

miDETECT A Track™ miRNA qPCR Primer 使用说明

RN: R11071.3

产品简介

miDETECT A Track™ miRNA qPCR Primer 为搭配 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR 系统使用的 miRNA 特异性正向引物，结合 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR 系统加尾和逆转录得到的 cDNA 及通用反向引物 miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer 即可进行 miRNA 特异性 qRT-PCR 检测。

表 1 试剂规格内容

Reagent (In tube)	100 Test	Storage
miDETECT A Track™ [miRNA###] Forward Primer	1 nmol (20 μM × 50 μl)	-20°C

注：miRNA##代表相应的 miRNA 名称。

运输保存

产品以 20μM 水溶液的形式提供，常温运输，于-20°C 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 ddH₂O，稀释成 10μM 引物工作液，分装保存以减少反复冻融。

表 2 10μM 引物储存液的配置参考

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

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 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°C 以下小心保存。

2) 为了进行实验样品之间相对定量分析，人、小鼠、大鼠源的 miRNA qRT-PCR 实验可用 U6 snRNA、5S rRNA 作为内参基因(细胞样品或以细胞为主要成分的组织样品)，建议选择 miDETECT A Track™ U6 Forward Primer 或 miDETECT A Track™ 5S Forward Primer 进行内参基因检测。其它物种相对定量的内参基因请自行选择，可提供基因序列由锐博生物设计适合搭配 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR 系统使用的特异性正向引物

3) 如果需进行定量标准曲线测定，则需定制相应的 miDETECT™ miRNA qRT-PCR Standard RNA 作为标准品进行检测。

4) 血浆或血清的 miRNA qPCR 检测需要加入外参，通常采用线虫 miRNA (cel-miR-39-3p) 或植物 miRNA (ath-miR156a-5p)。

5) 推荐搭配锐博生物的配套试剂盒 miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit 进行检测，其他公司的 qPCR 试剂盒请自行判断及测试使用效果。

实验方法

以下是搭配锐博生物的配套试剂盒 **miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR Starter Kit** 进行检测的实验方法。

1. Poly(A) Tailing

- 1) 冰上制备反应体系，按表 3 的配制比例配制所需的反应体系：

表 3 polyA 加尾反应体系（冰上配制）

试剂	用量(10 μ L 体系)
Total RNA	1 μ g
5X Poly(A) Polymerase Buffer (blue)	2 μ L
Poly(A) Polymerase (red)	1 μ L
RNase-free water	Up to 10 μ L

注：①RNA 模板可使用 total RNA、富集过的小分子 RNA 及化学合成的 miRNA 标准品等，若使用 miRNA 标准品作为 RNA 模板，请参考 miRNA 标准品说明书；②体系可按照需求放大，20 μ L 反应体系建议不超过 5 μ g 的 Total RNA。

- 2) 混匀上述反应体系，37 $^{\circ}$ C 反应 1 h；
- 3) 反应完成后置于冰上备用或者于 -80 $^{\circ}$ C 保存。

2. 逆转录反应

- 1) 冰上制备逆转录反应体系，按表 4 的配制比例配制所需的反应体系：

表 4 加尾产物逆转录反应体系（冰上配制）

试剂	用量
RTase mix (yellow)	4 μ L
5X RTase Buffer (violet)	4 μ L
miDETECT A Track™ Uni-RT Primer	2 μ L
Poly(A) Tailing 产物	10 μ L

- 2) 混匀上述反应体系，42 $^{\circ}$ C 反应 1 h，然后于 72 $^{\circ}$ C 孵育 10 min；
- 3) 反应完成后所得 cDNA 置于冰上备用或者于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

3. qPCR 反应

- 1) 冰上制备 qPCR 反应体系，按表 5 的配制比例配制所需的反应体系：

表 5 qPCR 反应体系（冰上配制）

试剂	用量
miDETECT A Track™ miRNA Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ L
miDETECT A Track™ Uni-Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ L
2X SYBR Green Mix (brown)	10 μ L
cDNA	2 μ L
RNase-free water	Up to 20 μ L

注：①cDNA 最高使用不稀释的逆转录产物 2 μ L (20 μ L 体系)，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；②C10711 及 C10712 试剂盒中的 2X SYBR Green Mix 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，需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），使用三步法进行 qPCR 反应（表 6）：

表 6 qPCR 反应程序

步骤	程序	循环数
1	95 °C 10 min	1
2	95 °C 2 s	40
	60 °C 20 s	
	70 °C 10 s	
3	融解曲线生成	1

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 7 相关产品

产品编号	产品名称
C10712-1	miDETECT A Track™ miRNA qRT-PCR starter kit (20T+ 20T+200T)
C10711	miDETECT A Track™ miRNA qPCR Kit (200T qPCR)
miRAN0001 ¹	miDETECT A Track™ 5S Forward Primer
miRAN0002 ¹	miDETECT A Track™ U6 Forward Primer
miRAN0004 ¹	miDETECT A Track™ h-SNORD48 Forward Primer
miRAN0005 ¹	miDETECT A Track™ h-SNORD44 Forward Primer
Variant ²	miDETECT™ miRNA qRT-PCR Standard RNA

注：1，常用内参基因正向引物，其中 miRAN0001 和 miRAN0002 适用于人、小鼠、大鼠细胞样品或以细胞为主的组织样品，miRAN0004 和 miRAN0005 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。

1, 是否可以搭配其他公司的逆转录引物、反向引物及试剂盒?

- 1) 正向引物可能可以搭配其它加尾法试剂盒使用, 效果未知且不能保证;
- 2) 此外, 逆转录引物与反向引物需搭配使用, 无法各自搭配其它供应商引物。

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) 出现溶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) 进行加尾、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 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°C 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。