

## RobustDye™ miRNA Assay Kit

（货号: N116, N117）

### 产品简介:

RobustDye™ miRNA Assay Kit 是一款简便、灵敏、准确的，专门用于 miRNA 的检测试剂盒。试剂盒包含荧光检测试剂，缓冲液和预稀释的 miRNA 标准品。该检测试剂盒对 Small RNA 的选择性高于核糖体 RNA 和信使 RNA，在检测 50 pg /  $\mu\text{L}$  ~ 100 ng /  $\mu\text{L}$  浓度范围的 miRNA 时具有较高的可靠性，在稳定性、线性动态范围和灵敏度等方面优于其他传统的 miRNA 定量方法。试剂盒操作简便，使用时使用前先将荧光检测试剂以缓冲液稀释制备成检测工作液，然后加入待测 miRNA 样品，即可使用荧光酶标仪或荧光计(如 Quantus™或 Qubit®荧光计)读取荧光值。该试剂盒对常见污染物如蛋白质、盐、溶剂和洗涤剂具有良好的耐受性。

### 产品优点:

- ❖ 稳定，极强的荧光信号。
- ❖ 简便、灵敏盒精确的 Small RNA 定量方法。
- ❖ 低浓度 miRNA 定量具有更好的效果。
- ❖ 更适用于高通量样本浓度定量，成本低。

表 1. 试剂盒组分:

组分	体积	浓度	储存条件	稳定性
<b>RobustDye™ miRNA Assay Kit (货号: N116, 200 assays)</b>				
<b>RobustDye™ miRNA Reagent (组分 A)</b>	250 $\mu\text{L}$	200 $\times$ in DMSO	2~8°C , 避光保存。	所有组分避免反复冻融，按照推荐条件保存，保质期至少 6 个月。
<b>RobustDye™ miRNA Buffer (组分 B)</b>	50 mL	1 $\times$		
<b>miRNA Standard #1 (组分 C)</b>	1 mL	0 ng/ $\mu\text{L}$ in TE buffer		
<b>miRNA Standard #2 (组分 D)</b>	1 mL	10 ng/ $\mu\text{L}$ in TE buffer		
<b>RobustDye™ miRNA Assay Kit (货号: N117, 1,000 assays)</b>				
<b>RobustDye™ miRNA Reagent (组分 A)</b>	1.25 mL	200 $\times$ in DMSO	2~8°C , 避光保存。	所有组分避免反复冻融，按照推荐条件保存，保质期至少 6 个月。
<b>RobustDye™ miRNA Buffer (组分 B)</b>	250 mL	1 $\times$		
<b>miRNA Standard #1 (组分 C)</b>	5 * 1 mL	0 ng/ $\mu\text{L}$ in TE buffer		
<b>miRNA Standard #2 (组分 D)</b>	5 * 1 mL	10 ng/ $\mu\text{L}$ in TE buffer		

备注: 结合 miRNA 时，激发/发射波长: 500/530 nm; 检测灵敏度为: 1 ~ 100 ng。

## 注意事项

- ※ 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- ※ 基于实验者自身健康和安全性考虑，建议穿实验服，并戴一次性手套操作。
- ※ 对于 miRNA 标准品，每次使用前，请先摇匀，再离心数秒钟，使液体充分沉降于管底。
- ※ 为保证定量结果的精确性，请务必使用校准后的移液器进行移液操作。

## 实验流程

**1. 使用荧光酶标仪进行 miRNA 定量检测分析** (注意: ① 为简便起见，以下操作说明中以 10  $\mu\text{L}$  体积 miRNA 样品为例，但是实际应用中须根据 miRNA 样品的浓度选择合适的体积（一般情况下待测的 miRNA 样品体积范围为 1~20  $\mu\text{L}$ ），然后调整 RobustDye™ miRNA 检测工作液的体积，使整个检测体系总体积为 200  $\mu\text{L}$ ；② 如待测 miRNA 样品浓度高于 100ng/ $\mu\text{L}$ ，请务必进一步稀释样品后再进行检测，否则会影响结果的准确性。)

1.1 使用前，将 RobustDye™ miRNA 检测试剂盒所有组分恢复至室温。检查 RobustDye™ miRNA Reagent（组分 A）是否有沉淀。若有沉淀物，可将该试剂置于 37°C 水浴锅中温育，并轻柔混匀至沉淀物完全溶解。

