

## All-in-One<sup>TM</sup> miRNA Q-PCR Detection Kit      Version 2. 2009

产品编号: R0101S (20 次反应装)

R0101L (50 次反应装)

产品内容:	产品编号	R0101S	R0101L
2.5U/μl PolyA Polymerase	A02030A	20μl	50μl
RTase Mix	C02020A	20μl	50μl
5×Reaction Buffer	C02021A	100μl	250μl
ddH <sub>2</sub> O(RNase/DNase free)	C10230A	1ml	1ml
2×AllinOne <sup>TM</sup> Q-PCR Mix	D01010A	1ml×2	1ml×5
50×ROX Reference Dye	D01011A	80μl	200μl
100μM Universal Adaptor PCR Primer	P01011A	20μl	50μl

储存条件: -20 °C 保存

### ■ 概述

microRNA(miRNA)是一类有大约 22 个核苷酸组成的非编码小分子 RNA, 其广泛存在于真核生物中。miRNA 在个体发育的不同时期及不同组织中有不同的表达模式, 都表明了其在发育和分化中起有重大的调控作用。

迄今为止, 对 miRNA 的检测方法主要有 Northern Blot 等基于分子杂交的方法, 这些方法敏感度低、耗时长、RNA 的用量较大。miRNA Q-PCR Detection Kit 采用了国际上公认的核酸检测标准技术——Real-Time PCR 技术来对 miRNA 进行检测, 其具有快速、特异性强、灵敏度高等优点。

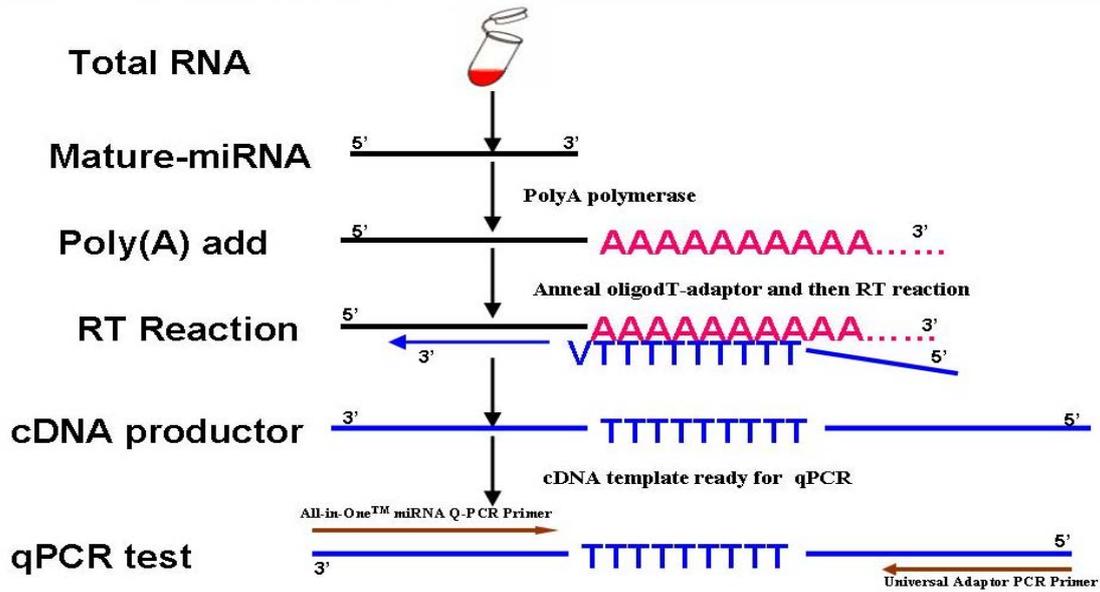
miRNA Q-PCR Detection Kit 通过 Poly A Polymerase 对 miRNA 3' 端进行加“Poly A”处理, 同时利用 M-MLV RTase 及独特的 Oligo dT Adaptor 对 Poly A 化的 RNA 进行反转录, 最后采用含有 SYBR Green 的 AllinOne<sup>TM</sup> Q-PCR Mix 对 miRNA 进行特异性检测。

该试剂盒中包含有 miRNA 检测所需要的所有试剂, 客户仅需要提供 RNA、miRNA 检测的上游引物及相关的仪器 (如恒温仪、定量 PCR 仪等) 即可进行检测实验。

### ■ 注意事项

1. 产品应在-20°C 储存, 避免在 4°C 或室温存放。
2. 使用前应缓慢颠倒混匀试剂, 避免起泡, 并经短暂离心后再使用。
3. 为防止 RNase 污染, 请严格按照使用说明书来进行操作。

