

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

保存: -20℃避光

**【产品简介】**

本制品是采用嵌合荧光法(SYBR® Green I)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。PCR Master Mix(2×)含有 PCR 反应的增强剂和优化剂以及稳定剂,浓度为 2×,同时添加了 ROX 内参染料,使结果更加准确可信。

**【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×1 支    | 1ml×2 支    |
| 说明书                           | 1 份        | 1 份        |

**【适用荧光 PCR 仪器】**

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

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

**【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     | 1μl   |      |
| miR RT Primer     | 1μl   | 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 $\times$ )   | 10 $\mu$ l     | 1 $\times$  |
| miR PCR primer                | 1 $\mu$ l      | 0.1 $\mu$ M |
| 模板 cDNA                       | 2 $\mu$ l      |             |
| ROX Reference Dye             | 0-0.4 $\mu$ 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 50xROX Reference Dye 0.04 $\mu$ l/反应。**

**ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One, ABI Step One Plus 机型, 需要添加 ROX 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 预变性      | 94 $^{\circ}$ C | 2分钟 | 1   |
| 2 变性       | 94 $^{\circ}$ C | 15秒 | 40  |
|            | 62 $^{\circ}$ 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。(试剂含有ROX内参染料), 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。