



## U6 Endogenous Control Kit (Probe, Two Step PCR)

### 使用说明书

目录号	规格
LM-0106A	100 次
LM-0106B	200 次

#### 【产品简介】

本制品是采用 Taqman 探针法, 两步法检测 U6 snRNA, 应用于对样品中的 miRNA 进行相对定量分析。U6 snRNA, 也称为 U6 核内小 RNA, 它参与真核生物细胞核中 RNA 的加工, 参与信使 RNA 前体(pre-mRNA)的剪接, 使后者成为成熟 mRNA。U6 snRNA 管家基因定量检测试剂盒的设计包括两个反应阶段, 逆转录反应以及荧光定量 PCR 反应, 其结果可用于校正不同的样品间, 某一特异的 miRNA 相对于 U6 的表达比率。

**注意: ABI Prism7500, ABI Prism7500 Fast, MJ Research Chromo4, Corbett Rotor Gene 3000 机型, 添加 5xROX Reference Dye 0.4μl/反应。**

**ABI Prism7000/7300/7700/7900 , Eppendorf , ABI Step One, ABI Step One Plus 机型, 添加 50xROX Reference Dye 0.4μl/反应。**

#### 【试剂盒组成】

A. 反转录反应试剂:

试剂盒组成	20μl×50 次	20μl×100 次
RT Master Mix(2×)	50μl×1 支	1ml×1 支
RT Enzyme Mix	50μl×1 支	100μl×1 支
U6 RT Primer	50μl×1 支	100μl×1 支
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	1ml×1 支	1ml×2 支

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
U6 PCR Primer	100μl×1 支	200μl×1 支
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	1ml×1 支	1ml×2 支
Rox Reference Dye	50μl×1 支	100μl×1 支
说明书	1 份	1 份

#### 【操作步骤】

1. 完全融化模板, 将特异性引物、RT Master Mix、RT Enzyme Mix 等试剂融化后, 离心后置于冰上。
2. 若需要做梯度标准曲线, 请用 Standard Dilution 对 cDNA 进行梯度稀释 (**注意: 梯度实验的操作容易造成 PCR 反应的污染, 如果需要进行相关实验, 操作应在超净台中单独进行。**)
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	1μl	
U6 RT Primer	1μl	60nM
RNA 模板	5-8μl	
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	补水至 20μl	



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	42 $^{\circ}$ C	45分钟	1
2	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 $\times$ )	10 $\mu$ l	1 $\times$
U6 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 20 $\mu$ l	
总体系	20 $\mu$ l	

**注意:** ABI Prism7500, ABI Prism7500 Fast, MJ Research Chromo4, Corbett Rotor Gene 3000 机型, 需要添加 **5xROX Reference Dye 0.4 $\mu$ l/反应**。

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One, ABI Step One Plus 机型, 需要添加 **50XROX Reference Dye 0.4 $\mu$ l/反应**。

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	94 $^{\circ}$ C	3分钟	1
2	94 $^{\circ}$ C	15秒	40
	60 $^{\circ}$ C	40秒	
步骤2中进行荧光检测			

#### 【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。(含有ROX内参染料), 储存时, 须置-20 $^{\circ}$ C避光保存。

#### 【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。