■ 试剂盒工作原理示意图



■ 详细操作流程

RNA 样品操作前的准备工作

为避免 RNase 对 RNA 样品的污染，所有实验要严格遵守 RNA 操作的要求，在实验前需准备高温高压灭菌的微量离心管和移液枪头（如有条件，尽可能使用 DEPC 处理的耗材）；在实验操作中，需戴口罩和一次性橡胶手套；所有反应液的配制等都需在冰上完成。

1. miRNA 反转录

- a. 融解 miRNA 反转录所需的试剂，上下轻微颠倒混匀，短暂离心后放置冰上待用。
- b. miRNA 反转录反应液的配制

在冰上的预冷 RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积 25 $\mu$ l

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA		2 $\mu$ g
或小分子 RNA		100ng
2.5U/ $\mu$ l PolyA Polymerase	1 $\mu$ l	2.5U
RTase Mix	1 $\mu$ l	
5 $\times$ Reaction Buffe	5ul	1 $\times$
ddH <sub>2</sub> O(RNase/DNase free)	补至 25 $\mu$ l	

※ 在反应中使用的 total RNA 必须含有小分子 RNA。

※ Total RNA 使用量可在 1ng~5 $\mu$ g 之间调整，如使用纯化的小分子 RNA，其使用量可在 0.1ng~1 $\mu$ g 之间调整。

c. 反转录反应

混匀配制的反应 mix，短暂离心后在 37℃ 反应 60min，结束后再进行 85℃ 5min 灭活处理。所得的反转录产物可用灭菌水稀释 5~50 倍进行下游 qPCR 实验或直接 -20℃ 保存。

## 2. Q-PCR 检测 miRNA.

a. miRNA 检测引物设计或订购

All-in-One™ miRNA Q-PCR Detection Kit 中已提供有 miRNA 检测的反向通用引物“Universal adaptor PCR Primer (Tm=64.5, GC%=50%)”，客户仅需自行设计或直接订购经实经验证的特异 miRNA 的 Forward 检测引物 ([www.fulengen.com/product/qpcr/detection\\_system](http://www.fulengen.com/product/qpcr/detection_system)) 即可进行实验。

因为 miRNA 序列长度一般都在 18~24nt 之间，所以对于一些简单的 miRNA 检测引物的设计可直接选其 miRNA 序列作为检测引物，但对于特殊 miRNA (如 Tm 偏高或偏低的 miRNA、同源性高的 miRNA) 或特殊组织内的 miRNA (如 Pre-miRNA/Pri-miRNA 含量高的组织)，则需对检测引物进行一定的优化处理，才能得到特异性扩增并防止 Pre-miRNA/Pri-miRNA 干扰的目的

b. 融解 2×All-in-One™ Q-PCR mix(如有必要，融解 50×ROX Reference Dye)上下 轻微颠倒混匀，短暂离心后放置冰上待用。

c. 冰上进行 Q-PCR 反应液的配制 (例)

试剂组分	体积	终浓度
2×All-in-One™ Q-PCR Mix	10μl	1×
All-in-One™ miRNA Q-PCR Primer (2μM)	2μl	0.2μM
Universal Adaptor PCR Primer (2μM)	2μl	0.2μM
1 <sup>st</sup> strand cDNA (diluted 1:5)	2μl	
ddH <sub>2</sub> O	4μl	
Final Volume	20μl	

- ※ 2×All-in-One™ Q-PCR Mix 设定为总反应体积的一半，其它组分请按最适比例进行调整。如需变更总反应体积，请保持最适条件下各组分比例。
- ※ Rox Reference Dye 使用在需要用 Rox 校正的 Real-Time PCR 仪，如 ABI 的定量 PCR 仪。
- ※ 引物终浓度可在 0.2μM~0.4μM 范围内调整，一般条件下 0.2μM 的量即可达到理想的效果。
- ※ 1<sup>st</sup> Strand cDNA 通常需要稀释后再使用，防止反转录体系对 Q-PCR 体系的影响。

d. 充分混匀 Q-PCR 反应液，添加至 PCR 反应管中，短暂离心，确保所有试剂到反应管底部。

e. Q-PCR 反应，建议使用标准的三步法进行检测（以 Bio-Rad 的 iQ5 为例）

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95°C	10min	否
40	变性	95°C	10sec	否
	退火	Tm-2°C	20sec	否
	延伸	72°C	10sec	是

