

## S-Poly(T) Plus miRNA qPCR-assay使用说明书

## 产品介绍：

S-Poly(T) plus是本公司自主研发的miRNA检测新方法。该方法融合了Stem-loop法和Poly(A)加尾法的优点，使用5~7个特异碱基和11个 dT组成的S-Poly(T) plus引物对poly(A) tailed miRNA进行特异性逆转录，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(图1)。逆转录产物用miRNA特异上游引物、通用下游引物、通用Taqman探针以及热启动酶进行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(V21.0)中人、小鼠、大鼠、猪、牛、羊、斑马鱼、鸡、病毒的全部成熟miRNA。

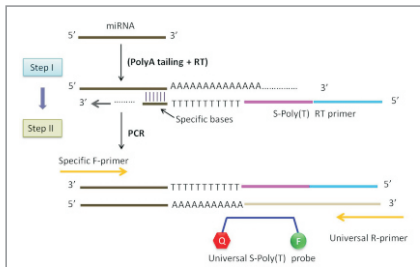


图1. S-Poly(T) Plus法检测miRNA原理图

## 产品特点:

- (1)高特异性。S-Poly(T) plus法能有效区分只有1个碱基差异的miRNA，还能较好地区分成熟miRNA与pri-pre-miRNA；并且使用热启动酶进行PCR反应，可以大幅减少加样及反应过程中的非特异结合。
- (2)高灵敏度。与Stem-loop法等传统方法相比，用S-Poly(T) plus法检测miRNA的灵敏度平均提高10倍。
- (3)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。

## 制品内容:

分类	名称	规格		
		20RT/100PCR	40RT/200PCR	100RT/500PCR
One Step miRNA cDNA Synthesis Core Reagent Kit	4×Reaction Buffer Mix	50 μl	100 μl	250 μl
	PolyA/RT Enzyme Mix	20 μl	40 μl	100 μl
Probe Premix HS SM-Taq	4×PCR Buffer *	500 μl	1000 μl	2500 μl
	100×ROX Reference Dye	20 μl	40 μl	100 μl
	HS SM-Taq	40 μl	80 μl	200 μl
S-Poly(T) plus miRNA qPCR-assay primer set	20×probe&miRNA PCR primer**	100 μl	200 μl	500 μl
	200×miRNA RT primer	10 μl	10 μl	10 μl

\* 内含PCR buffer, Mg<sup>2+</sup>, dNTP Mixture等。

\*\* 内含探针，特异上游引物，通用下游引物。

**储存条件:** -20°C保存, 避免反复冻融。

**使用方法:**

(1)一步PolyA加尾和逆转录反应

Component	Volume (μl)
Total RNA*	Variable (1 ng-1 μg)
4×Reaction Buffer Mix	2.5
PolyA/RT Enzyme Mix	1
10×miRNA RT primer **	1
RNase-free Water	Up to 10
<b>Total volume</b>	<b>10</b>

\* 对于从血清、血浆、尿液等材料中提取的RNA样品, 如浓度较低, 可按最大体积量来添加。建议使用本公司生产的S/P RNAiso kit (Cat. No. AB-MIS-001)来提取体液样本miRNA。RNA回收效率可提高数倍。

\*\* 提前将适量的200×RT primer稀释成10× RT primer。建议同时加入等量内参基因RTprimer进行逆转录, 从而减少定量检测的误差。内参基因信息请查看附录1。

37°C保温30分钟, 42°C保温30分钟, 75°C加热5分钟, 冰上放置5分钟。

(2)荧光定量PCR (Real-Time PCR)

Component	Volume (μl)
4×PCR Buffer	5
HS SM-Taq	0.4
Rox Reference Dye (100×)*	0-0.2
20×probe & miRNA PCR primer **	1
cDNA***	X
dH2O	Up to 20
<b>Total volume (μl)</b>	<b>20</b>

\* Rox Reference Dye的使用方法请参考附录2。

\*\* 探针荧光基团(reporter): FAM, 淬灭基团(Quencher): None。

\*\*\* cDNA加入量建议不要超过荧光定量PCR反应总体积的1/20 (V/V)。如果需要单独加入cDNA, 建议将cDNA稀释5-20倍, 然后取5 μl加入荧光定量PCR反应。

(3)Real-time PCR 反应程序

95°C 3 min	1 Cycle
95°C 10s	
60°C* 30 s	40Cycle

\* 如果miRNA成熟序列的GC含量较高, 可将温度适当提高。

**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。  $\Delta Ct = AVG(\text{检测的miRNA}) - AVG(\text{内参基因})$ ;
- (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),  $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ , 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 $C_t$ 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 $C_t$ 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),  $\text{fold change} = \text{“处理组”归一化的miRNA相对表达水平} / \text{“对照组”归一化的miRNA相对表达水平}$ 。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。

## 问题解答:

问题1: 没有扩增曲线或 $C_t$ 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	一步PolyA加尾和反转录反应中增加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	一步PolyA加尾和反转录反应中增加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。

## 附录:

### 附录1. miRNA检测中常用的内参基因(Normalization control)

物种	Normalization control 1	Normalization control 2	Normalization control 3	Normalization control 4 *
Homo sapiens	Snord44	Snord47	U6	Cel-miR-54-5p
Mus musculus	snoRNA202	snoRNA234	U6	Cel-miR-54-5p
Rattus norvegicus	snoRNA202	snoRNA234	U6	Cel-miR-54-5p

\* 检测循环miRNA时使用。

### 附录2. 不同仪器Rox Reference Dye推荐使用量

仪器	100×Rox Reference Dye/20 μl Reaction
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT 和7900HT Fast, ABI Step One, ABI Step One Plus	0.2 μl
ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P, Mx3005P Mx4000, Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000	0.02 μl
Thermo Cycler Dice™ Real Time System Single, LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics), CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	不需要

## 相关产品:

商品名称	产品信息	规格
S-Poly(T) Plus miRNA qPCR-assay	包含一种miRNA逆转录引物、特异上游引物、通用下游引物、通用Taqman探针、逆转录及qPCR试剂。	20RT/100PCR
		40RT/200PCR
		100RT/500PCR
S-Poly(T) Plus Normalization control simple qPCR-assay	包含一种内参的逆转录引物、特异上游引物、通用下游引物、通用Taqman探针及qPCR试剂。	20RT/100PCR
		40RT/200PCR
		100RT/500PCR
S/P RNAiso Kit	适合血清、血浆、尿液、乳汁、唾液、痰液、粪便抽提上清等样本miRNA的提取。	25 rxns
		50 rxns
		200 rxns