1.2 制备检测工作液。取试剂盒中的 RobustDye™ miRNA Reagent（组分 A），按照 1:200 的比例用 1 $\times$  缓冲液（组分 B）进行稀释，配制成检测工作液，现配现用。（如待测 Small RNA 样品共 8 份，且每份样品设置一个复孔，需取 20  $\mu\text{L}$  的荧光检测试剂（组分 A）加入到 4 mL 的 1 $\times$  缓冲液（组分 B）中并混匀，制成检测工作液，备用。）注意：每次配制检测工作液时要使用洁净的离心管。

1.3 向荧光酶标板中分别加入新鲜制备的 RobustDye™ miRNA 检测工作液，每孔 190  $\mu\text{L}$ 。（注意：推荐使用黑色的酶标板，如 Greiner 或 Corning 公司的黑色 96 孔荧光酶标板，可有效降低反应孔间的荧光交叉干扰。）

1.4 利用试剂盒中的 miRNA Standard #2 (组分 D)，按照浓度梯度进行稀释，制备一系列不同浓度稀释的 miRNA 标准品（亦可使用已知浓度的 miRNA 样品作为标准品）。注意：由于需要绘制标准曲线，miRNA 标准品进行浓度梯度稀释时，至少需设置 5 个浓度梯度，且待测 miRNA 样品的浓度须介于稀释标准品的浓度范围区间，以保证检测结果的准确性。

1.5 再向荧光酶标板中加入梯度浓度稀释的 miRNA 标准品（1.4 步骤中制备）或待测 miRNA 样品，每孔 10  $\mu\text{L}$ ，并分别设置 1~2 个复孔，再用移液器轻轻吹打，使工作液与 miRNA 标准品或样品充分混匀。

1.6 将整块荧光酶标板置于室温环境中，避光孵育 2 分钟。

1.7 使用荧光酶标仪检测荧光信号值，选择合适的检测波段：激发波长(Ex)设置为 485nm，发射波长(Em)设置为 530nm。

1.8 检测所得不同梯度浓度稀释的 miRNA 标准品的荧光信号值分别对应其浓度。绘制标准曲线：将所得的未知浓度 miRNA 样品的荧光信号值代入标准曲线中，可计算出 miRNA 样品的浓度。

**2. 使用 Qubit® 荧光测量仪进行 miRNA 定量检测分析** (注意: ① 为简便起见，以下操作说明中以 10  $\mu\text{L}$  体积 miRNA 样品为例，但是实际应用中须根据 miRNA 样品的浓度选择合适的体积（一般情况下待测的 miRNA 样品体积范围为 1~20  $\mu\text{L}$ ），然后调 RobustDye™ miRNA 检测工作液的体积，使整个检测体系总体积为 200  $\mu\text{L}$ ；② 如待测 miRNA 样品浓度高于 100 ng/ $\mu\text{L}$ ，请务必进一步稀释样品后再进行检测，否则会影响结果的准确性。)

2.1 使用前，将 RobustDye™ miRNA 检测试剂盒所有组分恢复至室温。检查 RobustDye™ miRNA Reagent（组分 A）是否有沉淀。若有沉淀物，可将该试剂置于 37°C 水浴锅中温育，并轻柔混匀至沉淀物完全溶解。

2.2 制备检测工作液。取试剂盒中的 RobustDye™ miRNA Reagent (组分 A)，按照 1:200 的比例用 1× 缓冲液 (组分 B) 进行稀释，配制成检测工作液，现配现用。（如待测 Small RNA 样品共 8 份，且每份样品设置一个复孔，需取 20 μL 的荧光检测试剂 (组分 A) 加入到 4 mL 的 1× 缓冲液 (组分 B) 中并混匀，制成检测工作液，备用。）**注意：每次配制检测工作液时要使用洁净的离心管。**