对于用 SYBR Green 染料法进行的 Q-PCR 检测的反应都需要在循环结束后立即进行融解曲线分析（以 Bio-Rad 的 iQ5 为例）

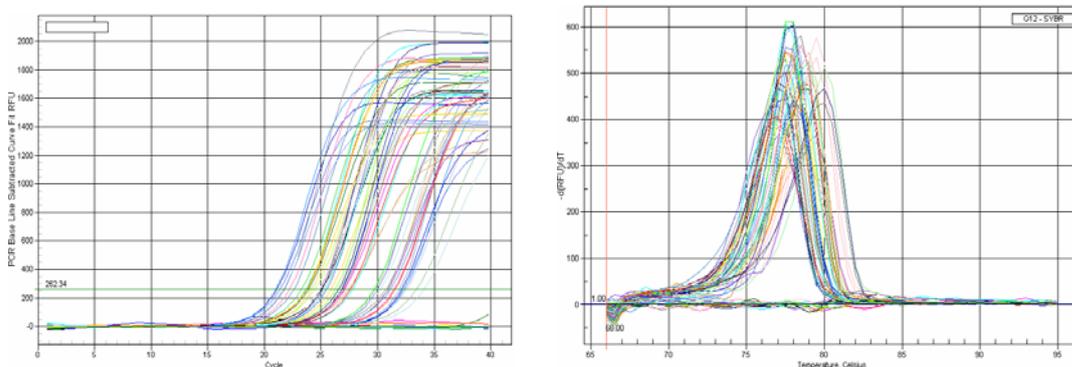
检测温度范围	升温速率	恒温时间	检测
66°C~95°C	0.5°C/次	6 sec/次	是
30°C		30sec	否

- ※ 2×All-in-One™ Q-PCR Mix 中采用的DNA聚合酶为经过特殊修饰的热启动酶，95°C 10min 能充分的激活酶活性。
- ※ 因 miRNA 的特殊性从而导致了其引物的特殊性，在检测时应严格控制退火温度，防止出现非特异性扩增。如为订购的 miRNA 引物，可直接参考提供的最佳优化条件进行实验
- ※ 进行反转录的 Oligo dT Adaptor 其长度为 53nt，为此 PCR 扩增得到的片段长度一般在 75bp 左右（miRNA 序列一般为 22nt 左右），所以延伸只需 10sec 即可。对产物的融解曲线判断可以发现其 Tm 值一般都在 75°C~81°C 范围内，如果超出此范围，建议使用别的方法来验证产物的特异性（如电泳）。
- ※ 以上的反应条件主要参考的为 Bio-Rad 的 iQ5 定量 PCR 仪器，如使用的为不同公司的定量 PCR 仪，请按照不同的仪器要求，调整延伸时间及其融解曲线分析的条件。

## ■ 实验示例

### 示例 1: All-in-One™ miRNA qPCR Detection Kit检测的特异性实验

取 200ng 人脑和心脏混合而成的Total RNA 为模板，利用miRNA qPCR Detection Kit 及其All-in-One™ miRNA Q-PCR Primer 检测 31 个miRNA及其内参snRNA U6，通过 qPCR及其电泳分析结果，均无非特异性扩增产物及其引物二聚体形成。



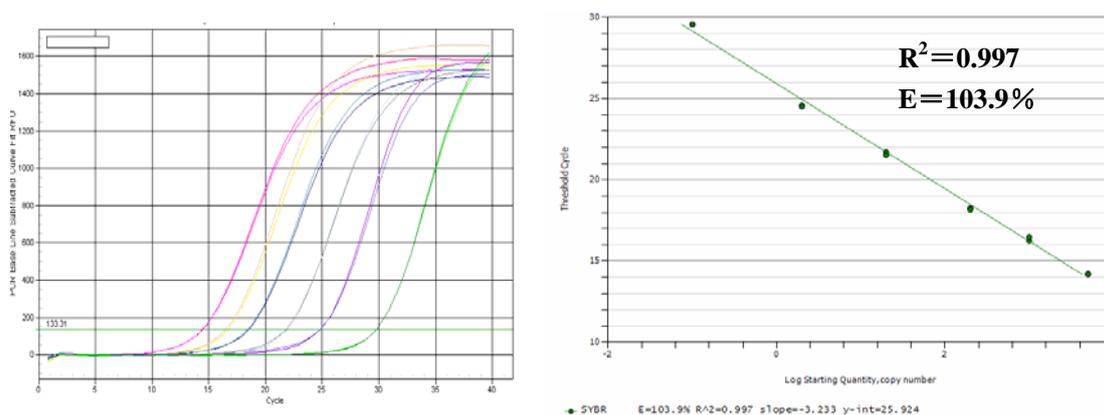
图示说明：31 个 miRNA 及其 U6 的 qPCR 扩增曲线及其融解曲线示意图，其中阳性对照为复孔检测，NTC（No template Control）为单孔检测



