

## Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Primer 使用说明

RN: R10031.8

## 产品简介

Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR 是锐博生物自主研发的 miRNA 成熟链检测方法，基于特异性的茎环状引物进行 RT 反应，再结合特异性的正向引物进行 qPCR 检测，具有很高的灵敏度和特异性。该方法采用 SYBR Green 染料检测，无需荧光探针。

表 1 试剂规格内容

Reagent (In tube)	MQP-0101 (100rxns)	MQP-0102 (200rxns)	MQP-0105 (500rxns)	MQP-0110 (1000rxns)	Storage
Bulge-Loop™ RT Primer	1 nmol	1 nmol	3 nmol	6 nmol	-20℃
Bulge-Loop™ Forward Primer	1 nmol	2 nmol	5 nmol	10 nmol	
Bulge-Loop™ Reverse Primer	1 nmol	2 nmol	5 nmol	10 nmol	

注：rxns 表示 PCR 反应次数

## 运输保存

产品以 20μM 水溶液的形式提供，常温运输，于 -20℃ 或以下低温冻存，可以稳定保存半年。

使用前请瞬时离心，用 RNase-free Water 或灭菌 ddH<sub>2</sub>O，稀释成 5μM 引物储存液，混匀后分装保存，减少反复冻融。

表 2 5μM 引物储存液的配置参考

Primer(nmol)	1
管中引物储存液(μl)	50
需再加入 RNase-free Water(μl)	150

## 使用前须知

1) 为避免外界因素(包括酶，极端 pH 或者温度条件等)导致产品降解，所有操作请严格遵循 DNA 和 RNA 操作规程。实验过程中，产品请于冰上放置，使用完毕后请于 -20℃ 以下小心保存。

2) 为了进行实验样品之间相对定量分析，建议人，小鼠，大鼠源的 Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR 实验采用锐博生物的 U6 snRNA、5S rRNA 通用引物作为内参。其他物种的内参引物需客户另行选择，可提供具体基因信息由我们设计适合同样反应体系的引物。

3) 若需绘制标准曲线，可订购相应的 miDETECT™ miRNA Standard RNA 作为 RNA 标准品。

4) 血浆或血清的 miRNA qPCR 检测需要加入外参，锐博生物推荐秀丽隐杆线虫 miRNA( cel-miR-39-3p) 或拟南芥 miRNA( ath-miR156a-5p) 的 mimic 或标准品作为外参模板。

5) 推荐搭配锐博生物的配套试剂盒 Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 进行检测试验，其他公司的 qPCR 试剂盒请核实使用方法。

## 实验方法

以下是搭配锐博生物的配套试剂盒 **Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit** 进行检测试验的操作方法。

### 1. miRNA RT 反应

- 1) 取 Bulge-Loop™ miRNA RT Primer (20 μM)，加入适量 RNase-free H<sub>2</sub>O，配置成 Bulge-Loop™ miRNA RT Primer (5 μM)。Bulge-Loop™ miRNA RT Primer 为 miRNA 特异性逆转录引物，需对应目的 miRNA 使用。
- 2) 推荐以 10 μl RT 反应体系进行实验：

表 3 逆转录反应体系（冰上配制）

Reagent	10 μl 体系	终浓度
RNA Template (1 μg)	x μl	
Bulge-Loop™ miRNA RT Primer (5 μM)	1 μl	500 nM
5X Reverse Transcription Buffer	2 μl	1X
RTase Mix	2 μl	
RNase-free H <sub>2</sub> O	至 10 μl	

以上体系混匀后，瞬时离心，RT 反应程序为：42℃ 60 min，70℃ 10 min。

注：①最佳 RT 引物浓度依据具体实验而定，引物浓度范围可在 200nM~800nM 之间优化；②RT 反应结束后请立即将 cDNA 产物取出，快速置于冰上冷却备用或-20 度以下保存；③内参引物（U6，5S 等）的使用与 miRNA 的检测方法一致。④每个 miRNA 及内参建议单独逆转录，有合并逆转录需要的，需先行比较合并逆转录结果与单独逆转录结果是否一致。⑤体系可按照实验需求等比放大，20 μL 反应体系建议不超过 5 μg 的 Total RNA。

### 2. miRNA qPCR 反应

- 1) SYBR Green Mix: 包括 Taq 酶、dNTP mix、PCR Buffer、SYBR Green I 等。

200 μl 反应孔（如 96 孔 PCR 板的反应孔）推荐以 20 μl qPCR 反应体系进行实验：

表 4 qPCR 反应体系（冰上配制）

Reagent	20 μl 体系	终浓度
2X SYBR Green Mix	10 μl	1X
RT Product	2 μl	
Bulge-Loop™ miRNA Forward Primer (5 μM)	0.8 μl	200 nM
Bulge-Loop™ Reverse Primer (5 μM)	0.8 μl	200 nM
ddH <sub>2</sub> O	至 20 μl	

