

# microRNA qRT-PCR Sybgreen Detection Kit

Cat. A2010A0801

120 Tests

## Contents and Storage (组分及贮存)

PART A, Cat. A2030A001, microRNA 逆转录试剂盒 (茎环法) (120T)

A2030A001	120T	Storage
5×Reaction Buffer (含 Mg <sup>2+</sup> )	1 mL/vial 1 Vial	-20°C
M-MLV 酶 (200 Units/μL)	50 μL/vial 1 Vial	-20°C
Recombinant Rnasin (40 Units/μL)	35 μL/vial 1 Vial	-20°C
10mM dNTP mix	120 μL/vial 1 Vial	-20°C
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1.5 mL/vial 3 Vial	-20°C
说明书	1 份	

PART B, Cat. A2030A002, microRNA Realtime PCR PreMIX (染料法)

A2030A002	Amount	Storage
荧光定量 PCR PreMIX (染料法)	1 mL/vial 3 Vial	-20°C
说明书	1 份	

PART C, BioTNT microRNA qPCR 引物

	120T	Storage
特异性茎环逆转录引物	120 μL 10 μM	-20°C
Real Time PCR 上游引物	360 μL 5 μM	-20°C
Real Time PCR 下游引物	360 μL 5 μM	-20°C
说明书	1 份	

PART D, BioTNT microRNA qPCR 内参引物

	120T	Storage
特异性茎环逆转录引物	120 μL 10 μM	-20°C
Real Time PCR 上游引物	360 μL 5 μM	-20°C
Real Time PCR 下游引物	360 μL 5 μM	-20°C
说明书	1 份	

## 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。

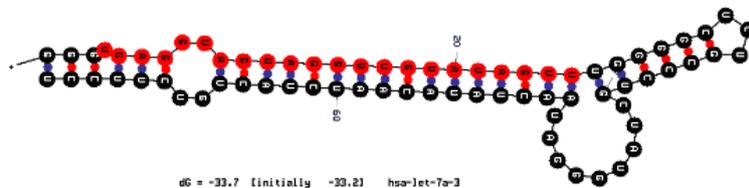


图 1, pre-microRNA 和 microRNA 示意图

### 试剂盒系统简介:

本试剂盒用于成熟的 microRNA 的逆转录。提供的组分足够用于 120 次特异性 cDNA 的逆转录和 300 次 Real Time PCR 实验。

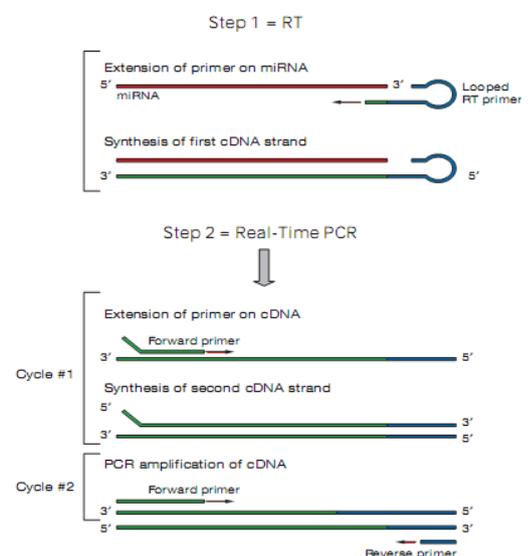
### 产品使用限制

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. 误食或其他危急情况, 请及时到医院就医;
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, 采用的是两步法 RT-PCR;

1. 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. 第二步 Real Time PCR: 请使用 microRNA Real Time PCR assay 提供的特异性引物, 以及 BioTNT 的 Real Time PCR 染料法 Premix;



## 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 A2010B0X04 );
3. RNase-free Tips ( 1000μL、200μL 的枪头 ; 货号 A2010B0X09 );
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、逆转录步骤(PART A , 货号为 A2030A001(120T)) :

