

MonAmp™ miRNA
Universal Super Specificity
qPCR Mix

REF: MQ00901

储运条件

长期保存请于 -20℃避光保存，尽量避免反复冻融。

产品组成

组分 / 规格	MQ00901S
MonAmp™ miRNA Universal Super Specificity qPCR Mix	5×1 ml
Nuclease-Free Water	5×1 ml

产品简介

MonAmp™ miRNA Universal Super Specificity qPCR Mix 是专门为 miRNA 逆转录产物下游定量检测而研发设计的新一代 SYBR Green I 嵌合染料法专用 qPCR 试剂，为 2× 预混液，包含除引物和 DNA 样品以外的所有 qPCR 组分，可减少操作步骤，缩短加样时间，降低污染几率。其核心组分是经过改良后的新一代化学法修饰的热启动 DNA 聚合酶，配合精心优化的 Buffer 体系，显著提高了产品的扩增特异性和扩增效率，可对宽广浓度范围的模板进行准确定量，获得稳定可靠的 qPCR 结果。本产品中含有特殊的 ROX Reference Dye，适用于所有 qPCR 仪器，无需在不同仪器上调整 ROX 的浓度，使用更加方便快捷。

注：本产品推荐与 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒（加尾法）（MR05301）一起配套使用。

使用方法

1. 适配机型

产品	适用机型
适用 None Rox 模式的机型	Bio-Rad CFX 全系列； Roche LightCycler™ 系列； Eppendorf Mastercycler® ep realplex 系列； Qiagen / Corbett Rotor-Gene® 系列； Takara Thermal Cycler Dice； analytikjena qTOWER 系列等
适用 Low Rox 模式的机型	ABI 7500/7500 Fast, ABI ViiA 7™； ABI QuantStudio™ 系列； Stratagene Mx3000P®/3005P™/4000™
适用 High Rox 模式的机型	ABI 7000 / 7300 / 7700 / 7900 HT / 7900 HT Fast, StepOne™, StepOne Plus™ 等

2. 使用注意

- ① 因 Mix 中预混有荧光染料，储存时应注意避光保存；
- ② 使用前应将 Mix 充分混匀，但请勿长时间剧烈震荡以免出现较多气泡；
- ③ 本产品中已预混 ROX Reference Dye，使用时无需再额外添加。

3. 建议的 qPCR 体系

试剂	使用量	终浓度
MonAmp™ miRNA Universal Super Specificity qPCR Mix	10 µl	1×
miRNA-specific 5' primer (10 µM) ^a	0.4 µl	0.2 µM
Universal-qPCR 3' primer (10 µM) ^a	0.4 µl	0.2 µM
miRNA 第一链 cDNA 试剂盒获得 cDNA ^b	X µl	10~200 ng/20 µl
Nuclease-Free Water	To 20 µl ^c	

- 5' 特异引物需根据 miRNA 序列进行合成，基础设计方法是将 miRNA 模板序列 U 碱基替换为 T 碱基；3' 端引物推荐使用 miRNA 第一链 cDNA 合成试剂盒（加尾法）（MR05301S）中提供的 Universal-qPCR-3' primer，Tm 值为 60℃。为了避免因 5' 和 3' primer 引物 Tm 值差异太大而影响扩增效率，请尽量将 5' 特异引物 Tm 值控制在 60℃ 左右；
- 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%。不同种类模板中含有的 miRNA 拷贝数目不同，若无法确定 miRNA 拷贝数，建议将模板从最高浓度开始进行梯度稀释后扩增，以确定最佳的模板投入量；
- 推荐加样体系为 20 µl 或以上，加样体系总体积减少容易导致扩增重复性变差。

4. qPCR 反应程序（可根据机型适当调整）

两步法

步骤	温度	时间
预变性 ^a	95 °C	10 min
变性	95 °C	10 sec
退火 & 延伸 ^b	60 °C	30 sec
熔解曲线 ^c	使用仪器默认采集程序	

三步法

步骤	温度	时间
预变性 ^a	95 °C	10 min
变性	95 °C	10 sec
退火 ^b	55~65 °C	10 sec
延伸 ^b	72 °C	30 sec
熔解曲线 ^c	使用仪器默认采集程序	

- 本产品中所用的热启动 DNA 聚合酶需热激活处理以释放酶活，预变性时间至少应不低于 10 min，预变性时间设置较短会导致酶活释放不完全从而而影响扩增反应；
- 根据引物的 Tm 值进行退火 & 延伸（退火）温度的设定；若扩增片段在 200 bp 以内，退火 & 延伸（延伸）时间可以设置为 15 sec；此外，退火 & 延伸（延伸）时间的设置还需根据您使用的 qPCR 仪所需要的最短数据采集时间自行调整；
- 不同 qPCR 仪的熔解曲线采集程序有差别，一般可使用仪器默认的熔解曲线采集程序。

☎ 400-928-3698

莫纳生物科技有限公司
Monad Biotech Co., Ltd.

