

天
净
沙
系
列

CAT#:931042-25
低温运输, -20℃保存

BINGENE

miRNA 染料法 qRT-PCR 试剂盒
(polyA 加尾法)

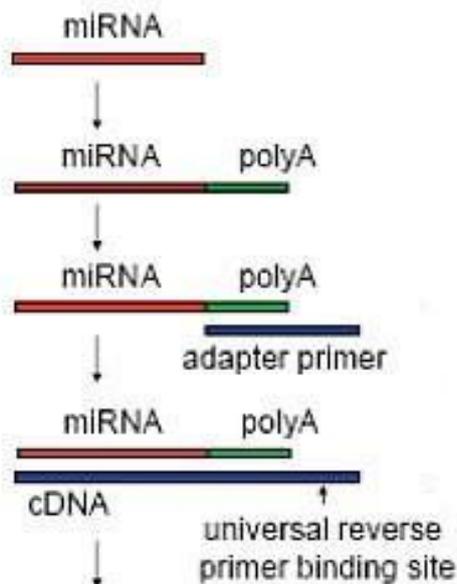
使用手册 V1.0

江苏天净沙基因诊断技术有限公司

网址: www.bingene.com; 电话: 400-6605850; 电邮: order@bingene.com

产品及特点

本试剂盒采用E.coli polyA聚合酶对miRNA加尾，然后用特异引物进行逆转录，最后用荧光定量PCR试剂盒进行定量检测，其原理示意图如下：



本产品具有下列特点：

1. 两步法（加尾-逆转录、染料法 qPCR），一步完成加尾-逆转录，然后检测多个 miRNA 靶分子。一次加尾-逆转录反应得到的 cDNA 可以做上百次 PCR。
2. 直接用总 RNA 为模板，不需要专门纯化 miRNA，简单快捷。
3. 检测灵敏度可以达到几百个分子/反应。
4. 能区分有 2-3 个碱基不同的 miRNA。
5. 既可以定性，也可以定量。定量时线性范围至少有 5 个数量级，但需要自备标准品。
6. 既可以用总 RNA 为模板，也可以用总 miRNA 为模板。
7. 用户需要自备 miRNA 专一性的一条 PCR 上游引物。
8. 本产品足够 25 次 20uL 体系的加尾和逆转录反应，100 次 20uL 体系的染料法 qPCR。
9. 本产品只能用于科研。

规格及成分	本产品使用十孔盒包装			
	成分	编号	规格	包装材料
	加尾和逆转录 Mix (含 dNTP 和 ATP)	931042a	150 μ L	0.5mL 绿盖管
	miRNA-polyA RT 引物	931042b	干粉	0.5mL 本色管
	E.coli polyA 聚合酶和 M-MLV 逆转录酶混合液	931042c	40 μ L	0.5mL 红盖管
	miRNA PCR 通用下游引物	931042d	干粉	0.5mL 黄色管
	2 \times SYBR PCR MasterMix	990408	1 mL	2.0mL 棕色管
	超纯水	980403	1 mL	2.0mL 蓝盖管
	使用手册	931042sc	1 份	无
	注意：上表的两个引物用前需要加入 30 μ L 的超纯水充分溶解混匀后才可使用。			
运输及保存	低温运输，-20 $^{\circ}$ C 保存，有效期一年。			
自备试剂	总 RNA、miRNA 专一性上游引物 (5pmol/ μ L in 水中)			
使用方法	<p>一、设计、合成和分析自备的 miRNA 专一性上游引物</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本试剂盒需要用户自行设计一条 miRNA 靶分子专一性的上游引物跟试剂盒提供的通用引物共同使用，用超纯水稀释到 5pmol/μL 待用。 2. miRNA 专一性上游引物的 T_m 值决定后续 PCR 的复性温度，非常重要，故必须准确。可以通过网上的在线分析软件（如 oligoanalyzer）计算 T_m，但最好实验测定，做法是将 100pmol miRNA 专一性上游引物和等量的互补引物（不是下游引物）在 20μL 的本试剂盒提供的 2\timesSYBR PCR MasterMix 反应体系中混合（参考第 9 步，只是不加模板，其他成分都加），直接进行溶解曲线分析，测出在本试剂盒提供的反应体系中的 T_m 值。当软件计算的 T_m 值和实验测试的 T_m 值有差异时，以后者为准。 3. miRNA 专一性上游引物最好在 3 端比 miRNA 短几个碱基。 4. 可以选择一个所研究物种的 5.8S rRNA 作为内参，设计一条 5.8S rRNA 专一性的引物，同时做平行实验。 <p>二、准备总 RNA</p> <ol style="list-style-type: none"> 5. 用自选方法和试剂纯化总 RNA，测定其浓度，最后用超纯水将其稀释到 100ng/μL。总 RNA 样品中残留的 DNA 污染由于并没有下游通用引物（miRNA-polyA RT 引物）的结合位点，所以一般不会干扰基于本方法的 miRNA PCR 检测。 			

三、加尾及逆转录反应

6. 按下表设置 RNA 加尾和逆转录反应，以 1 个样品为例：

加入组分	体积
自备的总 RNA, 100ng/ μ L	2.0 μ L
加尾和逆转录 Buffer (含 dNTP 和 ATP)	5.5 μ L
miRNA-polyA RT 引物	1.0 μ L
E.coli polyA 聚合酶和 M-MLV 逆转录酶混合液	1.5 μ L
合计	10 μ L

7. 37 $^{\circ}$ C 保温 1 小时。

8. 加入 190 μ L 超纯水使得总体积为 200 μ L (稀释 20 倍), 此样品将作为 cDNA 模板用于 PCR。未用完的 cDNA 20 倍稀释样品可以放 -20 $^{\circ}$ C 至少两年以上。

二、染料法 qPCR

9. 按下表设置染料法 qPCR 反应，最好每个反应设置 3 个重复：

加入组分	体积
2 \times SYBR PCR MasterMix	10 μ L
自备 Forward Primer, 5pmol/ μ L	1 μ L
miRNA PCR 通用下游引物, 5pmol/ μ L	1 μ L
第 8 步所得 miRNA cDNA 20 倍稀释液	1 μ L
超纯水	7 μ L

10. 建议反应程序设置如下：

循环	温度	时间
PCR 45 次	95 $^{\circ}$ C	15 秒
	(miRNA 特异 引物 T _m -5) $^{\circ}$ C	15 秒
	72 $^{\circ}$ C	20 秒
溶解曲线分析	根据 PCR 仪要求设定	

11. 分析溶解曲线分析所得 T_m (在 70-80 $^{\circ}$ C 之间一般表示扩增是特异的)，分析 Ct 值，分析标准曲线的斜率和 R² (如果用阳性对照做了标准曲线反应的话)。

关联产品

miRNA 纯化试剂盒