

Superbrilliant[®] miRNA 反转录试剂盒 (TaqMan 法)**Superbrilliant[®] TaqMan miRNA Reverse Transcription Kit****Cat. No.: ZS-M15004**

组分:

货号	名称	ZS-M15004S (25T×20μl)	ZS-M15004M (50T×20μl)	ZS-M15004L (250T×20μl)
103043	5×TaqMan miRNA RT Solution A	25μl	50μl	250μl
103044	10×TaqMan miRNA RT Solution B	50μl	100μl	500μl
103045	10×TaqMan miRNA RT Primer	50μl	100μl	500μl
103006	RNase Free H ₂ O	500μl	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) 专用于 miRNAs 分子的反转录试验, 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) 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团进行定量检测 (原理见图 1)。

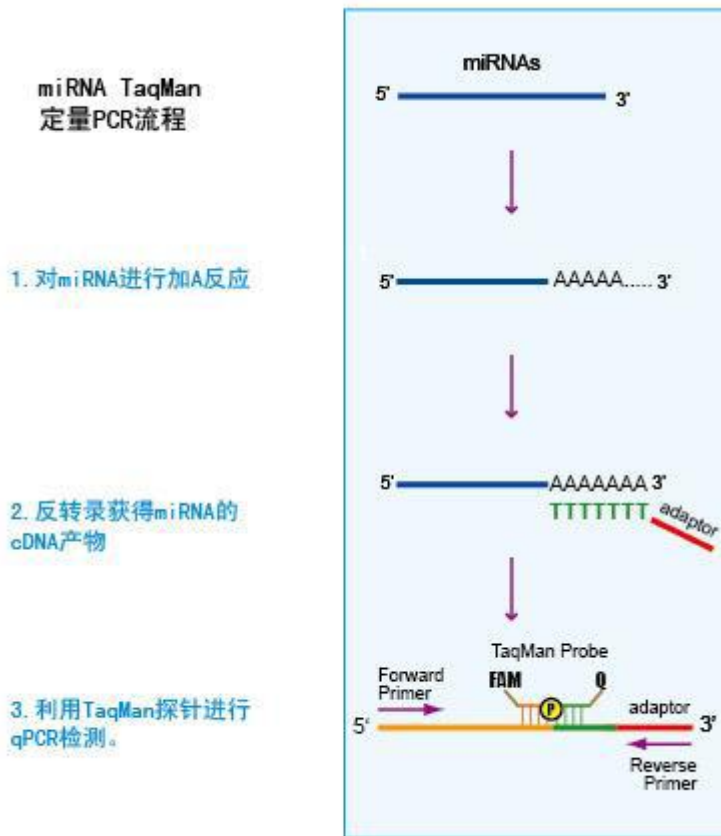


图 1, Superbrilliant™ TaqMan miRNAs 定量检测原理

操作方法

1 按以下组分在 0.2ml EP 管中配制反应液

miRNA (5~100 ng/μl)	4μl
---------------------	-----

5×TaqMan miRNA RT Solution A	1μl
------------------------------	-----

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 5 μ l 反应体系中加入如下试剂，并混合均匀。

10 \times TaqMan miRNA RT Primer	2 μ l
------------------------------------	-----------

10 \times TaqMan miRNA RT Solution B	2 μ l
--	-----------

RNase Free H ₂ O	11 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。反转录完毕后获得的 miRNA cDNA, 可加入 20~80 μ l ddH₂O 稀释 2~5 倍, 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 RNU6B 定量 PCR 探针(货号: ZS-MT-RNU6B)适用于人、鼠等哺乳动物组织、细胞样品; Superbrilliant[™] TaqMan hsa-miR-16 定量 PCR 探针(货号: ZS-MT-miR-16)适用于来源于人、鼠全血样品。

(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	1~2.5 μ l
ddH ₂ O	Up to 20 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)。