



U6 Endogenous Control Kit (SYBR Green, Two Step PCR)

使用说明书

目录号	规格
LM-0105A	100 次
LM-0105B	200 次

【产品简介】

本制品是采用嵌合荧光法 (SYBR[®] Green I), 同时, 还添加了 ROX 作为内参染料, 以使 Real Time PCR 的荧光达到最佳。试剂盒采用两步法检测 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 ₂ 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 ₂ 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 ₂ O	补水至 20μl	
总体系	20μl	

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 反转录反应	42℃	45分钟	1
2 预变性	85℃	10分钟	1

将逆转录的 cDNA 取出 2μl 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×)	10μl	1×
U6 PCR Primer	1μl	0.1μM
模板 cDNA	2μl	
RNase Free ddH ₂ O	补水至 20μl	
总体系	20μl	

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

ABI Prism7000/7300/7700/7900, Eppendorf, ABI Step One, ABI Step One Plus 机型, 需要添加 **50XROX Reference Dye 0.4μl/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℃	3分钟	1
2 变性 退火延伸及检测荧光	94℃	15秒	40
	62℃	40秒	
步骤2中进行荧光检测			

结果检测: 反应结束后取 10μl 反应产物, 琼脂糖凝胶电泳检测。

【试剂运输及储存条件】

试剂盒运输可在 2-8℃ 环境下进行。(含有 ROX 内参染料), 储存时, 须置 -20℃ 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。