

miRNA Universal SYBR[®] qPCR Master Mix

MQ101-01/02

Version 7.1



Vazyme Biotech Co., Ltd.

产品概述

本产品是使用SYBR[®] Green I嵌合荧光法进行miRNA定量反应的专用预混液。由于miRNA序列短，且同一家族的miRNA序列往往高度相近，故在定量时对特异性要求极高。本品基于化学法热启动的AceTaq[®] DNA Polymerase，配以优化的Buffer，能够极大地减少非特异性扩增；同时，特殊的ROX Reference Dye，使得预混液适用于所有qPCR仪器，无需在不同的仪器上调整ROX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。推荐与本公司miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop) (Vazyme # MR101)配套使用。

产品组分

组分	MQ101-01 (125 nm / 20 μ l reaction)	MQ101-02 (500 nm / 20 μ l reaction)
2 \times miRNA Universal SYBR qPCR Master Mixture ^a	1.25 ml	4 \times 1.25 ml
mQ Primer R (10 μ M) ^b	70 μ l	250 μ l

a.包含dNTP, Mg²⁺, AceTaq DNA Polymerase, SYBR Green I, Specific ROX Reference Dye等

b.序列为 AGTGCAGGGTCCGAGGTATT

适用机型

Applied Biosystems 5700, 7000, 7300, 7700, 7800, 7900HT, 7900HT Fast, StepOne[™], StepOnePlus[™], 7500, 7500 Fast, VIA[™]7.
Bio-Rad CFX96[™], CFX384[™], iCycler IQ[™], IQ[™]5, MyiQ[™], MiniOpticon[™], Opticon[®], Opticon 2, Chromo4[™].
Qiagen/Corbett Rotor-Gene[®] Q, Rotor-Gene[®] 3000, Rotor-Gene[®] 6000.
Stratagene MX4000[™], MX3005P[™], MX3000P[™].
Eppendorf Mastercycler[®] ep realplex, realplex 2s.
Roche Applied Science LightCycler[™] 480. 及其它qPCR仪。

▲ 本产品使用特殊的ROX Reference Dye，适用于所有qPCR仪器（无ROX校正仪器，低浓度ROX校正仪器，高浓度ROX校正仪器），无需在不同的仪器上调整ROX的浓度。

保存条件

-20 $^{\circ}$ C避光储存。

实验流程

1. 在qPCR管中配制如下混合液

2 \times miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix	10.0 μ l
Specific Primer (10 μ M)	0.4 μ l
mQ Primer R (10 μ M) [*]	0.4 μ l
Template DNA/cDNA	x μ l
ddH ₂ O	To 20.0 μ l

* mQ Primer R与本公司miRNA Design软件设计的逆转录引物配套，所用茎环序列为GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGGCACTGGATACGAC；当使用不同的茎环序列时，需自行设计合成qPCR反向引物。

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- ▲ 一般来说反应体系中引物浓度为0.2 μ M即可得到较好的扩增效果。当反应性相对比较差时，可以在该浓度0.1-1.0 μ M范围内调整引物浓度。
- ▲ qPCR灵敏度很高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板经稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重现性。
- ▲ 如模板类型为未稀释cDNA原液，使用体积不应超过qPCR反应总体积的1/10。

2. 按下列条件进行qPCR反应

Stage 1	预变性	Reps: 1	95 $^{\circ}$ C	5 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95 $^{\circ}$ C	10 sec
			60 $^{\circ}$ C	30 sec
Stage 3	融解曲线 [*]	Reps: 1	95 $^{\circ}$ C	15 sec
			60 $^{\circ}$ C	80 sec
			95 $^{\circ}$ C	15 sec

* 仪器类型不同，融解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

质量控制

纯度检测：所有组分经检测均无核酸外切酶、核酸内切酶、核酸残留。

功能检测：以HeLa细胞总RNA逆转录产物的稀释液为模板，扩增6个基因，每个基因的融解曲线为单峰，特异性好，扩增曲线在批次间的产品中相近。

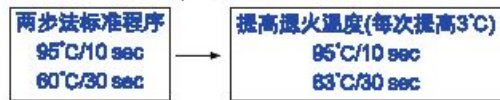
反应体系优化方案

优秀的反应体系应具备以下特征：融解曲线单峰(扩增特异性)、扩增效率接近100%(扩增效率)、 C_T 值小(扩增灵敏度)。如使用默认反应条件性能不佳时，可根据下述方案进行优化。

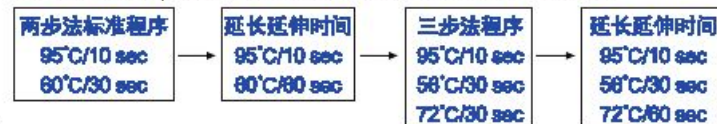
1).引物浓度与反应性能之间的关系：当引物终浓度在0.1 μM - 1.0 μM 范围之间变化时，引物浓度越高，扩增特异性越差，但扩增效率越高。

2).扩增程序与反应性能之间的关系：

需提高扩增特异性，可提高退火温度：



需提高扩增效率，将两步法程序延长延伸时间或使用三步法程序：



常见问题与解决方案

◇扩增曲线形状异常

- ①扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生。提高模板浓度重复实验。
- ②扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于 C_T 值。减小基线终点(C_T 值-4)，重新分析数据。
- ③个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡。处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

◇反应结束无扩增曲线出现

- ①反应循环数不够：一般设置循环数为40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- ②确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在72°C延伸阶段。
- ③确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过PAGE电泳检测完整性，以排除其降解的可能。
- ④模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ⑤模板降解：重新制备模板，重复实验。

◇ C_T 值出现太晚

- ①扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- ②模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- ③模板降解：重新制备模板，重复实验。
- ④体系中存在PCR抑制剂：一般为模板带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

◇阴性对照出现明显扩增

- ①反应体系污染：更换新的Mx、水、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
- ②引物二聚体的出现：配合融解曲线进行分析。

◇绝对定量时标准曲线线性关系不佳

- ①加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- ②标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- ③模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

◇融解曲线出现多峰

- ①引物设计不优：根据设计原则设计合成新的引物。
- ②引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- ③cDNA模板带有基因组污染：重新制备cDNA模板。

◇实验重复性差

- ①加样体系不准：使用性能较好的移液枪；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- ②定量PCR仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- ③模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。



企业已通过 ISO 9001:2015
国际质量管理体系认证