



【使用注意事项】

- 1、反应液配制、分装请一定使用新的（无污染的）枪头、Microtube 等，尽量避免污染。
- 2、在操作中，应使用不含荧光物质的一次性手套(经常替换)、一次性薄壁进口 200 μ l PCR 管、移液器头(带滤嘴自卸式)，不能用手直接触摸 PCR 反应管。
- 3、操作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用 10%次氯酸钠及/或 70%乙醇擦拭消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后用紫外灯处理。
- 4、配反应体系若需标记，请在试管架或离心机管架上标记，不要直接标记在离心管上。
- 5、实验中涉及的有害有毒的标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置专门容器中。
- 6、配反应体系时，应注意移液器使用，所有液体都要缓慢加至管底，不要加至管壁，所有液体混匀要用振荡器进行，不能用移液器吹打，避免产生气泡。如产生气泡，请用手指将气泡弹破，再低速离心。体系配制完毕后低速离心数秒，立即进行 PCR 扩增。

【适用的荧光定量 PCR 仪】

ABI, MJ RESEARCH, BIORAD, STRATAGENE, Roche 的 480 仪器等各类 real time PCR 仪器；

【扩增条件】

以 ABI7300, 7500, 7900, stepone, plus 为例，Detector 设为 SYBR, QUENCHER 设为 NONE,

95℃ 5 分钟 → 95℃ 5 秒 → 60℃ 30 秒（读板） → 熔解曲线分析
40 个循环（可选）

电话：4008801880 或 0086 21 51692391 传真：0086 21 51692391

Email: lab@biotnt.com 主页：www.biotnt.com

微信公众平台：搜索“BioTNT”可加入

在线支持 QQ 群：47468567

联系地址：上海市闵行区罗锦路 98 号 2 号楼 5 楼 邮编:200237

版本号：20150004

microRNA 荧光定量检测试剂盒（加尾法）操作说明书

cat. A2030A202

cat. A2030A202X5

【产品简介】

本试剂盒中包含 microRNA 荧光定量检测的所有试剂，包括 2×microRNA premix 和 Reverse primer set。2×microRNA premix 是专门为 microRNA 检测而研发的新一代荧光定量检测试剂，该检测试剂采用 premix 预混系统，包含了优化配比的 dNTP、增强剂、稳定剂等，且其中的 DNA polymerase 采用的是新一代化学修饰法的热启动技术，保证高特异性和高灵敏度。

BioTNT 独创加尾法 Reverse primer set，为了让您的加尾法 QPCR 进行得更顺利，Biotnt microRNA 荧光定量检测试剂盒（加尾法）试剂盒中包括一系列的下游引物（退火温度覆盖 10 度），方便您优化整体的 QPCR 实验。

备注：请与 microRNA 逆转录试剂盒（加尾法）A2030A201 配套使用以达到最佳效果，若使用其它反转录试剂盒获得的 cDNA 进行检测，请咨询 BioTNT 客服。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	A2030A202 (20ul x100T)	A2030A202X5 (20ul x 500T)
2x microRNA Premix	1ml	5ml
Reverse Primer 1(10x)	200ul	1ml
Reverse Primer 2(10x)	200ul	1ml
Reverse Primer 3(10x)	200ul	1ml
Reverse Primer 4(10x)	200ul	1ml
说明书	1 份	1 份

【运输和储存】干冰或者蓝冰运输；-20 度避光保存。

【其他需要使用的仪器和耗材】

- 1. 仪器：混匀器，QPCR 仪，离心机；移液器（10 μL，200 μL，1000 μL）；冰盒；
- 2. 耗材：1.5mL Eppendorf 管（无菌、无酶、RNase-free；货号 MCT-150-C，Axygen）；Tips (RNase-free) (1000 μL、200 μL 的枪头；货号 T-1000-B, Axygen; T-200-Y, Axygen)；
- 3. PCR 水（进口无菌无酶管分装）：（E476）；或者无菌无酶的 dd 水；
- 4. 手套，口罩。

