

# Enhanced miRNA Real-Time PCR Detection Kit

## 说明书

产品型号：ALPC-49S001

品牌：RDland

规格：125 次 × 20  $\mu$ L 反应体系

储存条件：-20°C 避光保存至少 12 个月，使用前充分融解混匀。

### 一、产品组成

| 组分名称                                   | 规格         |
|----------------------------------------|------------|
| 2 × miRNA qPCR Mix ( With Sybr Green ) | 1.25 mL    |
| Reverse primer ( 10 $\mu$ M )          | 55 $\mu$ L |

### 二、储存与稳定性

- 长期保存：-20°C 避光条件下，有效期不少于 12 个月。
- 短期使用：2 × miRNA qPCR Mix ( With Sybr Green ) 可置于 4°C 保存，避免反复冻融；Reverse primer ( 10  $\mu$ M ) 每次使用后需立即放回 -20°C 保存。

### 三、产品原理与说明

本试剂盒采用 SYBR Green I 嵌合荧光法，专为 miRNA 荧光定量检测设计，包含反应所需的核心试剂：

- 2 × miRNA qPCR Mix ( 含 Sybr Green )：预混式荧光定量 PCR 试剂，采用抗修饰热启动 DNA 聚合酶，搭配优化 Buffer 体系，反应特异性更强、灵敏度更高，可在宽范围内实现准确定量。
- Reverse primer：试剂盒配套下游引物， $T_m$  值设计为 65°C。

注意：本试剂盒需与 Enhanced miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit ( ALPC-48S001 ) 配套使用。

### 四、需用户自备的试剂与耗材

- 无核酸酶的分子生物学级纯水 ( ddH<sub>2</sub>O )

- 待检测 miRNA 对应的 qPCR 上游引物 (Forward primer)

## 五、Forward Primer 设计指南

- 遵循通用引物设计基本原则。
- 以成熟 miRNA 序列为模板，将序列中的 U 替换为 T (基础设计方法)。
- 上游引物的  $T_m$  值需控制在  $65^{\circ}\text{C}$  左右 (与下游引物  $T_m$  值匹配)。
- 若直接按方法 2 设计的引物  $T_m$  值过低：可在引物 5' 端添加 G/C 碱基，或在 3' 端添加 A 碱基，也可两端同时添加。
- 若直接按方法 2 设计的引物  $T_m$  值过高：可在引物 5' 或 3' 端适当删减碱基。

## 六、安全与操作注意事项

- 加入的 miRNA 第一链 cDNA 体积，不得超过 qPCR 反应体系总体积的 1/10。
- 高丰度模板易引发非特异性扩增，建议根据目标 miRNA 丰度，将 cDNA 稀释 5–100 倍后使用；使用富集的 miRNA 模板可降低非特异性扩增、提升检测灵敏度。
- 试剂含 SYBR Green I 荧光染料，保存与配制反应液时需避免强光直射。
- 本试剂盒不含 ROX 参比染料，用户可根据 qPCR 仪器要求，自行添加 ROX 染料消除信号背景、校正孔间误差，配套 ROX 产品货号为 PC38 Rox Reference Dye。

## 七、标准操作步骤

### 步骤 1：试剂融化

室温融化  $2 \times$  miRNA qPCR Mix 和 Reverse primer ( $10 \mu\text{M}$ )，完全溶解后备用。

### 步骤 2：试剂混匀

轻轻颠倒混匀  $2 \times$  miRNA qPCR Mix，避免产生气泡，混匀后短暂离心；禁止使用振荡器混匀。

### 步骤 3：反应体系配制 (冰上操作)

以下为两种常用体系配方，可根据实验需求选择：

| 组分                                            | 体积               |                   | 终浓度               |
|-----------------------------------------------|------------------|-------------------|-------------------|
| $2 \times$ miRNA qPCR Mix ( With Sybr Green ) | $25 \mu\text{L}$ | $10 \mu\text{L}$  | $1 \times$        |
| Forward primer ( $10 \mu\text{M}$ )           | $1 \mu\text{L}$  | $0.4 \mu\text{L}$ | $0.2 \mu\text{M}$ |

|                                    |            |             |             |
|------------------------------------|------------|-------------|-------------|
| Reverse primer ( 10 $\mu$ M )      | 1 $\mu$ L  | 0.4 $\mu$ L | 0.2 $\mu$ M |
| miRNA 第一链 cDNA                     | x $\mu$ L  | x $\mu$ L   | —           |
| ddH <sub>2</sub> O to final volume | 50 $\mu$ L | 20 $\mu$ L  | —           |

## 八、PCR 循环程序设置

### 方案 1：三步法（推荐用于提升扩增效率）

| 阶段   | 温度     | 时间        | 循环数       |
|------|--------|-----------|-----------|
| 预变性  | 94°C   | 2–3 min   | 1 个       |
| 变性   | 94°C   | 10–20 sec | 35–45 个循环 |
| 退火   | 60°C   | 10–20 sec |           |
| 延伸   | 72°C   | 20 sec    |           |
| 溶解曲线 | 仪器默认程序 | —         | 1 个       |

### 方案 2：二步法（推荐用于提升反应特异性）

| 阶段      | 温度     | 时间        | 循环数       |
|---------|--------|-----------|-----------|
| 预变性     | 94°C   | 2–3 min   | 1 个       |
| 变性      | 94°C   | 10 sec    | 35–45 个循环 |
| 退火 / 延伸 | 60°C   | 30–34 sec |           |
| 溶解曲线    | 仪器默认程序 | —         | 1 个       |