

Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 使用说明

RN: R11067.2

产品简介

Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR 是锐博生物自主研发的 miRNA 成熟链检测方法，该方法基于特异性的茎环状 RT 引物及正反向引物，并采用 SYBR Green 染料检测，无需荧光探针，具有高灵敏度和高特异性的优点。Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 包括该检测方法所需要的 RT 酶，qPCR 酶，客户仅需配合相应的 Bulge-Loop™ miRNA Primer set 及内参（如 U6，5S）即可进行高效检测。

Reagent (In tube)	C10211-1 (20T RT + 60T qPCR)	C10211-2 (100T RT + 300T qPCR)	C10211-3 (500T RT + 1500T qPCR)
RTase Mix	40 µl	200 µl	1 ml
5X Reverse Transcription Buffer	40 µl	200 µl	1 ml
2X SYBR Green Mix	600 µl	1 ml X 3	1 ml X 15

运输保存

产品需低温运输。收到产品后，请于-20℃保存，可以稳定保存一年。
使用前请瞬时离心。

实验方法

1. miRNA RT 反应

- 取 Bulge-Loop™ miRNA RT Primer (20 µM)，加入适量 RNase-free H₂O，配置成 Bulge-Loop™ miRNA RT Primer (5 µM)。
- 推荐以 10µl RT 反应体系进行实验：

Reagent	10 µl 体系	终浓度
RNA Template (1 µg)	x µl	
Bulge-Loop™ miRNA RT Primer (5 µM)	1 µl	500 nM
5X Reverse Transcription Buffer	2 µl	1X
RTase Mix	2 µl	
RNase-free H ₂ O	至 10 µl	

以上体系混匀后，瞬时离心，RT 反应程序为：42℃ 60 min，70℃ 10 min。

注：1) 最佳 RT 引物浓度依据具体实验而定，引物浓度范围可在 200nM~800nM 之间优化；

- RT 反应结束后请立即将 cDNA 产物取出，快速置于冰上冷却；
- 内参引物（U6，5S 等）的使用与 miRNA 的检测方法一致。

2. miRNA qPCR 反应

- SYBR Green Mix：包括 Taq 酶、dNTP mix、PCR Buffer、SYBR Green I 等。

推荐以 20µl qPCR 反应体系进行实验：

Reagent	20 µl 体系	终浓度
2X SYBR Green Mix	10 µl	1X

RT Product	2 μ l	
Bulge-Loop™ miRNA Forward Primer (5 μ M)	0.8 μ l	200 nM
Bulge-Loop™ Reverse Primer (5 μ M)	0.8 μ l	200 nM
ddH ₂ O	至 20 μ l	

注：1) 正反向引物初始反应浓度推荐使用 200nM，最佳浓度可以在 100nM~500nM 之间优化；

2) Bulge-Loop™ Reverse Primer 为通用引物，与 Bulge-Loop™ RT Primer 的特异序列相匹配，与 miRNA 无关。U6 或 5S 内参需选用各自特异的 U6 RT Primer 或 5S RT Primer。

3) 本试剂盒不含 ROX 染料，使用 ABI PRISM® 7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 等需额外添加 ROX 染料作为校正荧光的仪器，请用户自行准备所需的 ROX 染料。

2) 建议使用标准三步法进行检测，请在定量 PCR 仪（以 Bio-Rad CFX96 为例）上设定如下程序：

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95℃	10 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95℃	2 sec	PCR 模板变性
	退火	60℃	20 sec	退火
	延伸	70℃	10 sec	延伸

注：部分仪器如 ABI 系列仪器收集荧光信号需要较长的恒温时间方能收集信号，使用此类仪器请将反应程序更改为两步法，将退火及延伸反应合并，时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。

3) 对于用 SYBR Green I 染料法进行的 qPCR 的检测反应都需要在循环结束后立即进行融解曲线分析，检测温度为 70℃~95℃，升温速率为 0.5℃/次，恒温时间为 5 sec/次。