# Enhanced miRNA qPCR Assay Kit

## 使 用 说 明 书

**包 装 量：**

| 目录编号 | 包装单位 |
|---|---|
| **MP102-01** | **125 次*20uL** |

| 产品组成 | MP102-01 |
|---|---|
| 2× miRNA qPCR Mix(With SYBR Green) | 1.25mL |
| Reverse primer(10μM) | 55μL |

**产品储存：** -20℃避光保存，保质期至少 12 个月，使用前充分融解混匀。2× miRNA qPCR Mix(With SYBR Green)短期使用可放在 4℃，避免反复冻融。Reverse primer(10μM)每次用完置-20℃保存。

**制品说明：**

1. 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。
2. 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：**该试剂盒须与miRNA cDNA第一链合成试剂盒(增强型)(货号：MP101-01)配套使用。

**需自备的试剂：**

1. 分子生物学实验级别的水(无核酸酶)
2. 待检测miRNA对应的qPCR上游引物(Forward primer)

**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℃，设计上游引物的Tm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’端同时添加。
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× miRNA qPCR Mix和Reverse primer(10μM)。
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 | Volumn | | Final Concentration |
|---|---|---|---|
| 2× miRNA qPCR Mix(With SYBR Green) | 25μL | 10μL | 1× |
| Forward primer(10μM) | 1μL | 0.4μL | 0.2μM |
| Reverse primer(10μM) | 1μL | 0.4μL | 0.2μM |
| miRNA第一链cDNA | xμL | xμL | __ |
| $ddH_2O$ to final volume | 50μL | 20μL | |

**PCR循环(三步法)：**

94℃：2-3 min

94℃：10-20 sec

60℃：10-20 sec

72℃：20 sec

35-45 cycles

Dissociation Stage

**PCR循环(二步法)：**

94℃：2-3 min

94℃：10 sec

60℃：30-34 sec

35-45 cycles

Dissociation Stage

**注：提高特异性选择两步法。提高扩增效率选择三步法。**

**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× miRNA qPCR Mix不含参比染料ROX，客户须根据qPCR仪器技术指导决定是否需要加入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，配套爱普科学的ROX Reference Dye(100×)参比染料(货号：FP307)。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
6. 本制品仅供科研使用，严禁用于临床和诊断等用途。

==========

扫码关注我们