



InRcute IncRNA荧光定量 检测试剂盒(SYBR Green) (FP402) 操作指南

天根生化科技（北京）有限公司

版本号：20170927

WWW.TIANGEN.COM

实验准备

1. cDNA 样本
2. 移液器及配套枪头 (RNase-free)
3. 1.5 ml 离心管 (RNase-free) , 200 μ l PCR管 (RNase-free)
4. 涡旋振荡器, 台式离心机, 金属浴/ PCR仪



Step 1



融解2×InR IncRNA Premix (如果保存在-20°C)，ROX Reference Dye，模板，引物和RNase-Free ddH₂O，并将所有试剂在室温下溶解并彻底混匀。

使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

Step 2

在冰上进行Real Time PCR反应液的配制

组成成分	50 μ l 体系	25 μ l 体系	20 μ l 体系	终浓度
2 \times InR IncRNA Premix	25 μ l	12.5 μ l	10 μ l	1 \times
正向引物(10 μ M)	1.25 μ l	0.625 μ l	0.5 μ l	0.25 μ M
反向引物(10 μ M)	1.25 μ l	0.625 μ l	0.5 μ l	0.25 μ M
cDNA模板	—	—	—	-ng-pg
50 \times ROX Reference Dye	—	—	—	—
RNase-free ddH ₂ O	至50 μ l	至25 μ l	至20 μ l	—



Tips

1. 配制定量混合液时，应首先确定所需的反应数量，然后在反应数量的基础上增加10%-20%，计算体系配制数量。例如，一共需要做5个定量反应时，则体系配制数量至少为6；一共需要做10个定量反应时，则体系配制数量至少为11；一共需要做20个定量反应时，体系配制数量至少为22。以此类推。
2. 按配制数量，先计算除cDNA模板和水之外的组分所需的用量，在冰上将所有组分共同配制到同一管中制成混合物，彻底混匀，短暂离心。
3. 计算每个样本所需加入的cDNA模板的体积和所需补充的ddH₂O的体积。如果每个样本所需的ddH₂O体积都相同，可计算总体所需的ddH₂O体积并加入到混合物中，彻底混匀。

试剂	1个20 μl体系 使用量	6个20 μl体系 使用量	11个20 μl体系 使用量	22个20 μl体系 使用量
2×InR IncRNA Premix	10 μl	60 μl	110 μl	220 μl
正向引物(10 μM)	0.5 μl	3 μl	5.5 μl	11 μl
反向引物(10 μM)	0.5 μl	3 μl	5.5 μl	11 μl
50×ROX Reference Dye	根据实际情况计算加入			
RNase-free ddH ₂ O	根据实际情况计算加入			

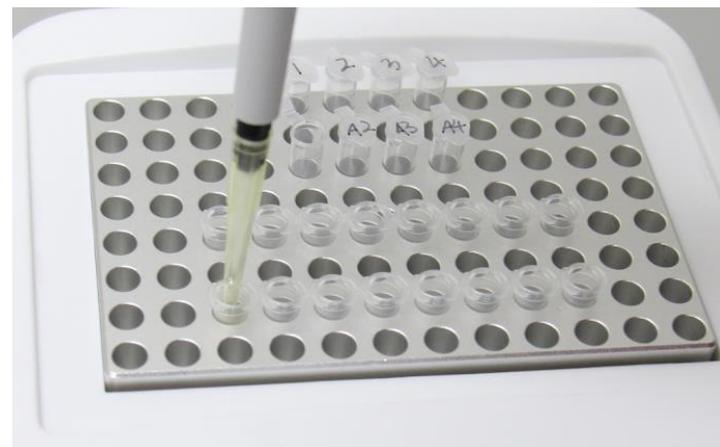
4. 将混合物分装至每个检测管/孔中，按混合物→cDNA→ddH₂O（如果需要）的顺序加样，配制体系，彻底混匀。

Tips

使用预混Mix再分装的方法可以有效提高实验的重复性。配制和分装时请在冰上操作。

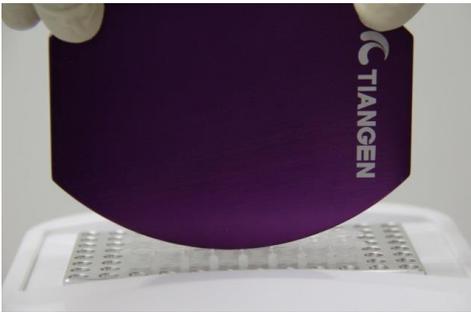
引物终浓度为0.25 μM 可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度。需要进一步优化引物浓度的，可以在0.2-0.5 μM 范围内调整。

几种常见仪器的最适ROX Reference Dye浓度见下表：



仪器	终浓度
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT/StepOne等	5 \times （例如：5 μl ROX/50 μl 体系）
ABI 7500、7500 Fast、ViiA 7； Stratagene Mx3000P、Mx3005P和Mx4000等	1 \times （例如：1 μl ROX/50 μl 体系）
Roche仪器，Bio-Rad仪器，Eppendorf仪器等	无需添加

Step 3



使用八连排管时，体系配制分装完毕后，改好管盖，用压盖器压实。在管盖两端做好标记，不要标记在检测孔正上方的管盖上，以免影响荧光读数。

使用96孔板时，体系配制分装完毕后，使用封口膜封板，压实，在孔板四周或未加样的检测孔出标记。

Step 4



使用微孔板离心机短暂离心96孔板或八连排管。注意管底朝向外侧，注意配平。
离心八连排管时，将八连排管置于管架上，用固定片固定后进行离心。

Step 5



阶段	循环	温度	时间	内容	荧光信号采集
预变性	1×	95°C	3 min	预变性	否
PCR反应	40×	95°C	5 sec	变性	否
		60°C	15 sec	退火/延伸	是
熔解曲线分析(Melting/Dissociation Curve Stage)					

将样本转移至荧光定量PCR仪，编好程序，开始qPCR反应。