

Superbrilliant® miRNA 反转录试剂盒 (TaqMan 法 适用于血清血浆样本)**Superbrilliant® TaqMan miRNA Reverse Transcription
Kit(Serum/Plasma)****Cat. No.: ZS-M15003**

组分:

货号	名称	ZS-M15003S (25T×25µl)	ZS-M15003M (50T×25µl)	ZS-M15003L (250T×25µl)
103043	5×TaqMan miRNA RT SolutionA	62.5 µl	125 µl	625 µl
103044	10×TaqMan miRNA RT SolutionB	62.5 µl	125 µl	625 µl
103047	10×血清血浆 TaqMan miRNA RT Primer	62.5 µl	125 µl	625 µl
103006	RNase Free H ₂ O	500 µl	1 ml	1 ml×5

储存: 请置于-20°C, 可保存 2 年; 避免反复冻融。

简介: Superbrilliant™ miRNA 反转录试剂盒 (TaqMan 法适用于血清血浆样本) 专用于血清血浆 miRNAs 分子的反转录试验 (不可用于组织和细胞), 转录获得的 cDNA 产物用于 TaqMan 定量 PCR 方法检测 miRNAs 分子 (仅适用 Superbrilliant™ TaqMan miRNA 定量 PCR 预混液, 货号: ZS-M15002, 配合 Supersmart™ TaqMan miRNA 定量 PCR 探针使用, 货号: ZS-MT-XXXXX 使用)。

Superbrilliant™ miRNA 反转录试剂盒 (TaqMan 法适用于血清血浆样本) 采用加 A 法进行反转录, 加 A 法的反转录效率远高于茎环法, 因此, 采用该方法可极大的提高检测灵敏度 (原理见图 1)。该试剂盒操作简单, 仅需要两步即可轻松完成 miRNA 的 cDNA 合成, 合成的 cDNA 可用于所有 miRNA 的后续定量检测。反转录完毕后采用特异性的上游引物和接头引物进行 PCR 扩增, FAM 标记 TaqMan 探针作为荧光报告基因进行定量检测 (原理见图 1)。

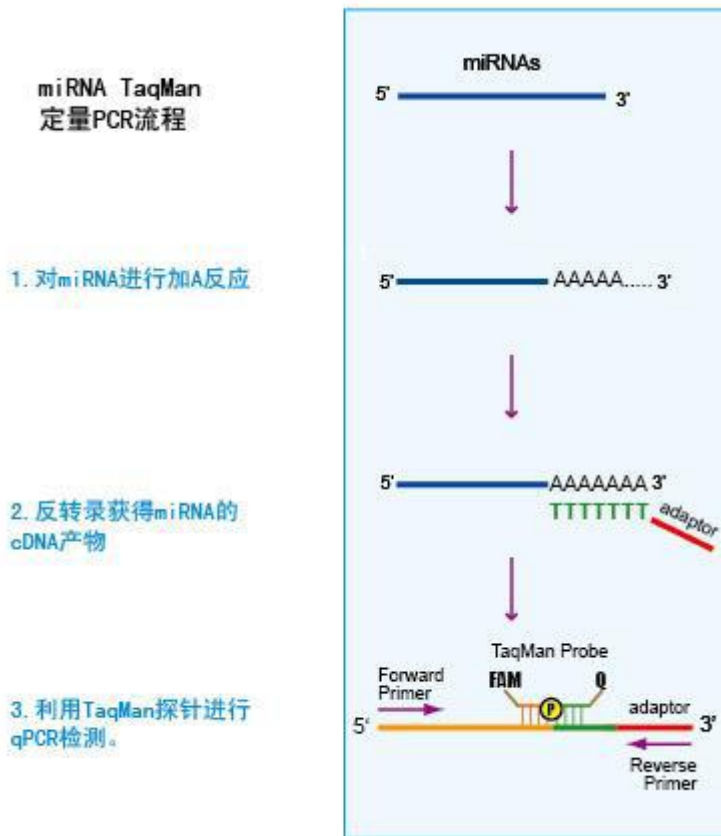


图 1, Superbrilliant™ TaqMan miRNA 定量检测原理

操作方法

1 按以下组分在 0.2ml EP 管中配制反应液

血清血浆 miRNA	10μl
------------	------

5×TaqMan miRNA RT Solution A	2.5μl
------------------------------	-------

2 在 PCR 仪上按以下条件进行加 A 反应:

37°C	30min
------	-------

85°C	5min
------	------

3 反应完毕后,在上述 12.5 μ l 反应体系中加入如下试剂,并混合均匀。

10 \times 血清血浆 TaqMan miRNA RT Primer	2.5 μ l
---	-------------

10 \times TaqMan miRNA RT Solution B	2.5 μ l
--	-------------

RNase Free H ₂ O	7.5 μ l
-----------------------------	-------------

4 在 PCR 仪上按以下条件进行反转录反应:

30 $^{\circ}$ C	5min
-----------------	------

55 $^{\circ}$ C	60min
-----------------	-------

95 $^{\circ}$ C	5min
-----------------	------

获得的 cDNA 产物可用于多个目标 miRNA 的检测。通常取 2 μ l 即可用于

Superbrilliant[™] TaqMan miRNA 定量 PCR 预混液检测(货号: ZS-M15002, 配合 Supersmart[™] TaqMan miRNA 定量 PCR 探针使用, 货号: ZS-MT-XXXXX 使用, 该探针有一万余种, 详细列表可查询 Superbrilliant[™] TaqMan miRNA qPCR kit.xls)。

5 利用 Superbrilliant[™] TaqMan miRNA 定量 PCR 试剂盒对上述 miRNA cDNA 产物进行 RealTime PCR 检测

内参基因可选择使用: Superbrilliant[™] TaqMan hsa-miR-16 定量 PCR 试剂盒(适用于全血样本)(货号: ZS-MT-miR-16); Superbrilliant[™] TaqMan cel-miR-39 定量 PCR 探针(适用于全血样本)(货号: ZS-MT-cel-miR-39)。

(1) 配制反应体系

按照如下组分配制 20 μ l PCR 反应体系:

5 \times OLD TaqMan qPCR Mix	4 μ l
20 \times miRNA TaqMan Assay	1 μ l
cDNA 模板	2 μ l
ddH ₂ O	13 μ l

(2) 进行 Real-Time PCR 反应

通常采用两步法, 程序如下:

Stage 1:	95 $^{\circ}$ C	15min	
Stage 2:	95 $^{\circ}$ C	10s	
	60 $^{\circ}$ C	60s	40cycles

(收集信号采用 FAM 染料通道)

反应结束后确认 Real-Time PCR 的 cDNA 样品和 NTC 阴性对照的扩增曲线 (hsa-miR16)。