



**GenePharma**

**GP Direct S-Poly(T) Plus miRNA qPCR-assay**



B041-V002-20200622

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

## 产品介绍:

Direct S-Poly(T) Plus 是一种不需提取核酸，直接以经简单处理的血清或血浆 (S/P) 为模板检测循环 microRNA (miRNA) 的实时荧光定量 RT-qPCR 方法, 主要包括: S/P 的预处理, miRNA 加尾及逆转录 (polyA/RT) 和 qPCR 定量检测三个步骤 (见图 1)。本方法使用由 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 (RT), 显著增强了 poly(A) tailed miRNA 与特异 RT 引物之间的结合力, 从而大幅度提高 cDNA 的合成效率及其特异性, 最终使后续 qPCR 检测的灵敏度提高至少一个数量级 (图 2)。为了在降低成本的同时进一步提高检测的特异性, 本公司对每一种 RT 引物做了优化设计, 实现了一次 RT 反应可同时对 11 个 miRNA 的特异性 RT, 并在后续 qPCR 反应中使用了 miRNA 特异上游引物 and 对应每个 RT 引物的特异下游引物、通用 Taqman 探针以及热启动直扩 HS-Taq 酶。本产品还针对 265 个循环 miRNA 进行了引物分组和测试, 制备了含有上下游特异引物的 PCR 预制板, 从而实现循环 miRNA 生物标志物的快速高通量筛选。

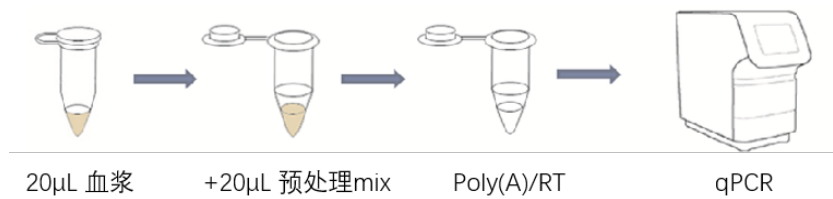


图 1. Direct S-Poly(T) Plus 主要流程

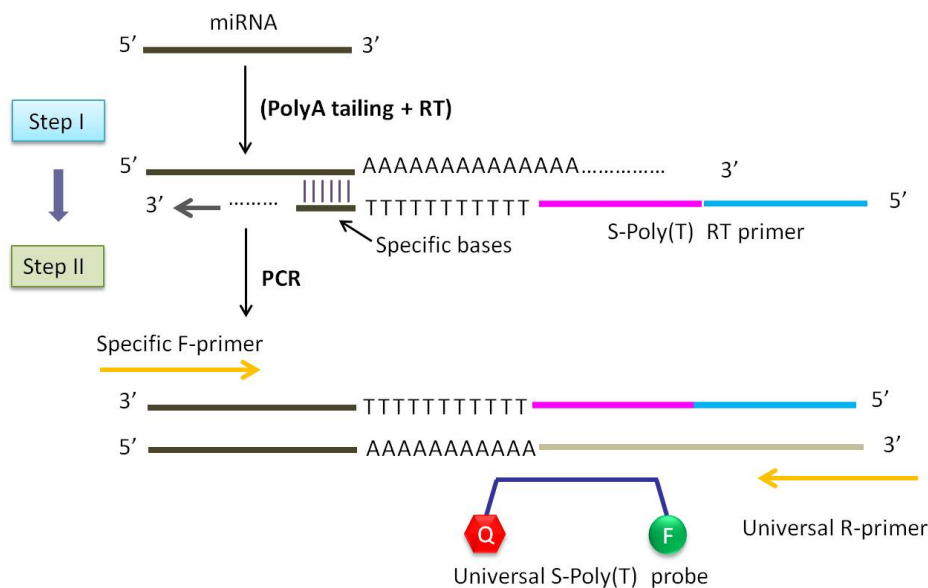


图 2. S-Poly(T) Plus 法检测 miRNA 原理图

## 产品特点:

- (1) **简单快速:** 直接用预处理的血浆或血清进行 RT-qPCR。
- (2) **降低成本:** 无需提取核酸, 使检测成本显著降低。
- (3) **微量样品:** 检测一个 miRNA 最多不超过 1 $\mu$ L 血浆。
- (4) **减少污染:** 不使用提取核酸所必需的有机试剂, 极大的减少污染。
- (5) **避免丢失:** 不提取核酸可以有效防止因提取造成的丢失现象。
- (6) **高特异性:** 使用特异的 S-Poly(T)引物进行 RT 反应, 最大程度的提高 cDNA 合成的效率和特异性; 此外, PCR 过程使用特异的 miRNA 上游引物及与每一种 RT 引物对应的特异下游引物, 进一步保证扩增反应的特异性。
- (7) **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 20 倍以上。与提取核酸的 S-Poly(T) Plus 方法相比, 按照等量的血浆计算, Direct S-Poly(T) Plus 检测循环 miRNA 的灵敏度更高。
- (8) **数据归一化简单:** 适合用等体积样本进行数据归一化处理, 结果更可靠。
- (9) **技术门槛低:** 操作简单, 对技术人员的要求不高。

