

miScript PCR 系统操作手册

试剂盒成分:

miScript Reverse Transcription Kit

miScript Reverse Transcription Kit	(10)	(50)
Catalog no.	218060	218061
Number of standard reactions*	10	50
miScript Reverse Transcriptase Mix	10 μ l	50 μ l
5x miScript RT Buffer [†]	40 μ l	200 μ l
RNase-Free Water	1.9 ml	1.9 ml

miScript Primer Assays

miScript Primer Assay	(100)
Catalog no.	Varies[‡]
Number of 50 μl reactions	100
10x miScript Primer Assay (contains one miRNA-specific primer) [§]	1 vial

miScript SYBR® Green PCR Kit

miScript SYBR Green PCR Kit	(200)	(1000)
Catalog no.	218073	218075
Number of 50 μl reactions	200	1000
2x QuantiTect® SYBR Green PCR Master Mix, containing:	3 x 1.7 ml	25 ml
<ul style="list-style-type: none"> ■ HotStarTaq® DNA Polymerase ■ QuantiTect SYBR Green PCR Buffer ■ dNTP mix, including dUTP ■ SYBR Green I ■ ROX passive reference dye ■ 5 mM MgCl₂ 		
10x miScript Universal Primer	1 ml	5 x 1 ml
RNase-Free Water	2 x 2 ml	20 ml
Handbook	1	1

10x miScript Primer Assay 和 10x miScript Precursor Assay 是干粉状的，需要稀释。首先短暂离心小管，然后参加 550 μ l TE, pH 8.0, 最终在漩涡震荡仪上 4-6 次。为了保持引物的活性，在冷冻条件下将稀释的引物分装成小管。

试验步骤：反转录反响

- 1、 在冰上溶化RNA，室温下 (15 - 25°C) 溶化5x miScript RT Buffer 和 RNasefree water 。

先轻弹每个小管使其充分混匀，然后短暂离心以收集管壁和管盖上的液体，最终放置在冰上。

- 2、 在冰上配制reverse-transcription master mix 。

Component	Volume/reaction
miScript RT Buffer, 5x*	4 μ l
RNase-free water	Variable
miScript Reverse Transcriptase Mix	1 μ l
Template RNA	Variable (up to 1 μ g)
Total volume	20 μl

配好后混合并放置在冰上。假设miScript Reverse Transcriptase Mix是从-20°C 冰箱拿出来的话，那么在使用完毕后马上放入冰箱。

假设要配制屡次反响，先在一个大管中预备Mix，并且多配制10%。

- 3、 将miScript Reverse Transcriptase Mix分装到每个小管中，然后参加RNA。

- 4、 在37°C下孵育60分钟

- 5、 在95°C下孵育5分钟以灭活miScript Reverse Transcriptase Mix

- 6、 假设马上进展PCR，讲产物放置在冰上；假设不马上做PCR，那么将反转录产物放置在-20°C

试验步骤：Real-Time PCR检测miRNA或非coding RNA

- 1、 溶化2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10x miScript