

Hairpin-it™ miRNAs and U6

One-step qRT-PCR SYBR Green Kit



GenePharma

E22016—E22020

Version 2108

产品简介

本产品是吉玛推出的基于茎环法的 microRNAs One-step qRT-PCR 试剂盒，在特异性检测目标 microRNA 的同时提供 U6 做内参，方便客户进行相对定量分析。采用 SYBR Green I 嵌合荧光法，其包含已优化浓度的 RT 酶，Taq 酶，缓冲液，RT 引物，qPCR 引物，SYBR 荧光染料。使用一种茎环结构的特异性逆转录引物，逆转录和 qPCR 反应在一管内完成，不需要额外的开管/移液操作，大大提高了检测效率，并降低了污染的风险。

产品组分

染料法 qRT-PCR	50 rxns	100 rxns	200 rxns	500 rxns
2× One-Step SYBR Mix	2× 500 µl	2× 1 ml	4× 1 ml	10× 1 ml
Enzyme Mix	2× 25 µl	2× 50 µl	2× 100 µl	2× 250 µl
miRNA RT primer (2 µM)	25 µl	50 µl	100 µl	250 µl
miRNA Hairpin-primer Set (5 µM)	20 µl	40 µl	80 µl	200 µl
U6 Hairpin-primer Set (5 µM)	20 µl	40 µl	80 µl	200 µl
ROX Reference Dye ¹	40 µl /200 µl	80 µl /400 µl	160 µl/800 µl	400 µl/2×1 ml
RNase free H ₂ O	2× 1 ml	2× 1 ml	2× 1 ml	4× 1 ml
Synthetic miRNA mimics standard	1 pmol	1 pmol	1 pmol	1 pmol

1. ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，需要使用低浓度 ROX Reference Dye 校正的仪器有 Applied Biosystems 7000/7300/7500 Fast/7900 Real-Time PCR System，需要使用高浓度 ROX Reference Dye 校正的仪器有 Applied Biosystems Step One Plus Real-Time PCR System，其他品牌仪器不需要 ROX 校准，ROX Reference Dye 需要避光保存。

运输保存

产品需低温运输，收到产品后，请于-30~-15℃保存（ROX Reference Dye，2× One-Step SYBR Mix 需避光保存，如果需要可将 Mix 等试剂分装成小份，避免试剂反复冻融）。

实验准备

1) 耗材准备

无 RNase、DNase 的吸头，离心管，8 联管或 96 孔板；RNA 酶抑制剂（RNase inhibitor）等。

2) miRNA mimics 稀释

吉玛提供的 miRNA 标准品是 1 pmol 干粉的贮存形式，可参照以下步骤进行稀释：

将干粉标准品离心管于 10000g 离心 1min，加入 100 µl RNase free H₂O，即得到 10 nM 标准品母液，然后 10 倍梯度稀释至 0.1 nM、10 pM、1 pM 共 4 个梯度标准品，可进行样品绝对定量检测；0.1 nM 标准品也可以作为质控品，对试剂盒进行质量控制，标准品溶液请于-80℃保存。

实验流程

1) One Step qRT-PCR 体系配置

确保 2× One-Step SYBR Mix、ROX Reference Dye、引物完全溶解，建议客户在使用前混匀并低速离心。

20 µl 反应体系（建议置于冰上进行反应液配制，避免剧烈涡旋振荡）

Component	1 rxns
2× One-Step SYBR Mix	10 µl
Enzyme Mix	0.5 µl
RT primer (2 µM) *	0.5 µl
Hairpin-primer set (5 µM)	0.4 µl
ROX Reference Dye	0.4 µl/2 µl
RNase Inhibitor	
RNA	1 pg - 1 µg
RNase Free H ₂ O	To 20 µl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

***U6 的这条引物用 RNase Free H₂O 代替。**

▲RT 引物初始反应浓度推荐使用 50 nM，最佳浓度可以在 25 ~ 200 nM 之间优化。

▲引物初始反应浓度推荐使用 200 nM，最佳浓度可以在 100 ~ 500 nM 之间优化。

▲RNase Inhibitor 为非必需试剂，若添加，请客户自备，参照相应说明书进行。

2) One Step qRT-PCR 反应程序

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
逆转录反应	1×	42°C	40 min	
PCR反应	1×	94°C	3 min	
	40×	94°C	12 sec	
		62°C	30 sec	
		72°C	30 sec	采集
		95°C	15 sec	
融解曲线	1×	60°C	1 min	
		95°C	15 sec	采集（仪器默认）

仪器类型不同，融解曲线曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认融解曲线采集程序即可。

联系我们

上海吉玛制药技术有限公司

地址：上海浦东新区张江路 368 号 2 号楼

电话：021-51320195 传真：021-51320295

E-mail: support@genepharma.com

苏州吉玛基因股份有限公司

地址：苏州工业园区生物纳米科技园东平街 199 号

电话：0512-86668828 传真：0512-86665900

E-mail: szsupport@genepharma.com

网 址: www.genepharma.com



B051-V001D-20210906