## 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 $\times$ Reaction Buffer Mix	50 $\mu$ l	100 $\mu$ l	250 $\mu$ l
	PolyA/RT Enzyme Mix	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Probe Premix HS-Taq	4 $\times$ PCR Buffer *	500 $\mu$ l	1000 $\mu$ l	2500 $\mu$ l
	100 $\times$ ROX Reference Dye	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l
	HS Taq	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l
S-Poly(T) <sup>plus</sup> miRNA qPCR-assay primer set	20 $\times$ probe & PCR primers	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	500 $\mu$ l
	10 $\times$ miRNA RT primer	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l
Direct lysis Kit	Lysis Buffer	400 $\mu$ l	800 $\mu$ l	2000 $\mu$ l
	Lysis Enzyme	20 $\mu$ l	40 $\mu$ l	100 $\mu$ l

\* 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 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。

---

## 使用方法:

### (1) S/P 预处理 (在冰上操作)

Component	Volume ( $\mu$ l)
S/P	20 $\mu$ l
Lysis Buffer	20 $\mu$ l
Lysis Enzyme	1 $\mu$ l
<b>Total volume</b>	<b>41 <math>\mu</math>l</b>

混匀后, 50 °C 15 分钟, 95 °C 5 分钟; 4 °C 下 13000 rpm 离心 5 分钟, 上清为 crude RNA, 建议立即进行下一步实验。此法 20  $\mu$ l 血浆至少可以提取出满足 6 个 RT 体系使用的 crude RNA, 最多可以检测 66 个 miRNAs。

### (2) 一步 PolyA 加尾和逆转录反应 (在冰上操作)

Component	Volume ( $\mu$ l)
crude RNA	4
4 $\times$ Reaction Buffer Mix	2.5
PolyA/RT Enzyme Mix	1
10 $\times$ RT primer Mix*	1
RNase-free Water	Up to 10
10 $\times$ Spike-in Cel-54	1*
<b>Total volume</b>	<b>10</b>

\* 如需加入外参基因建议加入外参基因的同时加入 1 $\mu$ l 0.5  $\mu$ M 外参 RT primer。

37 °C 保温 20 分钟, 42 °C 保温 20 分钟, 75 °C 加热 5 分钟, 冰上放置 5 分钟。

### (3) 荧光定量 PCR (Real-Time PCR)

Component	Volume ( $\mu$ l)
4 $\times$ PCR Buffer	5
HS-Taq (5U/ $\mu$ l)	0.2
Rox Reference Dye (100 $\times$ )*	0~0.2
20 $\times$ probe & PCR primers**	1
cDNA***	X
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20
<b>Total volume (<math>\mu</math>l)</b>	<b>20</b>

\* Rox Reference Dye 的使用方法请参考附录 2。

\*\* 已包含相应的 F primer 与 R primer。

\*\*\* 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  $\mu$ l 加入荧光定量 PCR 反应。

#### (4) Real-time PCR 反应程序

95°C 10 min	1 Cycle
95°C 10 sec 60°C* 30 sec	40 Cycles

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

##### Q1: 没有扩增曲线或 Ct 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。
血浆处理方法不当	更换裂解酶。
加尾/反转录酶失活	加尾/反转录酶应当在 -20°C 保存，加样过程始终在冰上。
目的 miRNA 表达水平低	建议用提取的方法富集核酸。。

##### Q2: PCR 复孔重复性不好

原因分析	解决办法
预处理 S/P 含有较多抑制剂	用提取 RNA 的方法进行检测。
加样误差	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 $\mu$ l), 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 71~77 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。

### Q3: 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	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4 *
Human	Snord44	Snord47	U6	Cel-miR-54-5p
Mouse	snoRNA202	snoRNA234	U6	Cel-miR-54-5p
Rat	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 $\times$ Rox Reference Dye/20 $\mu$ l Reaction
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT 和 7900HT Fast, ABI Step One, Step One Plus	0.2 $\mu$ l
ABI 7500, 7500 Fast, Stratagene Mx3000P, Mx3005P Mx4000, Research Chromo4, Opticon (II), Corbett Rotor Gene 3000	0.02 $\mu$ l
Thermo Cycler Dice™ Real Time System Single, LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics), CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	不需要