

## 使用说明书

1. 产品名称: S-Poly(T) miRNA qPCR-assay (Cat. No. AB-MAS100001~AB-MAS86581)

### 2. 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:

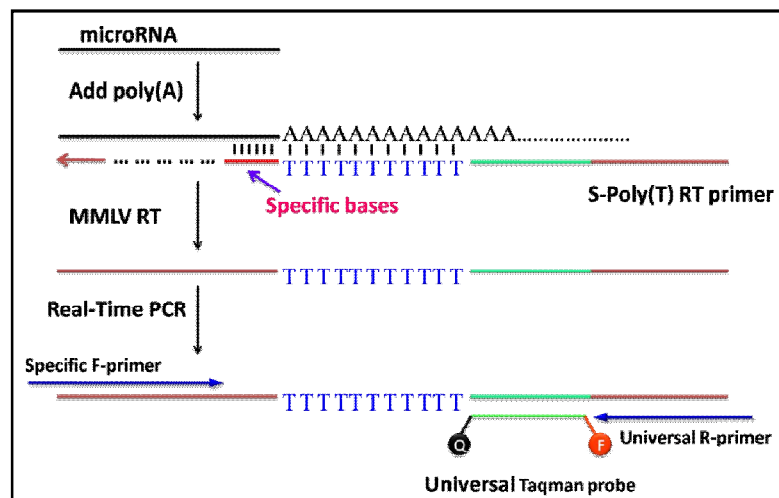


图 1. S-Poly(T)<sup>TM</sup>法检测 miRNA 原理图

### 3. 产品特点:

- (1) 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成熟 miRNA 与 pri-, pre-miRNA。
- (2) 灵敏性高。用本产品进行 qPCR 反应, 能比同类产品获得更小的 threshold cycle (Ct) 值。
- (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) 线性范围广。本产品能在宽广的范围内获得准确的标准曲线; 同时检测重复性好, 可信度高。

#### 4. 制品内容:

分类	名称	20poly(A)/20RT /200PCR rxns	50poly(A)/50RT /500PCR rxns
Poly(A)	10×Poly(A) Polymerase Buffer	20 µl	50 µl
	10 mM ATP	20 µl	50 µl
	Poly(A) Polymerase (5U/µl)	20 U	50 U
	RNase-Free Water		
Reverse Transcription	5×M-MLV Buffer	40 µl	100 µl
	M-MLV Reverse transcriptase (200U/µl)	2,000 U	5,000 U
	miRNA RT primer (1 µM)	10 µl	25 µl
	Internal control 1 RT primer (1 µM)	10 µl	25 µl
	Internal control 2 RT primer (1 µM)	10 µl	25 µl
	5 mM dNTP mix	20 µl	50 µl
Real Time PCR	Specific forward primer (10 µM)	80 µl	200 µl
	Internal control 1 Specific forward primer (10 µM)	80 µl	200 µl
	Internal control 2 Specific forward primer (10 µM)	80 µl	200 µl
	universal reverse primer (10 µM)	80 µl	200 µl
	universal Probe (10 µM)	200 µl	500 µl
	5× qPCR probe Mix*	800 µl	2000 µl
	100× ROX Reference Dye	40 µl	100 µl
	SM-Taq polymerase	100 µl	250 µl

\* 内含 PCR buffer,  $Mg^{2+}$ , dNTP Mixture 等。

5. 储存条件: -20℃保存, 避免反复冻融。

#### 6. 使用方法:

##### (1) RNA 的多聚腺苷酸化反应 (Polyadenylation of RNA)

Component	Volume (µl)
Total RNA	1 µg
10×Poly(A) Polymerase Buffer	1
10 mM ATP	1
Poly(A) Polymerase (5U/µl)	0.2
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。

## (2) 反转录反应 (RT-PCR)

Component	Volume ( $\mu$ l)
Polyadenylated RNA	1~2
miRNA RT primer (1 $\mu$ M)	0.5
Internal control 1 RT primer (1 $\mu$ M) or Internal control 2 RT primer (1 $\mu$ M) *	0.5
5 $\times$ M-MLV Buffer	2
M-MLV Reverse transcriptase (200 U/ $\mu$ l)	0.5
5 mM dNTP mix	1
RNase-Free Water	Up to 10
<b>Total volume (<math>\mu</math>l)</b>	<b>10</b>

\* 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。

42 $^{\circ}$ C 保温 60 分钟，70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟，冰上放置 2 分钟。

## (3) 荧光定量 PCR (Real Time PCR)

Component	Volume ( $\mu$ l)
5 $\times$ qPCR probe Mix	4
SM-Taq polymerase	0.5
Rox Reference Dye (100 $\times$ )*	0.2
Specific forward primer (10 $\mu$ M)	0.4
universal reverse primer (10 $\mu$ M)	0.4
Probe (10 $\mu$ M)	0.5
cDNA**	X
dH <sub>2</sub> O(灭菌蒸馏水)	Up to 20
<b>Total volume (<math>\mu</math>l)</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。

\*\* RT 反应液的加入量不要超过 Real Time PCR 反应总体积的 1/10 (V/V) 量。

将上述 PCR 反应液加入至 Real Time PCR 用反应管中，然后再加入用 dH<sub>2</sub>O 稀释后的 cDNA，建议 cDNA 稀释 10~20 倍，取 8  $\mu$ l 进行 Real Time PCR 反应。

## (4) qPCR 反应程序

95 $^{\circ}$ C 30 s	1 Cycle
95 $^{\circ}$ C 10 s 60 $^{\circ}$ C 30 s	40 Cycles

## 7. 数据分析

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

### (1) $\Delta\Delta Ct$ 值法

- [1] 去除 Ct 值 >35 的值，剩余的复孔取平均值 (AVG)；
- [2] 计算  $\Delta Ct$  值。 $\Delta Ct = \text{AVG}(\text{检测的 miRNA}) - \text{AVG}(\text{内参基因})$ ；
- [3] 计算  $\Delta\Delta Ct$  值。 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{处理组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ ；
- [4] 计算倍数变化(fold change)。 $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。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)。 $\text{fold change} = \frac{\text{“处理组”归一化的 miRNA 相对表达水平}}{\text{“对照组”归一化的 miRNA 相对表达水平}}$ 。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。
-

## 8. 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。
反转录酶失活	反转录酶应当在-20℃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。
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 μl), 防止误差; 盖紧 PCR 管盖子, 防止反应过程中溶液蒸发。
非特异扩增	PCR 产物进行电泳鉴定, 特异条带应在 60~80 bp 之间, 如不在这个范围或出现两条以上条带, 则确定是非特异扩增, 解决方案见问题 3。

问题 3: PCR 产物电泳条带不特异

原因分析	解决办法
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。
样品中 miRNA 表达水平很低或不表达	换一个已确定表达该 miRNA 的细胞作为阳性对照, 重新进行检测。

## 9. 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	