

miRNA Universal SYBR qPCR Mix

■ 目录号

TSE2001

■ 产品简介

本产品是采用SYBR Green I嵌合荧光法进行miRNA实时定量PCR的专用试剂,可对目的miRNA进行快速、高效、特异性的定量检测。

miRNA具有序列较短且同一家族miRNA序列高度相似的特点,在定量反应中对产品的特异性要求极高。本品基于抗体修饰的热启动DNA聚合酶、精心优化的buffer体系、优化的SYBR Green I浓度以及PCR反应增强剂,使产品具有剪接性强、扩增效率高、扩增曲线标准等特点,有效抑制非特异性扩增,获得稳定可靠的qPCR结果。此外配套的ROX Reference Dye I/II可用于校正仪器孔间误差。本产品为浓度2×的预混液,使用时只需添加模板、引物和ddH₂O,使Mix工作浓度为1×即可。推荐与本公司SynScript® III miRNA RT SuperMix(by tailing A)(目录号:TSK3001)配套使用。

■ 产品组成

组分	规格(100次)
2×miRNA Universal SYBR qPCR Mix	1.0 mL
50×ROX Reference Dye I (High)	200 μL
50×ROX Reference Dye II (Low)	200 μL

01

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

■ 产品应用

本产品适用于SYBR Green染料法检测及分析miRNA的荧光定量实验,兼容各种荧光定量PCR仪。

■ 产品特点

- 灵敏度高、剪接性强、稳定性好;
- 抗体修饰的热启动酶,有效避免引物二聚体和非特异性扩增;
- 配有适合不同机型的ROX Reference Dye。

■ 使用方法

1. 推荐PCR反应体系

组分	20 μL体系	终浓度
2×miRNA Universal SYBR qPCR Mix ^a	10 μL	1×
特异性引物(10 μM)	0.4 μL	0.2 μM
通用引物(10 μM) ^b	0.4 μL	0.2 μM
模板DNA ^c	见标注	
50×ROX Reference Dye I/II ^d	0.4 μL	1×
ddH ₂ O	Up to 20 μL	

a. 包含抗体修饰的热启动DNA聚合酶, dNTPs, SYBR Green I, PCR反应增强剂等。

b. 若cDNA是miRNA经茎环法逆转录所得,请使用对应反向通用引物;若cDNA是miRNA经加尾法逆转录所得,请使用逆转录试剂盒中配备的通用引物。推荐使用本公司逆转录试剂盒SynScript® III miRNA RT SuperMix (by tailing A)(目录号:TSK3001)。

02

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

c. 推荐模板加样量为1~2 μL,如模板类型为未稀释cDNA原液,模板添加量不应超过总反应体系的10%。

d. 可根据所使用荧光定量PCR仪机型确定是否添加ROX Reference Dye或添加类型,如下表所示:

ROX选择	荧光定量PCR仪器机型	
ROX Reference Dye I	Applied Biosystems	5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™
ROX Reference Dye II	Applied Biosystems	7500, 7500 Fast, ViiATM 7, QuantStudio 3/5/6 Flex/7 Flex/12k Flex
	Stratagene	MX4000™, MX3005P™, MX3000P™
no ROX Reference Dye	ThermoFisher	PikoReal™
	Bio-Rad	CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™
	Roche	Applied Science LightCycler® 480, LightCycler® 2.0, LightCycler® 96
	Qiagen/Corbett	Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000
	TaKaRa	Thermal Cycler Dice™ Real Time, System TP700/TP800/TP850/TP900/TP950
	illumina	Eco qPCR
Eppendorf	Mastercycler™ ep realplex, realplex 2s	

03

本产品仅供研究使用,不用于临床诊断。

2. 推荐PCR反应程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	95°C	1 min	1 cycle
循环反应	95°C	10 s	40 cycles
	60°C	20 s	

熔解曲线分析^a

e. 实验中使用仪器机型不同, 熔解曲线采集程序也有不同, 通常使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

■ 注意事项

- 本产品尽量避免反复冻融。
- 建议提前混样配制反应体系, 注意加样准确, 避免操作误差。
- 采取必要的防污染措施, 使用优质的实验耗材, 操作时注意更换PE手套。
- 本产品应在彻底融化并上下颠倒, 充分混匀后使用, 为了获得最佳的扩增效率, 建议在冰上配制反应体系。
- 本产品中含有荧光染料, 配制qPCR反应液时应避免强光照射。
- 在优化qPCR反应时, 应从操作、引物、反应条件等方面进行考虑。

■ 常见问题与解决方法

常见问题	可能原因	解决方法
无Ct值 或Ct值偏大	模板浓度过低或降解	适当增加模板用量, 检查模板是否降解, 使用新鲜制备的模板
	模板纯度低, 蛋白质、盐等杂质会影响PCR扩增和荧光检测	重新制备高质量的模板或对模板进行稀释, 降低杂质浓度
	反应循环数不够	循环数一般设置为40

NTC出现明显扩增	环境或气溶胶核酸污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSP001)对环境进行清洁处理
	qPCR体系污染	使用RNase-Free耗材
Ct值重复性差	加样误差	使用优质耗材与移液器, 避免加样挂壁, 模板浓度不宜太高
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数
	仪器误差	选择适用仪器, 定期校准
熔解曲线多峰	环境或体系污染	使用Trelief® Solution核酸清洁液(目录号:TSP001)对环境进行清洁处理; 使用RNase-Free耗材

■ 保存条件

-25~-15°C避光保存, 保质期2年, 干冰运输。

■ 技术支持

公司产品使用过程中如有任何疑问与建议, 欢迎随时与我们联系:
product@tsingke.com.cn。