【需自备的试剂】

- 1. 分子生物学实验级别的水（无核酸酶无热源）
- 2. PCR 上游引物（Forward primer）：**microRNA 加尾法引物(验证)**或者自行设计：

Forward primer 设计原则：

- ✧ 遵循引物设计的最普遍原则；
- ✧ 以成熟的 microRNA 序列为基础，将 U 替换成 T，这是最基础的设计方法；
- ✧ 试剂盒中提供四支下游引物，TM 值从 58 度到 68 度，设计上游引物的 TM 值可以在 57 度到 69 度之间，根据 TM 值选择适配的下游引物。下游引物的 TM 值在标签上；不同的下游引物与您设计的上游引物进行配对，您可以通过预实验验证，寻找更合适的上游引物和下游引物，适配率高达 95%以上。
- ✧ 如果按照原则 2 的方式直接设计的引物其 TM 值过低，可以在引物的 5’端添加几个碱基（一般为 G 或者 C 碱基），也可以在 3’端添加 1 个或几个 A 碱基；或者 5’端和 3’端同时修饰；修饰后的引物请在整个 microRNA 序列中进行比对，以免非特异性增加；
- ✧ 如果按照原则 2 的方式直接设计的引物其 TM 值过高，可以在引物的 5’端和 3’端去掉几个碱基；
- ✧ 如果按照原则 2 的方式直接设计的引物存在自身发夹或者二聚体结构，可对 5’端进行个别碱基更换，使特异性提高；
- ✧ 原则 4 慎用，减少修饰。biotnt 提供下游引物 set，使得上游引物的设计更容易，更合理。

【反应液配制】

- 1. 冻结制品融解后请上下颠倒轻轻均匀混合，避免振荡器等剧烈搅拌。混匀制品后请用离心机轻微离心后使用。应在使用前应充分融化，混匀，离心数秒，使液体集中在离

心管底部。

- 2. 本制品使用前请于-20℃保存，融解后的制品请于冰上放置，使用后请立即保存于-20℃。试剂盒请在保质期内使用。
- 3. 请按照下表配制反应体系：

反应液组份	用于荧光 PCR 实验		
	加量（μl）	终浓度	备注
2x microRNA Premix	10	1×	试剂盒提供
Forward primer	–	0.2uM	另外准备
Reverse Primer（2uM）	2	0.2uM	试剂盒提供
microRNA 逆转录 CDNA	–	1~10ng	用户提供
PCR 水	–		用户提供
总体积	20		

以 20ul 反应体系反应体系为例，1ml premix 可以进行 100tests 的实验；

biotnt 提供了四支下游引物，TM 值覆盖 58 度到 69 度的范围，如果是您自行设计的引物，请根据上游 TM 值选择一到两个与之接近的下游引物，并进行实验比较；

- 1) Forward primer（客户自己设计合成）：

- 从生物公司拿到的引物干粉状，使用前先离心 3000rpm，让粉末沉至管底，用 PCR 水（无菌无酶的 dd 水）复溶至储存液 100pmol/ul；注：pmol/ul 等于 umol/L，即 uM；以合成 2OD 为例，如提供的 nmol 数=10，离心后向管中加入 100ul PCR 水，得到引物浓度为 100pmol/ul（uM），可以-20 度保存一年以上；
- 引物工作液：从储存液中吸取一部分，配成工作液；浓度推荐 2uM；也可采用各自的习惯浓度如 10uM；客户自己设计的引物，在本反应体系中，引物常规终浓度可设为 200nM。

- 2) Biotnt microRNA 加尾法引物(验证) 提供了 10×的引物工作液，方便客户的使用。

- 3) microRNA 逆转录的 CDNA 加入量不要超过 real time PCR 体积的 10%；如高浓度 cDNA 易导致非特异扩增，可对 cDNA 适当稀释（10 倍或者 100 倍）。