

cat. A2030A002

cat. A2030A002X3

cat. A2030A002X10

microRNA PCR premix 操作说明书 2018001 版说明书

【前言】

本试剂盒提供了进行简便、灵敏的荧光 PCR 检测的完整系统，适用于 microRNA 茎环法 QPCR 使用，获得方便、灵敏和准确、可靠的检测结果。使用详细可参考电子版 microRNA qRT-PCR Sybgreen Detection Kit 使用说明。

【试剂盒组成】

cat. A2030A002 定量 PCR Premix 试剂混合物 (2X): 1.00 ml/支, 1 支
cat. A2030A002X3 定量 PCR Premix 试剂混合物 (2X): 1.00 ml/支, 3 支
cat. A2030A002X10 定量 PCR Premix 试剂混合物 (2X): 1.00 ml/支, 10 支

【反应液配制】

以 20ul 反应体系反应体系为例，一支 mix 可以进行 100tests 的实验；

1. mix 的配制：

目的 microRNA mix 和内参 microRNA mix 请按照下表进行配制；

货号	名称	20ul 体系
A2030A002	Biotnt 荧光染料 PCR Premix	10
	上游引物	稀释到 1x
	下游引物	稀释到 1x
A2030A001-A5	dd 水 (Rnase 和 Dnase free)	补水
合计		19

- 1) 引物浓度如果提供的为 10^{*}，则 20ul 体系中加入 2ul；如果提供的为 20^{*}，则 20ul 体系中加入 1ul；
- 2) 如果提供的是 50^{*}的引物，则 20ul 体系中加入 0.4ul，以此类推；
- 3) 部分仪器，如 AB 的 7900, vial7 和 stepone 等，可以使用 5-10ul 的反应体系；以上体系可以等比例缩小使用；

电话: 4008801880 或 0086 21 51692391 传真: 0086 21 51692391

Email: lab@biotnt.com 主页: www.biotnt.com

微信公众平台: 搜索“BioTNT”可加入

在线支持 QQ 群: 47468567

联系地址: 上海市闵行区罗锦路 98 号 2 号楼 5 楼 邮编:200237

4) 本试剂由于加入了化学修饰法的热启动 taq 酶，所以可以室温下进行配制；不需冰上操作；

5) real time PCR 进行相对定量实验时，请按照如下方法计算和配制：

- 设置阴性对照和阳性对照；各 1 孔，共两孔；
- 如样本需要进行内参验证或者预实验，可以进行单孔实验；正式数据建议用双复数据或者三复数据
- 根据需要配制的孔数，再多配 10%的液体量；

2. 把混好的 mix 每孔 19ul 加入仪器配套的 PCR 反应板或者 8 连管中；

3. 按照计划，样本孔，每孔加入 1ul 已经逆转录好的 CDNA；阴性对照孔加入 1ul dd 水，使总体积为 20ul；

注：CDNA 样品如果浓度过高，可以进行稀释使用；方法见附录；

4. 上机前，请在 2000 转左右离心 10s-30s，以便液体甩到底部；

5. real time PCR 上机：

1) 适用荧光定量 PCR 仪：AB, BIORAD IQ 系列, Opticon 系列

ROTORGENE, STRATAGENE 等品牌。注意：

ROCHE 品牌的 lightcycler 仪器由于光路不同，需要进行调试。

➢ AB 系统仪器，Biorad IQ 系列仪器可以完全参照以下的条件：

95°C 5 分钟→95°C 5s→60°C 30s (读荧光)→熔解曲线分析

40 个循环 (可选)

➢ Biorad opticon 系列和 CFX, Rotorgene 可以参照以下条件：

95°C 5 分钟→95°C 5s→60°C 30s→72°C 5s (读荧光)→熔解曲线分析

40 个循环 (可选)

其他仪器请根据自己的特点进行优化；

注意：本 mix 中的 taq 酶是化学修饰法的 hot start 酶，95°C 5 分钟这一步骤必须保留；

【使用注意事项】

- 1、冻结制品融解后请上下颠倒轻轻均匀混合，避免振荡器等剧烈搅拌。混匀制品后轻微离心后使用。应在使用前充分融化，混匀，离心数秒，使液体集中在离心管底部。
- 2、使用前请于-20°C 保存，融解后的制品请于冰上放置，使用后请立即保存于-20°C。
- 3、反应液的配制、分装请使用新的（无污染的）无菌无酶无热源枪头、Microtube 等，尽量避免污染。
- 4、引物设计过程中尽量避免发夹结构、引物二聚体结构的发生。目标片断最好在 250bp 以内，尽可能在 150bp 以内。
- 5、在操作中，应使用不含荧光物质的一次性手套(经常替换)、一次性薄壁进口 200 μl PCR 管、移液器头(带滤嘴自卸式)，不能用手直接触摸 PCR 反应管。
- 6、操作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用 10%次氯酸钠及/或 70%乙醇擦拭消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后用紫外灯处理。
- 7、试剂盒请在保质期内使用。
- 8、如需标记，请在试管架或离心机管架上标记，不要直接标记在离心管上。
- 9、实验中涉及的有害有毒标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置专门容器中，妥善处理。
- 10、配制反应体系时，应注意移液器的使用方法，所有的液体都要缓慢加至管底，不要加至管壁，所有液体的混匀要用振荡器进行，不能用移液器吹打，避免产生气泡。如果产生气泡，请用手指将气泡弹破，再低速离心。反应体系配制完毕后低速离心数秒，立即进行 PCR 扩增。

【加样的注意事项】

- 1) 注意加样枪的使用，加样时不要把枪头伸入液面下，避免挂液误差；
- 2) 要使用低吸附的进口枪头，避免每次的残留导致的加样误差。

正确的加样方式：离液面 1-2mm，加液，不靠壁，不贴液面。