

microRNA qRT-PCR Sybgreen Detection Kit

升级版一步法

Cat. A2010A0901 120 Tests

Cat. A2010A0901S 60 Tests

Contents and Storage (组分及贮存) (-20°C 储存)

PART A, Cat. A2010A0901PA, microRNA RT-RT PCR 试剂盒染料法 (茎环法不含引物)	60T		120T	
RT - PCR mix	0.5 ml /vial	1Vial	1 ml /vial	1Vial
酶 mix	0.5 ml /vial	1Vial	1 ml /vial	1Vial
RNase-free ddH ₂ O	1.5 mL/vial	2 Vial	1.5 mL/vial	2Vial
PART B, BioTNT microRNA qPCR 引物	60T		120T	
茎环引物 (引物后缀为 h) (20X)	60 μL		120 μL	
上游引物 (引物后缀为 f) (20X)	60 μL		120 μL	
下游引物 (引物后缀为 r) (20X)	60 μL		120 μL	
PART C, BioTNT microRNA qPCR 内参引物 (赠送)	60T		120T	
茎环引物 (引物后缀为 h) (20X)	60 μL		120 μL	
上游引物 (引物后缀为 f) (20X)	60 μL		120 μL	
下游引物 (引物后缀为 r) (20X)	60 μL		120 μL	

Introduction (简介)

实验背景

microRNA, microRNAs (miRNAs) 是一种小的内源性非编码 RNA 分子, 大约由 21 - 25 个核苷酸组成。这些小的 miRNA 通常靶向一个或多个 mRNA, 通过翻译水平的抑制或断裂靶标 mRNAs 而调节基因的表达。成熟的 microRNA 的形成包含多个步骤。首先, microRNA 基因被转录成命名为 pri-microRNA 的初级转录物; 动物 pri-microRNA 的第一次剪切位于细胞核内, 产生大小为 70 个核苷酸左右并能形成茎-环结构的 microRNA 前体, 称为 pre-microRNA; 第二次剪切位于细胞质中, pre-microRNA 被剪切成 21-25 个核苷酸成熟的 microRNA。

试剂盒系统简介:

本试剂盒分为三部分, 均可以单独订购。本试剂盒用于成熟的 microRNA 的逆转录和 Real Time PCR 实验。A2010A0901PA PART A microRNA RT-RT PCR 试剂盒染料法 (不含引物) 可以单独订购。Cat.A2010A0901 试剂盒可以完成 120 个样本的目的 microRNA 和内参 RNU6 的逆转录和 qPCR 实验 (20ul 体系) 的单孔实验, 或者 10ul 体系 120 个样本的目的 microRNA 和内参的双重实验。如果要进行三重检测, 能检测的样本数量相应减少。Cat.A2010A0901S 试剂盒能检测的数量相应减少。

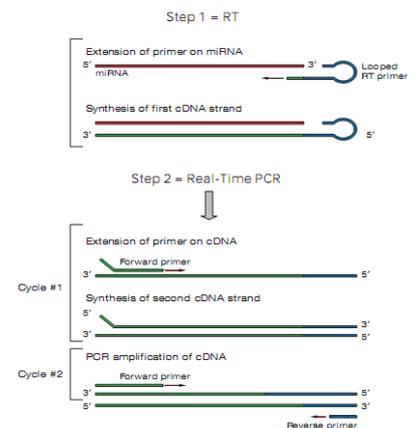
产品使用限制

1. 本产品只用于分子生物学研究。其不应用于诊断、预防和治疗疾病。在使用本产品时应遵从相应的注意事项；
2. 本产品中部分试剂有腐蚀性或毒性，勿直接接触皮肤或吞咽；
3. 操作时请穿戴实验服和手套，如接触皮肤，应立即用大量清水冲洗；
4. 误食或其他紧急情况，请及时到医院就治；
5. 部分试剂易燃，请注意消防安全。

实验原理

使用 BioTNT 茎环系统 microRNA Real Time PCR assay, 采用的是一步法 RT-PCR :

1. 原来的第一步逆转录：使用试剂盒中提供的特异性的茎环逆转录引物和 BioTNT 茎环系统逆转录试剂盒进行逆转录，得到 CDNA ；
2. 原来第二步 Real Time PCR ；
3. 升级版试剂盒采用了 microRNA 专用一步法 RT-qPCR mix (染料法) ，把两步合并为 1 步，仅需一次反应，就可以完成逆转录和 qPCR 实验，极大的降低了操作复杂程度，提高了试剂盒灵敏度。



Material & Methods (材料与amp;方法)

客户自备设备和试剂

1. 已制备的总 RNA 样本；
2. 0.6mL 及 1.5mL Eppendorf 管 (无菌、无酶、RNase-free ；货号 A2010BOX04) ；
3. RNase-free Tips (1000μL、200μL 的枪头；货号 A2010BOX09) ；
4. 移液器 (200μL ， 1000μL) ；
5. 恒温水浴锅或金属浴，冰浴盒；
6. 12000g 冷冻离心机；
7. Real Time PCR 仪；

操作说明

一、逆转录+real time PCR 步骤(PART A，货号为 A2010A0901PA)：

1. 提前将试剂盒中试剂及总 RNA 样本放置冰浴，温度平衡至冰点；
2. 震荡混匀所有试剂及总 RNA 样本并瞬时离心；
3. 按下表配置反应体系，震荡混匀；**提取好的总 RNA 加入 DEPC 水，按照 1 : 3 进行稀释**；稀释后的 RNA 作为待检 RNA 进行检测；按照下表配制两套；一套为 目的反应液，一套为内参反应液；

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	2-9		用户自备
DEPC H2O	DEPC H2O	补足		
总体积		20ul		

总 RNA 中应含有小 RNA (small RNA); 总 RNA 的量应在 0.1 至 5 μg 之间; 如果采用专门抽提小 RNA 的试剂盒得到小 RNA, 逆转录 RNA 的上样量应在 0.1 至 1 μg 之间。一般 RNA 上样量按照建议量 1ul, 如果结果不好, 最多可以上到 9ul;

操作合格的情况下, 总体积 20ul 可以缩量到 10ul 进行实验。

将配好体系的 PCR 反应管或 96 孔板放入 Real Time PCR 仪, 并按照下表设置 PCR 反应条件:

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

Thermofisher 仪器设置示例: 注意 (非常重要):

请在 Plate 选择界面, passive reference 选择 none; 一般机器会默认选择 ROX, 这样会导致输出信号错误;

重新选择 none, 然后重新分析数据, 可以得到正确的实验结果;

数据分析;

1. 请看目的基因和内参基因的扩增曲线和熔解曲线, 熔解曲线应该为 77-84 度的一个单峰曲线; 导出原始数据 CT 值;
2. 计算样本的 delta CT (同一样本的目的 microRNA 的 CT 值减去内参的 CT 值), 样本一般设置双重复或者三重; 重复样本的 CT 值先取均值; 再相减;
3. 该样本的含量为 $2^{-\text{delta CT}}$;

技术支持

有关技术支持和更多信息, 请浏览 www.biotnt.com 的网页或致电 BioTNT 的技术支持部门。