

**Two Step Stemaim-it miR qRT-PCR Quantitation Kit(Probe)****使用说明书**

| 目录号      | 规格    |
|----------|-------|
| LM-0101A | 100 次 |
| LM-0101B | 200 次 |

保存: -20℃避光

**【产品简介】**

本制品是采用 Taqman 探针进行 miRNAs qRT-PCR 的专用试剂。**Stemaim-it miR qRT-PCR miRNAs** 定量检测方法, 采用特异性的 Stem-loop RT adapter 与 miR PCR Primer 双重保证, 确保反应不受其前体及其他因素干扰, 序列高度同源的 miRNAs 也可精确区分。精确定量, 可对每个细胞所含的目标 miRNA 分子多少进行准确定量。检测灵敏度高, 样品消耗量少, 仅需 1-10ng 的 total RNA 或同等物。同时又具备超宽的定量线性范围, 从几个拷贝一直到几百万个拷贝, 定量线性范围跨越 7 个数量级。可实现对目标 miRNA 分子进行准确定量并具有很好的重复性。

**【试剂盒组成】**

## A. 反转录反应试剂:

| 试剂盒组成                         | LM-0101A(20μl×50 次) | LM-0101B(20μl×100 次) |
|-------------------------------|---------------------|----------------------|
| RT Master Mix(2×)             | 0.5ml×1 支           | 1ml×2 支              |
| RT Enzyme Mix                 | 50μl×1 支            | 100μl×1 支            |
| miR RT Primer                 | 100μl×1 支           | 100μl×1 支            |
| RNase Free ddH <sub>2</sub> O | 1ml×1 支             | 1ml×2 支              |
| 说明书                           | 1 份                 | 1 份                  |

## B. PCR 反应试剂:

| 试剂盒组成                         | 20μl×100 次 | 20μl×200 次 |
|-------------------------------|------------|------------|
| PCR Master Mix(2×)            | 1ml×1 支    | 1ml×2 支    |
| miR PCR Primer                | 100μl×1 支  | 200μl×1 支  |
| RNase Free ddH <sub>2</sub> O | 1ml 支      | 1ml×2 支    |
| 说明书                           | 1 份        | 1 份        |

**注意: ABI Prism7500, ABI Prism7500 Fast, MJ Research Chromo4, Corbett Rotor Gene 3000 机型, 添加 50X ROX Reference Dye 0.04μl/反应 (0.1X)。**

**ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One, ABI Step One Plus 机型, 添加 50x ROX Reference Dye 0.4μl/反应(1X)。**

**【自备实验器材】**

经高压灭菌 (121℃, 30 分钟) 处理的 0.5ml、1.5ml 离心管及 10 μl、200 μl 带滤芯吸嘴; 各种规格的加样枪; 高速离心机; 震荡仪; 水浴或干浴设备; 0.2ml PCR 反应管。

**【操作步骤】**

1. 完全融化模板, RT Master Mix(2×)、miR RT Primer、RT Enzyme Mix 等试剂融化, 离心后置于冰浴上。
2. 将 Synthetic miR Standard(1nM)溶化后, 进行离心, 并用 Standard Dilution 稀释 100 倍后, 作为阳性对照使用, 若需要做梯度标准曲线, 请用 Standard Dilution 进行梯度稀释(注意: Synthetic miR Standard 的浓度较高, 操作中易造成反应中的污染, 如果您不需要进行梯度实验, 请勿使用, 如果需要进行相关实验, 相关的实验操作单独在超净台中进行)。
3. PCR 试剂准备: 在冰浴条件下按下表配制反应液 (举例)

反转录反应:

| 反应成分              | 体积/反应 | 终浓度 |
|-------------------|-------|-----|
| RT Master Mix(2×) | 10μl  | 1×  |



|                               |                |      |
|-------------------------------|----------------|------|
| RT Enzyme Mix                 | 1 $\mu$ l      |      |
| miR RT Primer                 | 1 $\mu$ l      | 60nM |
| RNA 模板                        | 5-8 $\mu$ l    |      |
| RNase Free ddH <sub>2</sub> O | 补水至 20 $\mu$ l |      |
| 总体系                           | 20 $\mu$ l     |      |

循环参数设定: (请参照各类仪器的操作软件进行设置)

| 步骤      | 温度              | 时间   | 循环数 |
|---------|-----------------|------|-----|
| 1 退火    | 16 $^{\circ}$ C | 30分钟 | 1   |
| 2 反转录反应 | 42 $^{\circ}$ C | 45分钟 | 1   |
| 3 预变性   | 85 $^{\circ}$ C | 10分钟 | 1   |

将逆转录的 cDNA 取出 2 $\mu$ l 作为模板进行 PCR 反应

PCR 反应:

| 反应成分                          | 体积/反应          | 终浓度         |
|-------------------------------|----------------|-------------|
| PCR Master Mix(2 $\times$ )   | 15 $\mu$ l     | 1 $\times$  |
| PCR Enzyme Mix                | 1 $\mu$ l      |             |
| miR PCR primer                | 1 $\mu$ l      | 0.1 $\mu$ M |
| 模板 cDNA                       | 2 $\mu$ l      |             |
| RNase Free ddH <sub>2</sub> O | 补水至 30 $\mu$ l |             |
| 总体系                           | 30 $\mu$ l     |             |

PCR 反应循环参数设定: (请参照各类仪器的操作软件进行设置)

| 步骤                | 温度              | 时间  | 循环数 |
|-------------------|-----------------|-----|-----|
| 1 预变性             | 94 $^{\circ}$ C | 3分钟 | 1   |
| 2 变性<br>退火延伸及检测荧光 | 94 $^{\circ}$ C | 20秒 | 40  |
|                   | 60 $^{\circ}$ C | 40秒 |     |
| 步骤2中进行荧光检测FAM     |                 |     |     |

#### 【试剂运输及储存条件】

试剂盒运输可在2-8 $^{\circ}$ C环境下进行。储存时, 须置-20 $^{\circ}$ C保存。

#### 【有效期】

本试剂盒有效期为12个月, 请在有效期内使用。

注: 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。