

microRNA qRT-PCR Sybgreen Detection Kit (120T)

Contents and Storage (组分及贮存)

货号: A2030A003

版本: 20180001

试剂盒由四部分组成:

PART A, 货号为 A2030A001(120T):

货号	试剂	说明	120T	储存条件
A2030A001-A1	5x逆转录 Buffer	1.0ml/支	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
A2030A001-A2	高效逆转录酶	60ul/支	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
A2030A001-A3	重组 RNA 酶抑制剂	35ul/支	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
A2030A001-A4	dNTP mix	120ul/支	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
A2030A001-A5	dd 水 (Rnase 和 Dnase free)	1.25ml/支	3 支	-20 度(可以稳定至少一年)

PART B, 货号为(A2030A002X3) (20ul*300T):

A2030A002	Biotnt 荧光染料 PCR Premix	1.0ml/支	3 支	-20 度(可以稳定至少一年)
-----------	---------------------------	---------	-----	-----------------

PART C (目的引物试剂盒), 共三支, 见 BioTNT microRNA qPCR 引物试剂盒产品清单(120T); 目的基因清单可在 [biotnt](#) 网站上查询;

特异性茎环逆转录引物	浓度和体积见相应说明书	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
real time PCR 上游引物	浓度和体积见相应说明书	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
real time PCR 下游引物	浓度和体积见相应说明书	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)

PART D (内参引物试剂盒), 共三支, 见 BioTNT microRNA qPCR 引物试剂盒产品清单(120T); 内参基因清单可在 [biotnt](#) 网站上查询;

特异性茎环逆转录引物	浓度和体积见相应说明书	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
real time PCR 上游引物	浓度和体积见相应说明书	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)
real time PCR 下游引物	浓度和体积见相应说明书	1 支	-20 度(可以稳定至少一年)

Introduction (简介) 和 Methods (方法)

详细操作请参考 PDF 电子版的说明书;

注意: 本试剂盒用于成熟的 microRNA 的逆转录。提供的组分足够用于 120 次特异性 CDNA 的逆转录和 300 次 real time PCR 实验。

警告: 本产品仅供科研使用, 请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等其他用途。

安全提示: 本产品中部分试剂有腐蚀性或毒性, 请勿直接接触皮肤或吞咽; 操作时请穿戴实验服、防护镜和手套; 如果接触皮肤, 应立即用洗涤剂 and 大量清水冲洗; 误食或其他紧急情况, 请及时到医院就医; 部分试剂易燃, 请注意消防安全。

其他需要自己准备的: 见电子版

试剂盒使用注意事项:

1. 用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理, 并在高压灭菌后使用, 有些试剂不能高压灭菌时, 首先用经过灭菌器具、水等配制溶液后, 再将溶液进行过滤除菌处理;
2. RNA 样品要避免基因组 DNA 污染;
3. 避免多次反复冻融 RNA;
4. 试剂盒的各组成成分应在 -20°C 保存;
5. cDNA 产物应置于 -20°C 保存, 或者保存于 -80 度, 可以保存 6 个月。

预防 RNase 污染, 应注意以下几个方面:

1. 经常更换新手套, 以防止 RNase 污染;
2. 使用无 RNase 的塑料制品和枪头避免交叉污染;
3. RNA 在 Trizol 试剂中短时间内不会被 RNase 降解, 但提取后继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料或玻璃器皿 (玻璃器皿可在 150°C 烧烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟, 然后用 DEPC 水彻底清洗, 再灭菌, 即可去除 RNase);
4. 配制溶液应使用试剂盒提供的 RNase-free ddH₂O。

Assay Procedure (实验流程)

一、逆转录步骤 (PART A, 货号为 A2030A001(120T)):

1. RNA 样本准备:

在 0.5ml 微量离心管中 (无菌无 RNA 酶, 货号 A2010BOX04), 加入总 RNA 1 μg (简易方式: 如果不检测浓度值, 可以直接加入 1 ul RNA);

注: 总 RNA 中应含有小 RNA (small RNA); 总 RNA 的量应在 1ng-5ug 之间; 如果采用特殊的专门抽提小 RNA 的试剂盒, RNA 的量应在 0.1ng-1ug 之间;

自备	RNA	1ug (最多 2ul)
A2030A001-A5	补水	补到 5.9ul
总体积		5.9ul

备注: 不同的抽提方式中 RNA 抽提后的其他残余量是不一样的, 所以 RNA 上样量最多可以加到 5.9ul (满足 1ug 要求); 某些抽提方式不推荐上样量超过 2ul, 避免残余带来影响。

计算 1 种 RNA 要检测的 microRNA 数量, 根据数量进行配置 RNA 稀释液;

2. 配制逆转录反应体系总液体

货号	名称	10ul 体系
A2030A001-A1	5×逆转录 Buffer	2 μl
A2030A001-A4	dNTP mix	1 μl
A2030A001-A3	重组 RNA 酶抑制剂	0.2 μl

A2030A001-A2	高效逆转录酶	0.4 μ l
PART C 或 PARTD 提供	特异性茎环逆转录引物 (20 \times)	0.5 ul
	总体积	4.1ul

注：如果 n 份 RNA 要进行 microRNA 的逆转录；建议增加 10% 的余量，以便进行分装；1 种特异性茎环逆转录引物 (20 \times) 需要配一份逆转录反应体系；

举例，如果有 10 个样本要进行目的 microRNA 的逆转录和内参 U6B 的逆转录；建议各配 11 个人份；

3. 逆转录反应体系分装：每管分装量为 4.1ul；

4. 1 份逆转录反应体系 4.1ul 与 5.9ul 稀释过的 RNA，进行混匀，42 $^{\circ}$ C 反应 60min；95 度 5 分钟；

5. cDNA 产物如不马上进行 real time PCR 实验，应置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。或者保存于 -80 度，可以保存 6 个月。

二、real time PCR 实验 (PART B, 货号为(A2030A002X3) (20ul*300T) ,PART C, PART D)

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
PART C 和 PARTD 中提供	上游引物	稀释为 1*
PART C 和 PARTD 中提供	下游引物	稀释为 1*
A2030A001-A5	dd 水 (Rnase 和 Dnase free)	补足
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；如果提供的是 50* 的引物，则 20ul 体系中加入 0.4ul，以此类推；

2) 部分仪器，如 AB 的 7900 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；

3) 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；

4) 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 $^{\circ}$ C 5 分钟 → 95 $^{\circ}$ C 5s → 60 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 5 分钟 → 95 $^{\circ}$ C 5s → 60 $^{\circ}$ C 30s → 72 $^{\circ}$ 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℃ 5 分钟这一步骤必须保留；

附录 1. real time PCR 体系配制和加样

附录 2. 实验数据分析举例

附录 3. **Trouble shooting** 见电子版

品质保证：

所有产品由 Biotnt 进行品质保证。

如果客户使用中有任何问题，都可以联系 Biotnt 公司。

电话：4008801880 或 021 51692391 传真：021 51692391

技术服务专线：18116409458

Email: lab@biotnt.com

主页: www.biotnt.com

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 502 室 邮编:200237