注：①DNA 最高使用量不能超过 qPCR 反应体系的 1/10，对于表达丰度较高的 miRNA，可将 cDNA 稀释后再进行 qPCR，稀释比例可以在 10~1000 倍之间，请根据具体的 Ct 值进行调整；② Bulge-Loop™ RT Primer 与 Bulge-Loop™ Forward Primer 为 miRNA 特异性引物，需对应目的 miRNA 使用，初始反应浓度推荐使用 200nM，最佳浓度可以在 100nM~500nM 之间优化；③Bulge-Loop™ Reverse Primer 为 miRNA 通用引物，与 Bulge-Loop™ RT Primer 的变异序列相匹配，与 miRNA 无关。U6 或 5S 内参需选用各自特异的 U6 Reverse Primer 或 5S Reverse Primer 进行反应，

不可使用 Bulge-Loop™ miR-Reverse Primer: ④本试剂盒不含 ROX 染料, 使用 ABI PRISM® 7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR System 等需额外添加 ROX 染料作为校正荧光的仪器, 请用户自行准备所需的 ROX 染料。具体使用方法请参考仪器说明及 ROX 染料试剂说明。

2) 轻轻混匀上述反应体系 (避免剧烈涡旋振荡), 建议使用标准三步法进行检测, 请在定量 PCR 仪 (以 Bio-Rad CFX96 为例) 上设定如下程序:

表 5 qPCR 反应程序

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95°C	10 min	Taq 酶激活
40 X	扩增反应	95°C	2 sec	PCR 模板变性
		60°C	20 sec	退火
		70°C	10 sec	延伸 (收集信号)
1 X	熔解曲线分析	70°C-95°C	-	熔解曲线分析

注: ①以上程序适用于 BioRad CFX96 仪器, 其它可以设置为恒温 10 秒或以内收集信号的 qPCR 仪亦可使用该程序。②部分品牌或型号 qPCR 仪在收集荧光信号时需较长的恒温时间方能收集信号, 使用此类仪器建议将反应程序更改为两步法, 将退火及延伸反应合并, 时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。③对于用 SYBR Green I 染料法进行的 qPCR 的检测反应都需要在循环结束后立即进行熔解曲线分析, 检测温度为 70°C~95°C, 升温速率为 0.5°C/次, 恒温时间为 5 sec/次, 或采用仪器默认程序进行熔解曲线分析。

## 相关产品

表 6 相关产品

产品编号	产品名称
C10211-1	Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit (20T RT + 60T qPCR)
C10211-2	Bulge-Loop™ miRNA qRT-PCR Starter Kit (100T RT + 300T qPCR)
Variant <sup>1,2</sup>	Bulge-Loop™ U6 qRT-PCR Primer Set
Variant <sup>1,2</sup>	Bulge-Loop™ 5S rRNA qPCR Primer Set
Variant <sup>1,2</sup>	Bulge-Loop™ h-SNORD48 qRT-PCR Primer Set
Variant <sup>1,2</sup>	Bulge-Loop™ h-SNORD44 qRT-PCR Primer Set
Variant <sup>2</sup>	miDETECT™ miRNA qRT-PCR Standard RNA

注: 1. 常用内参基因正向引物, 其中 U6 和 5S rRNA 适用于人、小鼠、大鼠细胞样品或以细胞为主的组织样品, h-SNORD48 和 h-SNORD44 仅适用于人源细胞样品或以细胞为主的组织样品; 2. 根据 miRNA 不同或/规格不同编号不同。

## FAQ

### 1. 是否可以搭配其他公司的逆转录及 qPCR 试剂盒?

可以搭配使用,前提是逆转录试剂盒的反应温度须在 37~42℃。此外,逆转录过程中注意不能含有其它引物在反应体系中。

### 2. 引物非特异扩增怎么办?

在合理的 Ct 值范围内 (15~30, 数据稳定性好的 30-35) 出现熔解曲线有杂峰的现象,建议做如下改进:

- 1) 使用更合适的扩增条件 (控制延伸时间, 提高退火温度);
- 2) 确认 RNA 模板质量, 使用高质量高完整度的 RNA 模板;
- 3) 以上均不能解决杂峰现象, 请提供具体实验信息及数据, 我司可协助分析处理。

### 3. 无扩增信号是不是引物不行?

只要引物序列能够跟目的模板序列匹配上, 基本可以扩增, 建议做如下改进或检测:

- 1) 使用合适的反应体系及程序;
- 2) 使用阳性对照样品 (如对应 miRNA 的 mimic) 进行逆转录及 qPCR;
- 3) 如若反应体系、程序和引物都没有问题, 很有可能是目的 miRNA 在实验模型中表达丰度很低或不表达, 建议更换实验模型。

### 4. 阴性样品有信号是不是引物问题?

具体 Ct 值分析对样品扩增信号有没有影响, 若有影响, 处理同引物非特异扩增。

### 5. RT 前是否可以对 RNA 进行高温变性处理?

高温变性处理主要是为了打开 RNA 的二级结构, 可以在 RT 前将 RNA 在 70℃ 中变性 10min, 然后冰浴 2min 再进行 RT 反应。

### 6. qPCR 的设定程序中预变性 10min 时间太长, 是否可以缩短?

预变性时长主要是根据 Taq 酶的热激活时间设定, 我们的试剂盒采用的是化学修饰的 Taq 酶, 热激活时长较长, 不能缩短; 如果采用其他 Taq 酶 (如抗体修饰的 Taq 酶), 热激活时间可能较短。请严格按照具体使用的 qPCR 试剂盒/Taq 酶使用说明书进行操作。