

**Stemaim-it miR qRT-PCR Primer Set****使用说明书**

目录号	规格
LM-0107	1OD

保存: -20℃

【产品简介】

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, 结合 Custom Reverse Transcription Kit (LR-0102A/B 及 Real-Time PCR Kit (SYBR Green) (LK-0101A/B), 使结果更加准确可信, 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, 此引物也可以结合 One Step Real-Time PCR Kit (SYBR Green) (LK-0104A/B) 进行一步法的绝对定量检测。

【试剂盒组成】

试剂盒组成	
miR RT Primer	1OD
miR PCR F Primer	1OD
miR PCR R Primer	1OD
说明书	1份

注意: 引物稀释根据引物标签上提示, 加入适量的无核酸酶水溶解。

【操作步骤】**反转录反应:**

注意: 以下举例反转录反应体系为 20μl 反应体系, 若调整反应体系, 可相应比例的调整引物的用量。

反应成分	体积/反应	终浓度
RT Mix	10	1X
miR RT Primer (1μM)	1.2μl	60nM
RNA 模板	5-8μl	
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 退火	16℃	30分钟	1
2 反转录反应	42℃	45分钟	1
3 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 (20μl 反应体系)

PCR 反应:

注意: 以下举例 PCR 反应体系为 20μl 反应体系, 若调整反应体系, 可相应比例的调整引物的用量。

反应成分	体积/反应	终浓度
PCR Mix	10	1X
miR PCR F primer (20μM)	0.05-0.1μl	0.05-0.1μM
miR PCR R primer (20μM)	0.05-0.1μl	0.05-0.1μM
模板 cDNA	2μl	
ddH ₂ O	补水至 20μl	
总体系	20μl	



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	94℃	10秒	40
	退火 延伸及检测荧光	62℃	40秒	
步骤2中进行荧光检测				

结果检测: 反应结束后取 10 μ l 反应产物, 琼脂糖凝胶电泳检测。

【注意事项】

- 1.待检标本若不及时检测,应保存于-20℃。
- 2.实验相关耗材应用0.1%DEPC(焦碳酸二乙酯)水溶液在37℃处理12小时,并高压灭菌30分钟后使用。
- 3.试剂盒各组份使用前请充分融化并摇匀,离心管内的试剂需离心数秒后使用。
- 4.PCR操作各阶段应在不同实验区域进行,包括PCR扩增试剂准备区、标本处理区及PCR扩增检测区。
- 5.人的皮肤表面和唾液都有RNase,应穿工作服,戴一次性手套(经常替换手套),使用一次性用品。
- 6.PCR操作人员应具有经验和受过培训。
- 7.操作过程中用到的超净台、加样枪、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用10%次氯酸或70%乙醇及紫外灯处理。
- 8.实验中废弃的吸嘴应弃于含10%次氯酸的废液缸中,以防止污染。
- 9.试验后,扩增管切勿打开,并且将其丢弃在实验区以外区域。

【试剂运输及储存条件】

试剂盒运输可在常温环境下进行。储存时,须置-20℃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。