



miRcute 增强型 miRNA 荧光定量 检测试剂盒(SYBR Green) (FP411) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170531

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. cDNA 样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200 μ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



Step 1



室温融化cDNA模板、上游引物、2×miRcute Plus miRNA Premix、50×ROX Reference Dye 和Reverse Primer，之后置于冰上。使用前请将2×miRcute Plus miRNA Premix**上下颠倒轻轻均匀混合**，避免起泡，并经轻微离心后使用。将试剂置于冰上

注：如果试剂没有混匀，其反应性能会有所下降，且**不要使用振荡器混匀**。

Step 2

使用ABI 公司PRISM7500/7500fast, Roche公司、Biorad公司, Qiagen公司荧光定量仪器时, 建议在冰上按表1进行Real Time PCR反应液的配制。

表1

组成成分	50 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2 \times miRcute Plus miRNA Premix(with SYBR&ROX)	25 μ l	10 μ l	1 \times
Forward Primer(自备)	-	-	200 nM
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ l	200 nM
miRNA第一链 cDNA	-	-	-
ddH ₂ O	至50 μ l	至20 μ l	-



Step 2

使用ABI 公司PRISM7000/7300/7700/7900HT, Step one/Step one plus PCR System 荧光定量仪器, 建议在冰上按表2进行Real Time PCR反应液的配制。

表2

组成成分	50 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2 \times miRcute Plus miRNA Premix (with SYBR&ROX)	25 μ l	10 μ l	1 \times
Forward Primer(自备)	-	-	200 nM
Reverse Primer (10 μ M)	1 μ l	0.4 μ l	200 nM
miRNA第一链 cDNA	-	-	-
50 \times ROX Reference Dye	5 μ l	2 μ l	5 \times
ddH ₂ O	至50 μ l	至20 μ l	-



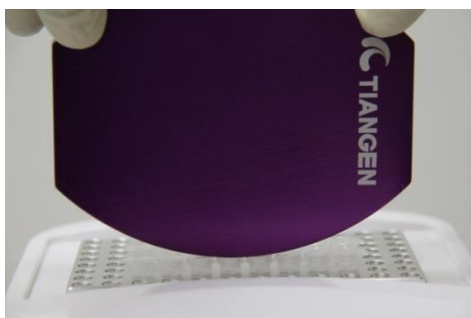
Tips

1. 配制定量混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个定量反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个定量反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个定量反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算除cDNA模板和水之外的组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中制成混合物，彻底混匀，短暂离心。
3. 计算每个样本所需加入的cDNA模板的体积和所需补充的ddH₂O的体积。如果每个样本所需的ddH₂O体积都相同，可计算总体所需的ddH₂O体积并加入到混合物中，彻底混匀。以表b为例：

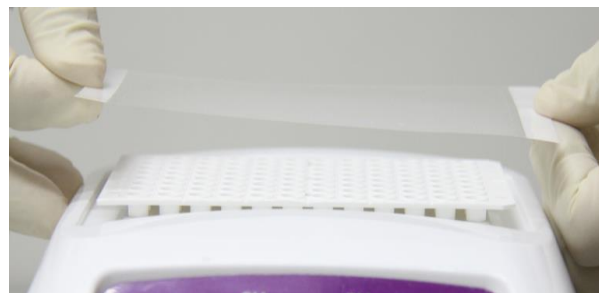
试剂	1个20 μl体系 使用量	6个20 μl体系 使用量	11个20 μl体系 使用量	22个20 μl体系 使用量
2× miRcute Plus miRNA Premix (with SYBR&ROX)	10 μl	60 μl	110 μl	220 μl
Forward Primer (10 μM)	0.4 μl	2.4 μl	4.4 μl	8.8 μl
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μl	2.4 μl	4.4 μl	8.8 μl
50× ROX Reference Dye	2 μl	12 μl	22 μl	44 μl
ddH ₂ O	根据实际情况计算加入			

4. 将混合物分装至每个检测管/孔中，按混合物—cDNA—ddH₂O（如果需要）的顺序加样，配制体系，彻底混匀。

Step 3



使用八连排管时，体系配制分装完毕后，改好管盖，用压盖器压实。在管盖两端做好标记，不要标记在检测孔正上方的管盖上，以免影响荧光读数。



使用96孔板时，体系配制分装完毕后，使用封口膜封板，压实，在孔板四周或未加样的检测孔出标记。

Step 4



使用微孔板离心机短暂离心96孔板或八连排管。注意管底朝向外侧，注意配平。
离心八连排管时，将八连排管置于管架上，用固定片固定后进行离心。

Step 5

一般情况下，可采用如下述程序进行定量PCR反应：

循环	温度	时间	内容
1×	95°C	15 min	起始模板变性
40-45×	94°C	20 sec	PCR循环中模板变性
	60°C	34 sec	退火, 延伸
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)			

将样本转移至荧光定量PCR仪，编好程序，开始qPCR反应。

Step 5

如需提高低丰度miRNA的检测特异性和检出率，可采用下述程序进行定量PCR反应：

循环	温度	时间	内容
1×	95℃	15 min	起始模板变性
5×	94℃	20 sec	富集低丰度目标 miRNA，无需收集荧 光信号
	63~65℃	30 sec	
	72℃	34 sec	
40~45×	94℃	20 sec	PCR循环中模板变性
	60℃	34 sec	退火, 延伸
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)			