

# Imagene<sup>®</sup>

miRNA Real-Time PCR Assay kit  
miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒



**CODONX**  
RESEARCH & ANSWER MORE

FOR RESEARCH USE ONLY  
NOT INTENDED FOR DIAGNOSTIC PURPOSES

## miRNA Real-Time PCR Assay kit miRNA 荧光定量 PCR 检测试剂盒

目录号: PR156

产品内容:

组成	PR156-01 (50次)	PR156-01 (200次)
2 x miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	1.25 ml	1.25 ml × 4
Reverse primer(10 $\mu$ M)	55 $\mu$ l	55 $\mu$ l × 4

**产品组成、储存:** -20 °C 避光保存至少6个月,使用前充分融解混匀。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(10 $\mu$ M)每次用完置-20 °C保存。

**制品说明:** 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:** 该试剂盒须与miRNA第一链合成试剂盒 (PR155) 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T<sub>m</sub> 值为65°C, 设计上游引物的T<sub>m</sub> 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); 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。

### 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PR111-Rox Reference Dye。

### 操作步骤:

1. 在室温融化2 x miRNA qPCR Mix和Reverse primer（10μM）。
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，并轻轻离心后使用。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 x miRNA qPCR Mix(With Sybr Green)	25 μl	10 μl	1x
Forward primer(10μM)	1 μl	0.4 μl	0.2μM
Reverse primer(10μM)	1 μl	0.4 μl	0.2μM
miRNA第一链cDNA	x μl	x μl	—
ddH <sub>2</sub> O to final volume	50 μl	20 μl	

PCR 循环（三步法）	PCR 循环（二步法）
94°C 2-3 min	94°C 2-3 min
94°C 10-20 sec	94°C 15-20 sec
55-65°C 10-20 sec	60°C 40 sec
72°C 20-60 sec	Dissociation Stage
Dissociation Stage	
} 35-45 cycles	} 35-45 cycles

注：提高特异性选择两步法。提高扩增效率选择三步法。



---

**CodonX(China) Biotechnology Co., Ltd**

Yizhuang Biomedical Park  
Building 6, No.88 6th Kechuang St. Economic-Technological Development Area, Beijing, China  
Tel: 010-56315162 [www.codonx.com](http://www.codonx.com)