

NovoScript® miRNA SYBR qPCR Kit

目录号: E172-QP

01/产品描述:

本产品包含miRNA检测定量扩增试剂,适用于miRNA、Total RNA和small RNAs等包含miRNA样品的定量扩增检测。以miRNA等样品为模板,使用2×miRNA SYBR qPCR SuperMix进行扩增检测。

2×miRNA SYBR qPCR SuperMix采用SYBR Green I嵌合荧光法对miRNA进行荧光定量检测。试剂中预混了热启动DNA聚合酶、精心优化的反应Buffer、dNTPs、SYBR Green I等,进行实验时,PCR反应液的配制十分简单方便。本产品提供两种ROX染料用于校正定量PCR仪孔与孔之间产生的荧光信号误差,适用于不同型号的荧光定量PCR仪。另外试剂盒中提供Universal miRNA primer R检测引物,只需设计对应miRNA的上游引物即可,也可以根据说明书中提供的miRNA特异性引物设计原则来设计引物。

02/产品特点:

- 1) 用新型工艺制备抗体修饰的HotStart Taq DNA聚合酶,无需热启动即可进行PCR反应,大大提高PCR扩增的特异性;
- 2) Novoprotein精心配制的RealTime PCR专用2×SuperMix,具有更高的扩增效率和扩增灵敏度;
- 3) PCR反应所必需试剂集于一管之中,数分钟即可完成反应体系配制;

03/保存温度:

-20℃。

04/产品包装:

产品组成	E172-QP-R100	E172-QP-R200
Universal miRNA primer R (10μM)	50μl	100μl
2×miRNA SYBR qPCR SuperMix	1ml	1ml×2
ROX Reference Dye I (ROX I) *	50μl	100μl
ROX Reference Dye II (ROX II) *	50μl	100μl
RNase Free Water	1ml	1ml×2

*需根据Real Time PCR机器型号选择是否需要校准。

05/注意事项:

- 1) 所有试剂使用前请上下颠倒混匀,尽量避免产生泡沫,并短暂离心后使用。
- 2) 使用过程中应确保所用试剂中无RNase污染。
- 3) 避免反复冻融。
- 4) 反应液配制和添加应在冰上操作。
- 5) 为保证逆转录反应的有效进行,需使用较高质量的RNA模板
- 6) 用ROX I校准的Real Time PCR仪有:
ABI:5700/7000/7300/7700/7900/7900 HT/7900 HT Fast/StepOne/StepOnePlus及其他仪器;
- 7) 用ROX II校准的Real Time PCR仪有:
ABI 7500/7500 Fast/ViiA7/QuantStudio 3,5,6 Flex,7 Flex12k Flex;
Stratagene:MX4000/MX3500P/MX3000P及其他仪器。

仅供科研或生产使用,不可直接应用于人体

近岸蛋白
Novoprotein Scientific Inc.

技术咨询电话: 400-600-0940; (021)5079-8060
官方网站: www.novoprotein.com.cn
邮箱: product@novoprotein.com.cn
地址: 上海市浦东新区张江高科技园区伽利路11号1号楼

8) 不需要用ROX校准的Real Time PCR仪有:

Bio-Rad: CFX96/CFX 384/iCycler iQ/ iQ5/MyiQ/MiniOpticon/Opticon/Opticon2/Chromo4;

Eppendorf: MasterCycler ep realplex/realplex 2s;

Cepheid: SmartCycler;

Illumina: Eco qPCR;

Roche Applied Science: LightCycler480/LightCycler2.0/Lightcycler96;

Thermo Scientific: PikoReal Cycler;

Qiagen: Corbett Rotor-Gene Q/Rotor-Gene 3000/ Rotor-Gene 6000及其他仪器。

06/操作流程:

该试剂盒包含10μM的Universal miRNA primer R, 也可根据文后的miRNA特异性上、下游引物设计原则设计miRNA特异性引物。

常用反应体系 (20μl)

2×miRNA SYBR qPCR SuperMix	10μl
上游引物 (10μM)	0.4μl
下游引物 (10μM) *	0.4μl
cDNA 模板	Xμl
ROX (需根据机器型号选择添加)	0.4μl
补充 RNase Free H ₂ O 至	20μl

常用PCR程序:

两步法:

95℃, 1 min
40-45 次循环: { 95℃, 5 s
60℃, 30 s
融解曲线

三步法:

95℃, 1 min
40-45 次循环: { 95℃, 5 s
60℃, 20 s
72℃, 30 s
融解曲线

注:

- 1) 该试剂盒提供Universal miRNA primer R, 只需设计对应miRNA的上游引物即可。试剂盒中Universal miRNA primer R的T_m值为63℃, 设计miRNA Primer F的T_m值也尽量在60-65℃范围之内。
- 2) 为了提高引物间特异性, 也可以根据目的miRNA设计特异性上、下游引物进行检测 (设计原则见下方)。
- 3) 引物设计完毕后, 经过miRbase进行进一步验证 (blast), 以确定特异性。

07/miRNA 特异性上/下游引物设计原则:

miRNA检测引物设计原则除遵循一般qPCR引物设计原则 (将miRNA的U替换成T碱基) 外, 还须遵循以下规则:

1. 对于正向引物:

- 1) 选择最长的正向引物 (12-18个碱基长), 需要在miRNA的3'末端留下4-8个碱基用于设计反向引物;
- 2) 设计正向引物, 其3'末端的最后5个碱基中应包括2-3个A/T残基, 最后的2个碱基中应包括1个A/T残基;
- 3) 当正向引物的T_m值低于60℃, 需要在5'末端依次添加以下碱基: GACGC, 需要单个碱基依次添加, 查看T_m值的变化, 直到T_m在60℃以上为止。

例如添加三个碱基时, 引物序列为: CAGN₁₂₋₁₈, 其中N₁₈是18个miRNA特异性碱基, CAG是添加碱基; 最长的引物则是: CGCAGN₁₂₋₁₈, 其中N₁₈是18个miRNA特异性碱基, CGCAG是与miRNA不互补的5'末端序列;

- 4) 如果正向引物的T_m值较高 (>65℃), 则一般需要从5'端移除碱基, 直到T_m值小于65℃, 大于60℃。

2. 对于反向引物:

- 1) 根据正向引物设计原则步骤2) 选择最佳3'末端的反向引物。
- 2) 在反向引物的5'末端加入15个T碱基。
- 3) 反向引物的T_m值低于60℃时, 需要在5'末端依次添加以下碱基: GACCTGGAC, 需要单个依次碱基添加, 查看T_m值的变化, 直到T_m在60℃以上为止。

例如添加三个碱基时, 引物序列为: CAGT₁₅N₄₋₈, 其中, N₄₋₈是8个miRNA特异性碱基, T₁₅是15个T碱基, CAG是添加碱基。最长的引物则是: CAGGTCCAGT₁₅N₄₋₈, 其中, N₄₋₈是8个miRNA特异性碱基, T₁₅是15个T碱基, CAGGTCCAG是与miRNA不互补的5'末端序列。

1. 实例: hsa-miR-21 (序列: UAGCUUAUCAGACUGAUGUUG)

正向引物: 5'-GCAGTAGCTTATCAGACTGAT-3'

反向引物: 5'-GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTCAAC-3'