩增效率, 保证结果分析的准确性; Ct 值大于 35 时, 检测结果无法定量分析基因的表达量, 但可用于定性分析。
2. 熔解曲线: 熔解曲线单峰, 表明反应特异性好可以进行定量结果分析; 若熔解曲线出现双峰或者多峰, 则不能进行定量分析。熔解曲线出现双峰, 需要通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳判断非目标峰是引物二聚体还是非特异性扩增。如果是引物二聚体, 建议降低引物浓度, 或者重新设计扩增效率高的引物。如果是非特异性扩增, 请提高退火温度, 或者重新设计更高特异性的引物。