

## microRNA RT-RT PCR试剂盒染料法（茎环法不含引物）

### 使用说明书

#### 【货号 and 规格】

组分	A2010A0901PA	A2010A0901PA-2	A2010A0901PA-5	Storage
RT - PCR mix	0.5 ml /vial 1Vial	1ml /vial 1Vial	1.25ml /vial 2Vial	-20°C
酶 mix	0.5 ml /vial 1Vial	1ml /vial 1Vial	1.25ml /vial 2Vial	-20°C
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1.5 mL/vial 2 Vial	1.5 mL/vial 4 Vial	1.5 mL/vial 5 Vial	-20°C

#### 【前言】

本产品提供了一个灵敏、高效、快速地扩增并检测RNA的完整系统。microRNA RT-RT PCR试剂盒染料法（茎环法不含引物）包含所有 RT-PCR 所需的、并经优化的 Reaction Buffer、RT 酶混合物等，使用者只需加入适量的茎环引物，qPCR 上游引物和下游引物，和待检RNA样品，即可进行 One Step RT- PCR 检测。

本产品使用高效率 M-MLV 反转录酶和化学修饰的热启动 Taq DNA 聚合酶，为 RT-PCR 反应提供了更高的产量及灵敏度、特异性。本品添加的保护剂可以降低复杂茎环引物与上下游引物混在一起导致的非特异扩增，减少了特异的逆转录步骤，使用本品，RNA无需额外进行第一步逆转录，实验快速高效。

采用的UNG/dUTP系统为PCR防污染系统：本产品使用的UNG酶常温即可起作用，不需要设置专门的反应温度。

本品与biotnt 出品的microRNA茎环引物配套使用。引物应用HPLC或PAGE纯化。如果使用自己设计的茎环引物和上下游qPCR引物，需要优化浓度，以便得到更好的结果。

#### 【用户需要准备的其他物品】

1. 实验用水：使用DEPC处理的PCR用纯水。
2. 待检样品：总RNA，或者专门提取的microRNA；
3. RNase free & DNase free 的tip头，离心管，薄壁PCR管等；
4. 各种规格的移液器；
5. Real time PCR仪：本产品适用于下列Real time PCR仪：ABI PRISM®7700、7500、7300、7000、Q3, Q5, Q7, BIORAD iCycler、Roch Light Cycler 480 等Real time PCR仪上使用，具体使用方法请参照相应仪器的说明书。

#### 【反应液配制】

目的反应液组份	内参反应液组份	加量 (μl)	终浓度	备注
RT - PCR mix	RT - PCR mix	4	1X	
酶mix	酶mix	4	1X	
目的上游引物 (20X)	内参上游引物 (20X)	1	1X	
目的下游引物 (20X)	内参下游引物 (20X)	1	1X	
目的茎环引物 (20X)	内参茎环引物 (20X)	1	1X	
待检RNA	待检RNA	1-7		用户自备

#### 【RT-PCR 扩增检测】

- 1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

2 循环参数设定 (请参照各类仪器的操作说明进行设置)

操作步骤		反应条件	
		温度	时间
逆转录 ( 1 个循环 )		50°C	15 minutes
预变性 ( 1 个循环 )		95°C	5 minutes
40 个循环	变性	95°C	15 seconds
	退火	60°C	30 seconds
	延伸		
熔解曲线	变性	95°C	15 seconds
	退火	60°C	10 seconds
	变性	95°C	15 seconds

注：以上扩增条件为实例，用户应根据引物的  $T_m$  值及扩增片段的大小来确定适合的变性时间、退火温度，退火时间和循环次数，黑体字部分必须保留。

**【保存条件】**

本产品原则上在-20°C以下冷冻保存，避免反复冻融。如果在短期内需持续使用时，融解后可在4°C保存，最长可保存1周。

**【注意事项】**

1. 本产品为研究用试剂。请勿作为诊断、临床试剂用。
2. **为保证实验结果的准确性和可靠性，请注意以下事项：**
  - 1) 实验室应严格分区，避免 PCR 产物污染。
  - 2) 各组分使用前 2-8°C解冻，室温平衡十五分钟；
  - 3) 实验全过程严防 RNA 酶污染及 RNA 降解；使用已校准的移液器，选用进口一次性使用的 PCR 反应管、离心管、tip 头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含DNA 酶和RNA 酶。实验样品尽可能新鲜，提取过程应严防RNA 酶污染及操作不当导致的RNA 降解。
  - 4) 斜体字部分时间和温度很重要，不得更改；
  - 5) 建议使用 10 pg~100 ng 的 Total RNA 为模板；
  - 6) 本产品-15~-20°C保存 18 个月，2-8°C保存 1 周产品性能不受影响。
  - 7) 统一配液后分装以减少加样误差，每次实验应设置阴性对照。
  - 8) 禁止标记PCR 反应管，避免外源性荧光信号干扰。
  - 9) PCR 反应管中不能有气泡，否则会产生非特异的荧光信号。若有气泡，可先用手指将气泡弹破，然后再低速离心消除。
  - 10) 实时荧光PCR 仪器连续进行实验时，最好间隔一小时以上再使用。实时荧光PCR 仪需经常校正和清洁载样板板孔。

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0086 21 51692391 传真： 0086 21 51692391

Email: [sales@biotnt.com](mailto:sales@biotnt.com)

主页： [www.biotnt.com](http://www.biotnt.com)