E-mail: support@monadbiotech.com
Web: www.monadbiotech.com



Simply Discover More

5. 实验优化

若使用默认反应条件反应性能不佳时，则需要进行反应条件的优化，可以从引物浓度以及扩增程序两个方面进行：

① 引物浓度调整

当引物终浓度在 0.1~1.0 μM 范围之间变化时，引物浓度越低，扩增特异性越高，但扩增效率会有所下降。

② 扩增程序优化

需提高扩增特异性，可使用两步法程序或提高退火温度；需提高扩增效率，可使用三步法程序或延长延伸时间。

6. 引物设计原则

- ① 扩增产物长度建议控制在 80~200 bp；
- ② 引物长度为 18~25 bp；
- ③ 正向引物和反向引物的 Tm 值相差不超过 1℃为佳，Tm 值控制在 58~62℃为佳；
- ④ 引物的 GC 含量控制在 40%~60% 之间；
- ⑤ 引物 A、G、C、T 整体分布尽量要均匀，避开 T/C 或者 A/G 的连续结构（特别是 3' 端）；
- ⑥ 引物 3' 端最后一个碱基最好为 G 或者 C；
- ⑦ 避开引物内部或者两条引物之间的互补序列；
- ⑧ 使用 NCBI BLAST 功能检索确认引物的特异性。

常见问题

问题描述	可能原因	解决办法
扩增曲线不光滑	荧光信号太弱，经系统校正后产生	确保 Mix 中预混的染料未降解；更换更利于荧光信号收集的 qPCR 专用耗材
扩增曲线断裂或下滑	模板浓度较高，基线的终点值大于 Cq 值	减小基线终点 (Cq 值 -4)，重新分析数据
个别孔扩增曲线突然骤降	反应管内留有气泡	确保 Mix 完全溶解，请勿涡旋振荡混匀加样完成后轻弹离心去除气泡
反应结束无扩增曲线出现	反应循环数偏少	设置循环数为 40，但更多的循环数会增加过多的背景信号
	荧光信号采集步骤未设置或者设置错误	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℃延伸阶段
	引物可能降解	长期未用的引物，应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
	模板降解	重新制备模板，重复实验
Cq 值出现过晚	扩增效率低	提高引物浓度，尝试三步法扩增程序，或者重新设计引物
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验，样品浓度未知的情况下先从最高浓度做起
	模板降解	重新制备模板，重复实验
	扩增产物过长	扩增产物长度控制在 80~200 bp
	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重新制备纯度高的模板重复实验
空白对照出现信号	反应体系污染	首先更换空白对照的水，如果还发生同样情况，继续更换引物、吸头、PCR 管或启用新的 Mix 反应体系在超净工作台上配制，减少气溶胶污染
	出现引物二聚体等非特异性扩增	一般在 35 循环以后空白对照出现扩增产物属正常情况，应配合熔解曲线进行分析重新设计引物，调整引物浓度或优化 PCR 反应程序
熔解曲线出现多峰	引物设计不佳	根据引物设计原则重新设计新引物
	引物浓度过高	适当降低引物浓度
	cDNA 模板存在基因组污染	提取后的 RNA 溶液使用 DNA 酶进行消化，例如：dsDNase，以去除基因组污染，或设计跨内含子引物
实验重复性差	加样误差大	使用精准的移液器、配合高品质吸头准确移液 高倍稀释模板，加入大体积模板减少加样误差 放大 qPCR 反应体积
	模板浓度过低	减少模板稀释倍数重复实验
	qPCR 仪不同位置的温度偏差	定期校准 qPCR 仪

☎ 400-928-3698

莫纳生物科技有限公司
Monad Biotech Co., Ltd.

E-mail: support@monadbiotech.com
Web: www.monadbiotech.com



Simply Discover More