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 RT 反应体系 , 震荡混匀 ;

下表为 1 份样本的量 , 如需要逆转录 n 份的 RNA , 请配置 n+1 份进行分装 :

反应液组分	10-μL 体系	Custom	终浓度
5×Reaction Buffer	2.0 μL	μL	1×
10mM dNTPmix	1.0 μL	μL	1.0 mM
Recombinant Rnasin ( 40 Units/μL )	0.2 μL	μL	0.8 Units/μL
M-MLV 酶 ( 200 Units/μL )	0.4 μL	μL	8 Units/μL
总 RNA 或者微小 RNA	1.0 μL	μL	*
特异性茎环逆转录引物 ( PART C 和 D )	1.0 μL	μL	1μM
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	4.4 μL	μL	—
共计	10 μL	μL	

\* 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。

4. 震荡混匀后瞬时离心 , 恒温金属浴中 42°C 反应 60 mins , 再 95°C 反应 5 mins ;
5. cDNA 产物应置于 -20°C 保存。

#### 二、Real Time PCR 实验 ( PART B , 货号为(A2030A002) )

1. 请按照下表准备 PCR 体系并加入 PCR 反应管或 96 孔板 , 各实验室也可参考自己的实验组分添加 :

反应液体系	20-μL 体系	50-μL 体系	Custom	终浓度
RNase-free Water	补足至 20μL	补足至 50μL	补足至 μL	—
荧光定量 PCR PreMIX (2X)	10μL	25μL	μL	1X
上游引物 ( 10μM ) ( PART C 和 D )	0.4μL	1μL	μL	0.2μM
下游引物 ( 10μM ) ( PART C 和 D )	0.4μL	1μL	μL	0.2μM
待检 DNA 样品	varies	varies	μL	*

\* 50-μL PCR 反应体系下推荐 , 0.5-500ng 基因组 DNA , 1pg-50ng 质粒或环状 DNA , 1-20ng cDNA

2. 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		两步法反应条件*		三步法反应条件**	
		温度	时间	温度	时间
预变性***		95°C	5 minutes	95°C	5 minutes
40 个循环	变性	95°C	5 seconds	95°C	5 seconds
	退火	60°C	30 seconds	55°C	20 seconds
	延伸			72°C	20 seconds
熔解曲线	变性	95°C	15 seconds	95°C	15 seconds
	退火	72°C ( 升温 0.3°C )	30 seconds	72°C ( 升温 0.3°C )	30 seconds
hold		4°C	hold	4°C	hold

\* 当引物 Tm 值 $\geq$ 60°C, 扩增产物 $<$ 300bp 时, 推荐两步法反应条件;

\*\* 当引物 Tm 值 $<$ 60°C, 扩增产物 $>$ 300bp 时, 推荐三步法反应条件;

\*\*\* 本 mix 采用的是化学法修饰的 hot start 酶, 该酶保证了 Real-Time PCR 实验的特异性, 并降低了实验操作难度 ( 反应液配制时不需要在冰上操作, 加样时间即使比较长, 非特异性反应很少 ), 必须有 95°C 5 分钟这一步, 否则会导致后面的反应不能进行, 没有信号检测出;



## 技术支持

BioTNT 为其所提供的技术支持质量和效率而自豪。我们的技术支持部门在样品及检测领域及对 BioTNT 产品具有丰富的实践经验和充足的理论知识。如果您 PCR 或其它产品有问题或遇到困难, 请联系我们, 无需迟疑。

BioTNT 客户是我们产品改进和特殊应用信息的主要来源。您所提供的信息对于 BioTNT 的研究人员很有帮助。

当您对产品性能或新的应用及新的技术有任何建议时, 我们希望您能及时联系我们。

有关技术支持和更多信息, 请浏览 [www.biotnt.com](http://www.biotnt.com) 的网页或致电 BioTNT 的技术支持部门。