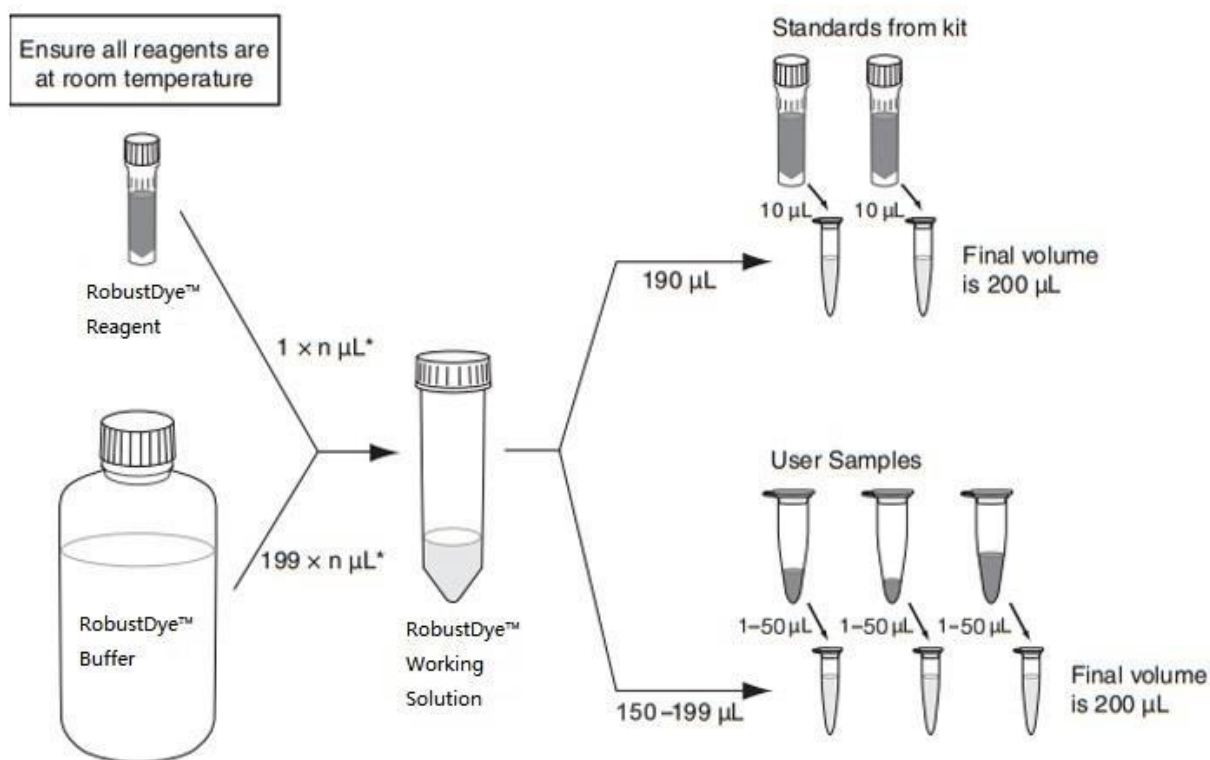
2.3 向 PCR 分析管中分别加入新鲜制备的 RobustDye™ miRNA 检测工作液，每孔 190 μL。**（注意：推荐使用透明，薄壁 PCR 管 (RobustDye™ Assay Tubes, 货号: N120)。**

2.4 向 PCR 分析管中加入 miRNA Standard #1 (组分 C)、miRNA Standard #2 (组分 D)、或待测 miRNA 样品，每管 10 μL，震荡涡旋 2~3 秒，使工作液与标准品或样品充分混匀。请注意正确标记 miRNA 标准品和待测样品的分析管。**（注意：标准品每组 1~2 个重复，以便测得准确的标准参考荧光信号值，利于绘制标准曲线）**

2.5 将所有已加样 PCR 分析管置于室温环境，避光孵育 2 分钟。

2.6 按照 Qubit® 荧光仪的操作说明，选择 microRNA 检测程序测定荧光信号值。**（注意：依次测定 miRNA Standard #1 (组分 C)、miRNA Standard #2 (组分 D) 组荧光信号值，再测定待测样品荧光信号值）**

