

## Hieff<sup>®</sup> miRNA Universal qPCR SYBR Master Mix (加 A 法)

### 产品信息

产品名称	产品编号	规格
Hieff <sup>®</sup> miRNA Universal qPCR SYBR Master Mix (加 A 法)	11171ES03	1 mL
	11171ES08	5×1 mL

### 产品描述

microRNA 是一类被广泛关注的非编码 RNA，长度为 22 nt 左右，对植物和动物的基因表达有着非常重要的调控作用。本试剂盒采用 SYBR<sup>®</sup> Green I 嵌合荧光法的原理进行 miRNA 荧光定量检测。本产品中的 2×Hieff<sup>®</sup> miRNA Universal qPCR SYBR Master Mix 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，含有特殊的 ROX Passive Reference Dye，适用于所有 qPCR 仪器，无需在不同的仪器上调整 ROX 的浓度，只需在配制反应体系时加入引物和模板即可进行扩增。DNA Polymerase 采用化学修饰的热启动聚合酶，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。

本产品必须与本公司的 Hifair<sup>®</sup> miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (加 A 法) (Cat#11148ES) 配套使用，以获得最终的实验结果。

### 产品组分

组分编号	组分名称	产品编号/规格	
		11171ES03 (20 μL×100 rxn)	11171ES08 (20 μL×500 rxn)
11171-A	2×Hieff <sup>®</sup> miRNA Universal qPCR SYBR Master Mix	1 mL	5×1 mL
11171-B	RNase-free H <sub>2</sub> O	2×1 mL	5×1 mL

### 运输与保存方式

冰袋运输。-20℃避光保存，有效期 1 年。

### 需自备的试剂及耗材

- 1) 无核酸酶污染的枪头及离心管。
- 2) PCR 上游引物 (Forward Primer)。

### Forward Primer 设计原则：

通常以成熟的 miRNA 序列为基础，将 U 替换成 T。Tm 值建议在 65℃左右。可适当在引物的 5'端添加若干个 G 或 C 碱基以增加 Tm 值，也可适当在 5'或 3'端去掉若干碱基以减少 Tm 值，注意避免引入二级结构。

### 注意事项：

- 1) 使用前，将冻存的各组分充分融解并轻轻混匀后使用。
- 2) 实验时，请尽量使用无污染的耗材，避免污染。
- 3) 本产品避免反复冻融，配制时应避免强光照射。
- 4) 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
- 5) 本产品仅作科研用途！

## 操作步骤

### 一、体系配制

- 1) 将试剂放置室温下融化，使用前上下颠倒，轻轻混匀，并轻微离心后使用，避免起泡。
- 2) 将试剂置于冰上，按照下表配制试剂。RNase-free H<sub>2</sub>O 可替换为其他用于分子生物学实验的无核酸酶水。

【注】：没有混匀试剂、使用振荡器混匀、未在冰上配置试剂等会导致反应性能下降。

#### 3) 荧光定量 PCR 体系配制

组分	体积 (μL)	体积 (μL)	终浓度
2×Hieff <sup>®</sup> miRNA Universal qPCR SYBR Master Mix	10 μL	25 μL	1 ×
Forward Primer (自备)	X	X	400 nM
Reverse Primer (10 μM)	0.8 μL	2 μL	400 nM
cDNA	X	X	-
RNase-free H <sub>2</sub> O	Up to 20 μL	Up to 50 μL	-

【注】：a) miRNA 第一链 cDNA 的加入量不要超过 qRT-PCR 体积的 1/10。高浓度 cDNA 易导致非特异扩增，可对 cDNA 适当稀释 10-1000 倍。

b) Reverse Primer (10 μM) 来源于试剂盒 11148ES。由于专利的保密性，miRNA 加 A 法反转录后，cDNA 下游引物序列不同厂商之间存在差异，建议使用翌圣加 A 法反转录试剂盒 11148ES，以保证最终的实验结果。

### 二、PCR 反应程序设置

可参考以下两个程序进行定量 PCR 反应。

#### a. 荧光定量 PCR 常规扩增程序（两步法）

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	10 min	1
变性	95°C	15 sec	35-40
退火/延伸	60°C	20 sec	
熔解曲线阶段	仪器默认设置		1

#### b. 荧光定量 PCR 快速扩增程序（两步法）

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	10 sec	1
变性	95°C	5 sec	40
退火/延伸	60°C	20 sec	
熔解曲线阶段	仪器默认设置		1

【注】：

- 1) 退火/延伸温度和时间可根据实验要求适当调整。
- 2) 常规程序与快速程序根据实验仪器选择，例如：ABI QuantStudio 5 等仪器可以进行快速程序设置，Bio-Rad CFX96 等仪器不可设置快速程序，需要进行常规程序设置。