



---

S-Poly(T) miRNA qPCR assay

Cat. No: AB-MAS100001 ~ AB-MAS43285

AB-MAS43286 ~ AB-MAS86571

## 产品说明书

深圳市盎然生物科技有限公司

# 目 录

1. 产品介绍 .....	1
2. 产品原理 .....	1
3. 产品优势 .....	1
4. 制品内容 .....	2
5. 储存条件 .....	2
6. 使用方法 .....	2
6.1 RNA 的多聚腺苷酸化反应 .....	2
6.2 反转录反应 .....	3
6.3 荧光定量 PCR .....	3
6.4 数据分析 .....	3
7. 问题解答 .....	4
8. 附录 .....	5

## 1. 产品介绍

S-Poly(T)是本公司自主研发的 miRNA 检测新方法。该方法融合了 Poly(A)加尾法和 Stem-loop 法的优点,使用含有特异碱基和 oligo(dT)的 S-Poly(T)引物对成熟 miRNA 进行逆转录,增强了引物与 miRNA 模板的锚定力度和热稳定性,从而大幅度提高 miRNA 的逆转录及后续 qPCR 效率。逆转录产物用 miRNA 特异上游引物、通用下游引物、通用 Taqman 探针进行 qPCR 检测。本产品能灵敏、特异、准确地对细胞系、组织、血清等样品中 miRNA 的表达水平进行定量检测。本产品覆盖 miRBase 数据库 (V18.0) 中人、小鼠、大鼠、猪、牛、斑马鱼、鸡、病毒的全部成熟 miRNA。

## 2. 产品原理

S-Poly(T)法使用由 5~7 个特异碱基和 Oligo(dT)组成的反转录引物对样品中 miRNA 进行反转录,然后用特异上游引物、通用下游引物和通用荧光探针对 miRNA 进行 real-time PCR 定量检测。示意图如下:

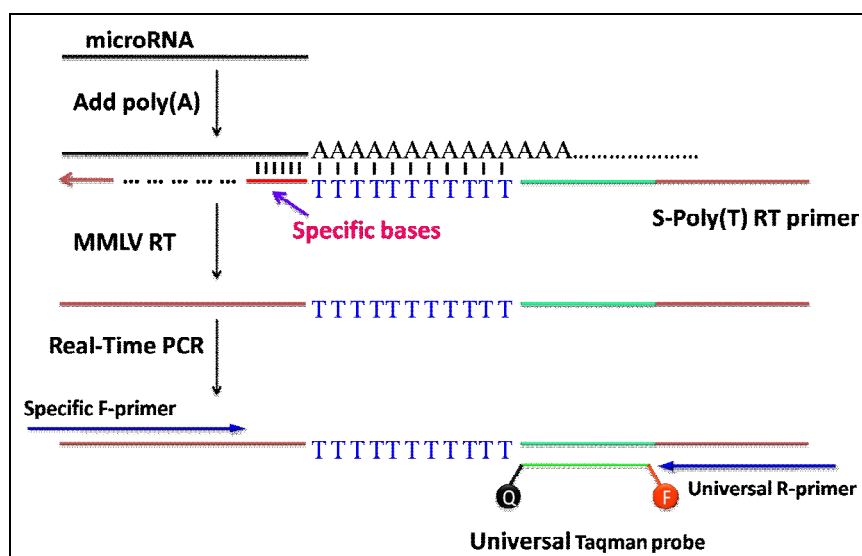


图 1. S-Poly(T)<sup>TM</sup>法检测 miRNA 原理图

## 3. 产品优势

(1)高灵敏度。S-Poly(T)法能够准确检测 0.01 pg~10 ng 总 RNA 样品中 miRNA 的表达水平, RNA 线性范围跨越 7 个数量级;对于不同的 miRNA, S-Poly(T)法的灵敏度比传统的 PolyA 法或 Stem-loop 法提高 4~90 倍。

(2) 高特异性。S-Poly(T) 法能有效区分只有 1 个碱基差异的 miRNA，还能较好地地区分成熟 miRNA 与 pri-, pre-miRNA。

(3) 高通量性。将不同的 S-Poly(T) 引物混合，可同时对数十至数百个 miRNA 进行反转录，从而高通量地进行 miRNA 的表达谱检测。

#### 4. 制品内容

(1) 本试剂盒提供的试剂：

<b>Component</b>	<b>20RT/200PCR rxns</b>	<b>50RT/500PCR rxns</b>
10×Poly(A) Polymerase Buffer	20 μl	50 μl
10 mM ATP	20 μl	50 μl
Poly(A) Polymerase (1U/μl)	20 U	50 U
5×M-MLV Buffer	40 μl	100 μl
M-MLV Reverse transcriptase (200 U/μl)	2,000 U	5,000 U
miRNA RT primer (10×)	20 μl	50 μl
Internal control 1 RT primer (10×)	20 μl	50 μl
Internal control 2 RT primer (10×)	20 μl	50 μl
Specific forward primer (50×)	80 μl	200 μl
Internal control 1 Specific forward primer (50×)	80 μl	200 μl
Internal control 2 Specific forward primer (50×)	80 μl	200 μl
universal reverse primer (50×)	160 μl	400 μl
universal Probe (40×)	200 μl	500 μl

(2) 需要另外购买的试剂：

10 mM dNTP mix, qPCR mastermix。推荐使用本公司的 SM-Taq Master Mix (Cat. No. AB-RPP-0301)。

