

## Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit 使用说明

RN: R11067.5

## 产品简介

Bulge-Loop miRNA qRT-PCR 方法是锐博生物自主研发的 miRNA 等小 RNA 的 RT-qPCR 检测方法，该方法基于特异性的茎环状逆转录引物及正反向引物，并采用 SYBR Green 染料检测，无需荧光探针，具有高灵敏度和高特异性的优点。Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Starter Kit 包括该检测方法所需要的逆转录酶，qPCR 酶，客户仅需配合相应的 Bulge-Loop miRNA Primer set 及内参（如 U6，5S）即可进行高效检测。

表 1 试剂规格内容

| Reagent (In tube)                       | C10211-1<br>(20T RT + 60T qPCR) | C10211-2<br>(100T RT + 300T qPCR) | C10211-3<br>(500T RT + 1500T qPCR) |
|---|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| RTase Mix                               | 40 $\mu$ L                      | 200 $\mu$ L                       | 1 mL                               |
| 5 $\times$ Reverse Transcription Buffer | 40 $\mu$ L                      | 200 $\mu$ L                       | 1 mL                               |
| 2 $\times$ SYBR Green Mix               | 600 $\mu$ L                     | 1 mL $\times$ 3                   | 1 mL $\times$ 15                   |

## 运输保存

产品需低温运输。收到产品后，请于-20 $^{\circ}$ C保存，可以稳定保存一年。

## 使用前需知

- 1) 为避免外界因素(包括酶，极端 pH 或者温度条件等)导致相关实验样品或试剂降解，所有操作请严格遵循 DNA 和 RNA 操作规程。
- 2) 实验过程中，样品及试剂应于冰上放置，使用完毕后请于-20 $^{\circ}$ C以下小心保存；RTase Mix 应于使用时方从-20 $^{\circ}$ C取出使用，取液后立即放回-20 $^{\circ}$ C保存；2 $\times$  SYBR Green Mix 需注意避光使用。
- 3) 使用前请瞬时离心再开盖，以免试剂粘附于管壁或管盖上，造成损失或污染。
- 4) 逆转录酶较粘稠，取样体积小，需特别注意移液器取样操作规范。
- 5) 实验时请佩戴一次性手套等防护用品。
- 6) 本试剂盒仅供科研实验使用，不可用于临床检测或治疗。

## 实验材料准备

RNA 模板

目标 miRNA 及参照基因 Bulge-Loop miRNA qRT-PCR 引物

实时定量 PCR 仪

适用于实时定量 PCR 检测的 PCR 管或 PCR 板及无核酸酶移液器吸头

## 实验方法

## 1. miRNA RT 反应

- 1) 取 Bulge-Loop miRNA RT Primer (20  $\mu$ M)，加入适量 RNase-free H<sub>2</sub>O，配置成 Bulge-Loop miRNA RT Primer (5  $\mu$ M)。
- 2) 推荐以 10 $\mu$ L RT 反应体系进行实验：

表 2 逆转录反应体系（冰上配制）

| Reagent                                 | 10 $\mu$ L 体系 | 终浓度        |
|---|---------------|------------|
| RNA Template (1 $\mu$ g total RNA)      | x $\mu$ L     |            |
| Bulge-Loop miRNA RT Primer (5 $\mu$ M)  | 1 $\mu$ L     | 500 nM     |
| 5 $\times$ Reverse Transcription Buffer | 2 $\mu$ L     | 1 $\times$ |
| RTase Mix                               | 2 $\mu$ L     |            |
| RNase-free H <sub>2</sub> O             | 至 10 $\mu$ L  |            |

以上体系混匀后，瞬时离心，RT 反应程序为：42 $^{\circ}$ C 60 分钟，70 $^{\circ}$ C 10 分钟。

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 200 nM~800 nM 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 $^{\circ}$ C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  $\mu$ L 反应体系建议不超过 5  $\mu$ g 的 total RNA，不同类型样品的 RNA 用量差异很大，请根据具体实验调整 RNA 模板用量。

## 2. miRNA qPCR 反应

1) 按下表配制 20  $\mu$ L qPCR 反应体系：

注：1) SYBR Green Mix：包括 Taq 酶、dNTP mix、PCR Buffer、SYBR Green I 等；2) 96 孔 PCR 板建议使用 20  $\mu$ L qPCR 反应体系进行实验。

表 3 qPCR 反应体系（冰上配制）

| Reagent                                     | 20 $\mu$ L 体系 | 终浓度        |
|---|---------------|------------|
| 2 $\times$ SYBR Green Mix                   | 10 $\mu$ L    | 1 $\times$ |
| RT Product                                  | 2 $\mu$ L     |            |
| Bulge-Loop miRNA Forward Primer (5 $\mu$ M) | 0.8 $\mu$ L   | 200 nM     |
| Bulge-Loop Reverse Primer (5 $\mu$ M)       | 0.8 $\mu$ L   | 200 nM     |
| ddH <sub>2</sub> O                          | 至 20 $\mu$ L  |            |

注：①cDNA 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 的特异序列相匹配，与 miRNA 无关。U6 或 5S 内参需用各自特异的 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<sup>™</sup>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（如 C00109），具体使用方法请参考仪器说明及 ROX 染料试剂说明。

2) 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 4 qPCR 反应程序

| 循环          | 步骤     | 温度                              | 时间    | 内容       |
|-------------|--------|---------------------------------|-------|----------|
| 1 $\times$  | 预变性    | 95 $^{\circ}$ C                 | 10 分钟 | Taq 酶激活  |
| 40 $\times$ | 扩增反应   | 95 $^{\circ}$ C                 | 2 秒   | PCR 模板变性 |
|             |        | 60 $^{\circ}$ C                 | 20 秒  | 退火       |
|             |        | 70 $^{\circ}$ C                 | 10 秒  | 延伸并收集信号  |
| 1 $\times$  | 熔解曲线分析 | 70 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C-95 $^{\circ}$ C，升温速率为 0.5 $^{\circ}$ C/次，恒温时间为 5 秒/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                                      |
|------------------------|---|
| 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>   | Bulge-Loop microRNA Primer Set            |
| Variant <sup>2</sup>   | miDETECT miRNA qRT-PCR Standard RNA       |
| C00109 <sup>2</sup>    | ROX Reference Dye                         |
| C11096 <sup>2</sup>    | riboENZYME 2 $\times$ SYBR Green qPCR 预混液 |
| C11071-1               | riboEXTRACT 总 RNA 提取试剂, 50 mL             |

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/和规格不同编号不同。