组成和储存

注：rxns 表示 PCR 反应次数。

Reagent (in tube)	MQP-0101 (100rxns)	MQP-0102 (200rxns)	MQP-0105 (500rxns)	MQP-0110 (1000rxns)	Storage
Bulge-Loop™ RT Primer	1 nmol	1 nmol	1 nmol	1 nmol	-20℃
Bulge-Loop™ Forward Primer	1nmol	2 nmol	5 nmol	10 nmol	
Bulge-Loop™ Reverse Primer	1nmol	2 nmol	5 nmol	10 nmol	

为了校准实验样品之间相对定量检测，建议使用锐博生物提供的 U6 snRNA (MQP-0201)、5S rRNA (MQP-0301)、U1 snRNA (MQP-0401) 、7SL RNA (MQP-0501)作为内参，或定制化学合成的 miRNA 标准品(MQP-0412)进行绝对定量检测参照。注：*U6 snRNA*、*5S rRNA*、*U1 snRNA*、*7SL RNA* *的使用量请参照* *Bulge-Loop™ miRNA Primer*。

使用方法：

引物稀释

引物形态为冻干粉形式，室温运输，-20℃以下保存，每 1nmol 引物加入 200μl 去离子水，涡旋振荡以充分溶解，瞬时离心，配置成终浓度为 5μM 引物工作液。为避免反复冻融，请取出部分进行实验，剩余引物工作液请于-20℃贮存。

miRNA qRT-PCR

请参考常规 qRT-PCR 反应步骤进行实验，以下步骤仅供参考。

1) miRNA RT 反应

1、取 5μM RT 引物工作液 1 μl，加入 79 μl 去离子水，配置成 62.5 nM RT 引物工作液。

2、推荐采用 50μl RT 反应体系，

Reagent	25 μl 体系	50 μl 体系	终浓度
RNA template (2μg)	x μl	x μl	
RT 引物工作液 (62.5 nM)	2 μl	4 μl	5 nM
ddH_2O	至 11 μl	至 19 μl	

以上体系混匀后，请瞬时离心，70℃放置 10 分钟，冰育 2 分钟，再加入以下试剂进行 RT 反应，标准的 RT 反应程序：42℃ 60 min，70℃ 10 min。

Reagent	25 μl 体系	50 μl 体系	终浓度
RT buffer 5X	5 μl	10 μl	1X
dNTP mix (2.5mM)	2 μl	4 μl	0.2 mM
RNase inhibitor (40U/μL)	0.5 μl	1 μl	
RT 酶 (200U/μL)	0.5 μl	1 μl	
ddH_2O	至 25 μl	至 50 μl	

注：*除 42℃反应外，对于 RT 反应没有特殊的要求，具体的信息请您参阅所使用的 RT 试剂的操作说明。RT 反应结束后请立即将* ***cDNA*** *产物取出，快速置冰上冷却，后续所有步骤都在冰上进行，请不要将* ***cDNA*** *产物随便从冰上移走。*

2) miRNA qPCR 反应

1、**SYBR Green Mix**：包括 Taq 酶、dNTP mix、PCR Buffer、SYBR GreenⅠ。

下表提供了 Bulge-Loop™ qRT-PCR 的反应体系：

Reagent	20 μl 体系	50 μl 体系	终浓度
SYBR Green Mix	9 μl	22.5 μl	1X
RT product	2 μl	2 μl	
Bulge-Loop™ miRNA Forward Primer (5 μM)	2 μl	5 μl	500 nM
Bulge-Loop™ miRNA Reverse Primer (5 μM)	2 μl	5 μl	500 nM
RNase-free H_2O	至 20 μl	至 50 μl	

2、建议使用标准的三步法进行检测，请您在定量 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℃	20 sec	起始模板变性
40 X	变性	95℃	10 sec	PCR 模板变性
	退火	60℃	20 sec	退火
	延伸	70℃	1-10 sec	延伸

3、对于用 SYBR GreenⅠ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 0.4℃/次，恒温时间为 1 sec/次。