#### 5. 储存条件

-20℃ 保存。

#### 6. 使用方法

##### 6.1 RNA 的多聚腺苷酸化反应

<b>Component</b>	<b>Volume (μl)</b>
Total RNA	1 μg
10×A-Plus Buffer	1
10 mM ATP	1
Poly(A) Polymerase (1U/μl)	1
RNase-Free Water	Up to 10
<b>Total volume</b>	<b>10</b>

37℃保温30分钟，65℃加热5分钟，冰上放置2分钟。

## 6.2 反转录反应

Component	Volume (μl)
Polyadenylated RNA	1
miRNA RT primer (10×)	1
Internal control 1 RT primer (10×) or Internal control 2 RT primer (10×) *	1
5×M-MLV Buffer	2
M-MLV Reverse transcriptase (200 U/μl)	0.5
10 mM dNTP mix	0.5
RNase-Free Water	4
<b>Total volume (μl)</b>	<b>10</b>

42℃保温 60 分钟，70℃加热 10 分钟 (或 85℃加热 5 分钟)，冰上放置 2 分钟。

\* 根据需要任选一种内参基因，也可两种内参基因都选择。内参基因的详细信息请查看附录。

## 6.3 荧光定量 PCR

(以 SM-Taq Master Mix 为例)

Component	Volume (μl)
2×SM-Taq Master Mix	10
Specific forward primer (50×)	0.4
universal reverse primer (50×)	0.4
universal Probe (40×)	0.5
cDNA	0.1 ~ 2
Rox Reference Dye (100×)*	0.2
RNase-Free Water	Up to 20
<b>Total volume (μl)</b>	<b>20</b>

\* 是否使用 Rox Reference Dye 及其用量请参考荧光定量 PCR 仪使用说明。

qRT-PCR 反应程序:

95℃	2 min	1 Cycle
95℃	10 s	40 Cycles
60℃	30s	

## 6.4 数据分析

荧光定量 PCR 数据的分析可以使用  $\Delta\Delta C_t$  值法，也可以使用相对标准曲线法。

### (1) $\Delta\Delta C_t$ 值法

[1] 去除  $C_t$  值 >35 的值，剩余的复孔取平均值 (AVG)。

[2] 计算  $\Delta Ct$  值。 $\Delta Ct = Ct \text{ AVG MOI} - \Delta Ct \text{ AVG IC}$  (MOI: 检测的 miRNA, IC: 内参基因)。

[3] 计算  $\Delta\Delta Ct$  值。 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (处理组)  $- \Delta Ct$  (对照组)。

[4] 计算倍数变化(fold change)。fold change =  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。当 fold change 大于 1, 表明 miRNA 表达上调; 当 fold change 等于 1, 表明 miRNA 表达没有变化; 当 fold change 小于 1, 表明 miRNA 表达下调。

## (2) 相对标准曲线法

[1] 以 Ct 值为 Y 轴, 不同稀释度的 RNA 样品的质量的对数为 X 轴, 分别绘制检测的 miRNA 和内参基因的相对标准曲线。

[2] 根据相对标准曲线和检测样品的 Ct 值, 分别计算“处理组”和“对照组”样品中 miRNA 和内参基因的相对表达水平。

[3] 归一化。用 miRNA 的相对表达水平除以内参基因的相对表达水平, 得到“处理组”和“对照组”归一化的 miRNA 相对表达水平。

[4] 计算倍数变化(fold change)。fold change = “处理组”归一化的 miRNA 相对表达水平 / “对照组”归一化的 miRNA 相对表达水平。当 fold change 大于 1, 表明 miRNA 表达上调; 当 fold change 等于 1, 表明 miRNA 表达没有变化; 当 fold change 小于 1, 表明 miRNA 表达下调。

## 7. 问题解答

问题 1: 没有扩增曲线或 Ct 值 >35

原因分析	解决办法
RNA 降解	操作中尽可能避免 RNase 污染, 如佩戴手套、口罩, 使用 RNase-free 的吸头、离心管。
提取的 RNA 中含有较多的抑制剂	更换 RNA 提取试剂盒, 或选用对抑制剂不敏感的 qPCR mastermix。
反转录酶失活	反转录酶应当在 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存, 加样过程始终在冰上进行。
目的 miRNA 表达水平低	多聚腺苷酸化反应中增加 RNA 用量, 并增加 qPCR 的模板量。

问题 2: PCR 复孔重复性不好

原因分析	解决办法
提取的 RNA 中含有较多的抑制剂	更换 RNA 提取试剂盒，或选用对抑制剂不敏感的 qPCR mastermix。
非特异扩增	使用热启动 Taq 酶系统，加样过程中在冰上操作，防止非特异反应。
加样误差	应尽可能配制 qPCR mix，再进行分装；单独加样的成分（如 cDNA 模板）的体积不能过小（最好大于 4 $\mu$ l），防止误差；盖紧 PCR 管盖子，防止反应过程中溶液蒸发。

问题 3: PCR 产物电泳条带不特异

原因分析	解决办法
非特异扩增	使用热启动 Taq 酶系统，加样过程中在冰上操作，防止非特异反应。
qPCR 过程中模板量过低	多聚腺苷酸化反应中增加 RNA 用量，并增加 qPCR 的模板量。

## 8. 附录

miRNA 检测中使用的内参基因(internal control)

物种	Internal control 1	Internal control 2
Homo sapiens	Snord44	Snord47
Mus musculus	snoRNA202	snoRNA234
Rattus norvegicus	snoRNA202	snoRNA234
Gallus gallus	U6	

深圳市盎然生物技术有限公司

**E-mail : mirnalab@hotmail.com**

**Q Q : 1764955035**

V2012.08

本产品仅供研究使用。