图 3 RobustDye™ Assay Kit 检测流程示意图



## 实验案例

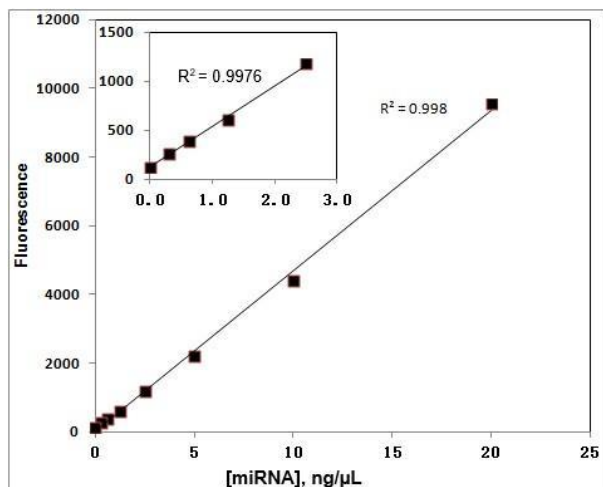


图 1 荧光酶标仪测定 miRNA

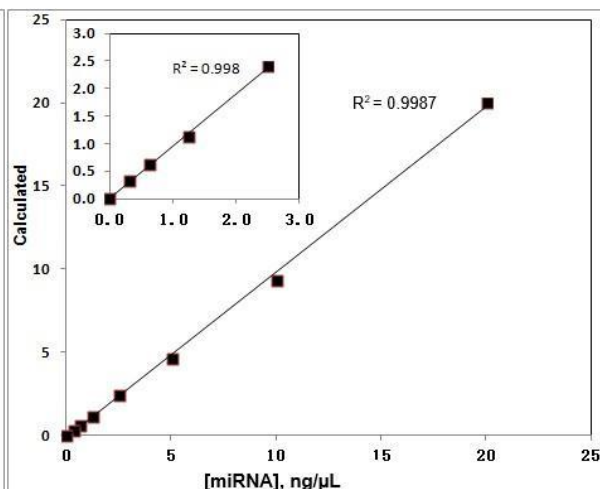


图 2 Qubit® 荧光仪测定 miRNA

## 相关产品

货号	产品名称	包装规格
N104/N105	RobustDye™ dsDNA HS Assay Kit	200/1000 assay
N106/N107	RobustDye™ 1 x dsDNA HS Assay Kit	200/500 assays
N108/N109	RobustDye™ dsDNA BR Assay Kit	200/1000 assays
N110/N111	RobustDye™ ssDNA Assay Kit	200/1000 assays
N112/N113	RobustDye™ RNA HS Assay Kit	200/1000 assays
N114/N115	RobustDye™ RNA BR Assay Kit	200/1000 assays
N120	RobustDye™ Assay Tubes	500 tubes

## 有限使用许可协议及质量保证

### 有限使用许可协议

以下条款适用于 RobustDye™ Assay Kit 产品。如果不接受以下条款，所有的产品必须在 5 个工作日内完整返还至 GeneCodex。GeneCodex 的产品仅限购买方内部研究使用，不可用于包括人类或体外诊断和治疗在内的其他用途。GeneCodex 的产品不得修改和转售、转赠给任何第三方，未经 GeneCodex 书面批准，不得将产品用于向其他第三方提供服务或用于制造商品化产品。此产品必须按照国家卫生研究院的 DNA 重组和基因研究的指导方针使用。

### 有限质量保证

GeneCodex 保证您收到的产品符合产品目录上的规格。如果 GeneCodex 的产品未能满足这些规格，GeneCodex 将给予替换。若无法提供替换产品，GeneCodex 将退款给购买方。此有限质量保证不得延伸至产品的原始购买者以外的其他第三方。若产品与订购信息不符，所有的产品必须在 30 天内完整返还至 GeneCodex。GeneCodex 的责任仅限于替换产品，且退款只限于实际的购买价格。GeneCodex 不对任何因使用或不正确使用本公司产品造成的直接、间接、衍生或偶发的损害所产生的后果负责。GeneCodex 不提供其他任何形式的对于产品商业或健康用途的保证。GeneCodex 致力于为我们的客户提供高质量的产品。如果您对我们的产品有任何问题和担忧，请和我们联系，电话：400-662-6996。

## 附录

表 2. 待测 miRNA 样品中所含污染物对 RobustDye™ miRNA Assay Kit 检测结果影响情况

污染物	检测体系中终浓度	10 $\mu$ L 样品中浓度	结果
<b>Salts</b>			
Sodium Chloride	5 mM	100 mM	OK
Magnesium Chloride	1 mM	20 mM	OK
Sodium Acetate	5 mM	100 mM	OK
Ammonium Acetate	1 mM	20 mM	OK
<b>Organic Solvents</b>			
Ethanol	1%	20%	OK
Chloroform	0.2%	4%	OK
Phenol	0.1%	2%	OK
<b>Detergents</b>			
Sodium Dodecyl Sulfate	0.01%	0.2%	OK
Triton X- 100	0.001%	0.02%	OK
<b>Other Compounds</b>			
dsDNA	10:1 (miRNA:dsDNA)	10:1 (miRNA:dsDNA)	OK
ssDNA	10:1 (miRNA:dsDNA)	10:1 (miRNA:dsDNA)	OK