

Version: AH 3.2 (2021.04.01修订)

2×miRNA SYBR Green qPCR Mix

(By stem-loop)

目录号: AH0501

01/产品组分

序号	组分	AH0501
		125 rxn (20μL/rxn)
1	2×miRNA SYBR qPCR Master Mix*	1.25 mL
2	mQ Primer R (10 μM)	70μL

*本产品使用特殊的ROX Reference Dye，适用于所有qPCR仪器(无ROX校正仪器，低浓度ROX校正仪器，高浓度ROX校正仪器)，无需在不同的仪器上调整ROX的浓度：

Applied Biosystems 5700,7000,7300,7700,7900,7900HT,7900HT Fast, Step One, Step One Plus,7500,7500 Fast,ViiA™7

Stratagene MX4000,MX3005P,MX3000P

Bio-Rad iQ5,Chromo4,iCycler iQ,CFX96,CFX384,Opticon,Opticon 2,MyiQ,MiniOpticon

Eppendorf realplex 2s,Mastercycler ep realplex

Qiagen/Corbett Rotor-Gene Q,Rotor-Gene 3000,Rotor-Gene 6000

Roche LightCycler 2.0,LightCycler 96, LightCycler 480及其他qPCR仪

02/保存条件

本产品所有组分-20℃避光保存。

03/产品概述

本产品是使用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 miRNA 定量反应的专用预混液。由于 miRNA 序列短，且同一家族的 miRNA 序列往往高度相近，故在定量时对特异性要求极高。本品基于化学法热启动的 DNA polymerase，配以优化的 Buffer，能够极大的减少非特异性扩增；同时，特殊的 Rox Reference Dye 使得预混液适用于各种 qPCR 仪器，无需调整 ROX 浓度，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。

04/质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以 HeLa 细胞总 RNA 逆转录产物的稀释液为模板，扩增 6 个基因，每个基因的熔解曲线为单峰，特异性好，扩增曲线在批次间的产品中相近。

05/注意事项

- ◇ 本产品中含有特殊的 ROX Reference Dye，适应于所有 qPCR 仪器，无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度。
- ◇ 建议 PCR 反应液在冰上配制，可以提高扩增特异性，减少背景。
- ◇ 请冰上融化后，轻轻上下颠倒，混合均匀，避免起泡，并瞬时离心后使用。

06/ PCR实验流程（以ABI 7500为例）

以 10 μ L，20 μ L 反应体系为例，其他体系可以按照表格 Final Concentration 所示比例进行调整配制：

1. 配制 PCR 反应液：

Components	Volume (10 μ L)	Volume (20 μ L)	Final Concentration
2 $\times$ miRNA SYBR qPCR Master Mix	5 μ L	10 μ L	1 $\times$
DNA/cDNA ^{*1}	X μ L	X μ L	as required
Specific Primer (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M each
mQ Primer R ^{*2} (10 μ M)	0.2 μ L	0.4 μ L	0.2 μ M each
RNase Free H ₂ O	up to 10 μ L	up to 20 μ L	

*1.mQ Primer R序列为AGTGCAGGGTCCGAGGTATT，与本公司产品AG0502配套使用，当使用不同的茎环序列时，需自行设计合成qPCR逆向引物。

*2.如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

2. qPCR 反应程序

PCR循环（二步法）

94°C: 2-3 min
 94°C: 5-10 sec
 60°C: 34 sec^{*1} } 40 cycles
 Dissociation Stage^{*3}

PCR循环（三步法）

94°C: 2-3 min
 94°C: 10-20 sec
 55-60°C^{*2}: 10-20 sec } 40 cycles
 72°C: 20-30 sec
 Dissociation Stage^{*3}

*1 延伸时间请根据使用的机型所需要的数据采集最短时间限制自行调整：使用ABI 7500时至少34 sec；使用ABI 7700和7900HT时至少30 sec；使用ABI 7000和7300时至少31 sec；使用ABI Step One Plus时至少10 sec。

*2 依据所研究的目的基因引物的 T_m 设置最适退火温度。

*3 使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

07/反应体系优化

反应体系可根据以下原则自行调整：

1. 一般来说反应体系中引物终浓度为 $0.2\ \mu\text{M}$ 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 $0.1\text{-}1\ \mu\text{M}$ 范围内调整引物浓度，引物浓度越高，扩增特异性越差，但扩增效率越高。
2. qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
3. 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 $1/10$ 。
4. 优秀的反应体系应具备以下特征：熔融解曲线单峰、扩增效率接近 100%、CT 值小。如需提高扩增特异性，可适当提高退火温度；如需提高扩增效率，可将两步法程序延长延伸时间或使用三步法程序。

08/实验原理

miRNA 茎环法荧光定量引物设计原则：

- ① 茎环法的 qPCR 的反向引物也是相同的（通用引物 R），为茎环中的一部分，序列为 AGTGCAGGGTCCGAGGTATT。（本试剂盒中提供，与 AG0502 配套使用）
- ② 正向引物则需要根据 miRNA 的序列进行设计。设计方法是：将 miRNA 序列除去 3'端 6 个碱基的剩余部分作为上游引物，如果 T_m 值较低，则在 5'端加 G 或 C 使 T_m 值接近 60°C ，通俗讲就是，保护性碱基（用来调 GC 含量）+miRNA 5'端的 13-16 个碱基。
- ③ U6 是一类 snRNA，它是由 RNA 聚合酶 III 转录，长度为 200 bp 左右，在多种组织细胞中高表达，不涉及 miRNA 的调节途径，所以是很好的内参选择。由于 U6 序列较长，可直接进行扩增，反转录引物就是荧光定量 PCR 扩增的下游引物（**内参基因和目的基因分为两个体系进行反应**）。
- ④ 举例：（以 hsa-mir-3613-5p 为例）

miRNA 序列为：5'-UGUUGUACUUUUUUUUUUGUUC-3'

目的基因茎环引物：5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGA

TACGAC（通用茎环序列）+GAACAA（miRNA 3'的 6 个互补碱基）-3'

内参基因 U6 逆转录引物：5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'

miRNA qPCR 引物：

目的基因引物：

上游引物: 5'-GCGCG (保护性碱基) +TGTTGTACTTTTTTTT (miRNA 5'端 nt) -3'

下游引物: 5'-AGTGCAGGGTCCGAGGTATT-3' (茎环序列的一段互补序列)

内参基因 U6 引物:

上游引物: 5'-GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT-3'

下游引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCA-3' (同 U6 逆转录引物)

09/相关产品

AC0101 SparkZol Reagent

AC1501 SPARKeasy 动物组织细胞 microRNA 快速提取试剂盒

AC1502 SPARKeasy 植物 microRNA 快速提取试剂盒

AC1505 SPARKeasy 血清血浆 microRNA 提取试剂盒

AC1506 SPARKeasy 固定包埋组织 microRNA 快速提取试剂盒

AG0502 SPARKScript II miRNA 1st strand cDNA synthesis kit(By stem-loop)

本产品仅用于科学研究!

Tel: 0531-82387577

Web: <http://www.sparkjade.com>

Support: support@sparkjade.com