图示说明，31 个 miRNA 及其 SnRNA U6 扩增后的电泳检测结果（3%Agrose-Gel）,其中阳性对照为复孔检测，NTC 为单空检测。

### 示例 2: All-in-One™ miRNA qPCR Detection Kit检测的灵敏度实验

以不同量（5μg、1μg、200ng、20ng、2ng、100pg）的人脑总RNA为模板，利用 All-in-One™ miRNA qPCR Detection Kit来检测hsa-miR-124 的表达量，结果显示模板在 5μg~100pg的总RNA范围内都能得到良好的线性扩增



图示说明：不同量的人脑总RNA为模板，利用All-in-One™ miRNA qPCR Detection Kit来检测hsa-miR-124 的扩增曲线及其标准曲线示意图

## ■ 常见问题及其对策

### 1. miRNA 序列同源性问题

- ※ 因 miRNA 序列存在着片段较短且有部分序列同源性偏高的特殊性问题,从而导致了其引物设计的特殊性,为此在 miRNA Forward 引物设计时,要充分考虑 miRNA 检测的特异性问题。特别是单碱基的差别的 miRNA 序列,其检测对引物设计、合成及其反应条件的要求更高。

### 2. 扩增曲线混乱

- ※ 荧光收集温度设计不恰当,请调整合适的荧光收集温度。
- ※ 样品位置设定错误,请设定正确的样品位置再进行分析。
- ※ 尝试用 3.5% 的 Agrose gel 对 PCR 产物进行电泳观察可能为涂抹状条带,建议电泳检测引物的纯度或采用 PAGE 纯的引物进行测试,并尝试用苯酚抽提和乙醇沉淀等方法对样品进行纯化处理。

### 3. 融解曲线异常

- ※ 阴性对照 (No Template Control) 有信号
  - a. 如果阴性对照所对应融解曲线与阳性样品一致,说明 PCR 反应体系可能有污染或其为阳性样品,为此应首先排除其是否为加样误差,如仍有相同情况,应更换 PCR 级水、引物或启用新的 2×AllinOne™ Q-PCR Mix。
  - b. 对应融解曲线的 T<sub>m</sub> 值比阳性样品低,说明可能产生了引物二聚体等非特异性扩增,为此建议 PCR 反应体系的配制在冰上进行、并提高荧光采集温度。如果阴性对照其 Ct 值 >35 并与阳性样品 Ct 值相差 5 以上,可以判定此 PCR 反应体系合格,如不能达到,建议重新合成引物或优化反应条件。
- ※ 阳性样品的融解曲线出现双峰或多峰  
在排除一个样品反应孔中添加有其它检测引物的情况下,阳性样品的融解曲线出现双峰或多峰现象,说明其有非特异性扩增的产生,建议 PCR 反应体系在冰上配制,并建议优化 PCR 条件如提高退火温度、降低引物浓度或提高荧光采集温度(最高不要超过目的产物的 T<sub>m</sub> 值)等,如仍存在此问题,建议重新优化设计 Forward 引物。

### 4. 无信号值 (Ct) 出现或 Ct 值较大

- ※ 是否有 PCR 产物存在,从而排除仪器检测设置问题。
- ※ 反应循环数不够。一般为 40 个循环,但高于 45 个循环会增加过多的背景信号。
- ※ 模板量不足、降解或模板中所检测序列含量低。建议对未知浓度的样品应从系列稀释样品的最高浓度做起,同时避免反复冻融样品。
- ※ 扩增效率低下,反应条件不够优化。设计更好的引物,优化反应条件。

## ■ 相关产品

All-in-One™ miRNA Q-PCR Primer	<a href="http://www.fulengen.com/product/qpcr/detection_system">www.fulengen.com/product/qpcr/detection_system</a>
miRNA 表达克隆	<a href="http://www.fulengen.com/product/mirna">http://www.fulengen.com/product/mirna</a>
miRNA 靶标表达克隆	<a href="http://www.fulengen.com/product/mirna">http://www.fulengen.com/product/mirna</a>

本产品仅限于实验科学用途,若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断,治疗等其他国家专门规定的特殊用途,本公司概不承担任何责任。



地址:广州高新技术产业开发区广州科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D区8楼, 510663  
客服电话:020-32068595 电子信箱:support@fulengen.com 网址:www.fulengen.com