GenePharma

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

B032-V002-20200622

吉玛基因

S-Poly(T) Plus miRNA qPCR-assay 使用说明书

产品介绍：

S-Poly(T) plus 方法融合了 Stem-loop 法和 Poly(A)加尾法的优点，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，增强了引物与 miRNA 模板的锚定力度和热稳定性，从而大幅度提高 miRNA 的逆转录及后续 qPCR 效率（**图 1**）。逆转录产物用 miRNA 特异上游引物、通用下游引物、通用 Taqman 探针以及热启动酶进行 qPCR 检测。本产品能灵敏、特异、准确地对细胞系、组织、血清等样品中 miRNA 的表达水平进行定量检测。本产品覆盖 miRBase 数据库（V22.0）中人、小鼠、大鼠、猪、牛、羊、斑马鱼、鸡、病毒的全部成熟 miRNA。

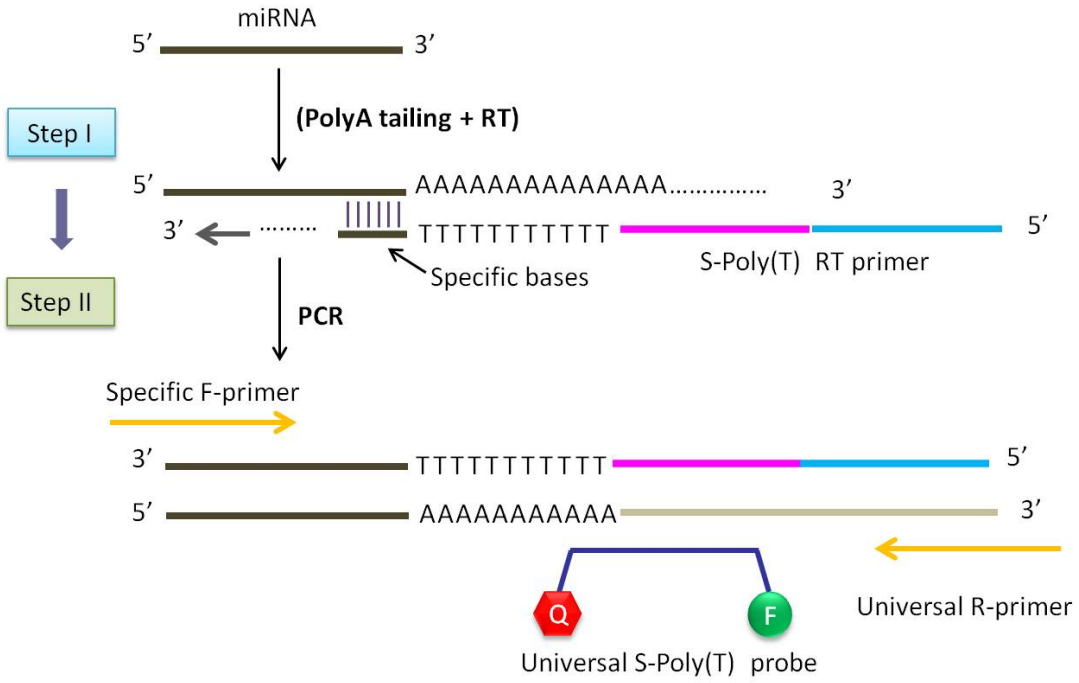

图 1. S-Poly(T) Plus 法检测 miRNA 原理图

产品特点：

（1） **高特异性**。S-Poly(T) plus 法能有效区分只有 1 个碱基差异的 miRNA，还能较好地区分成熟 miRNA 与 pri-、pre-miRNA；并且使用热启动酶进行 PCR 反应，可以大幅减少加样及反应过程中的非特异结合。

（2） **高灵敏性**。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 10 倍。

（3） **线性范围广**。本产品能在宽广的范围内获得准确的标准曲线；同时检测重复性好，可信度高。

制品内容:

分类	名称	规格		
		20RT/ 100PCR	40RT/ 200PCR	100RT/ 500PCR
One Step miRNA cDNA Synthesis Core Reagent	4 × Reaction Buffer Mix	50 μl	100 μl	250 μl
	PolyA/RT Enzyme Mix	20 μl	40 μl	100 μl
Probe Premix HS-Taq	4 × PCR Buffer *	500 μl	1000 μl	2500 μl
	100 × ROX Reference Dye	20 μl	40 μl	100 μl
	HS-Taq	20 μl	40 μl	100 μl
S-Poly(T)^{plus} miRNA qPCR-assay primer set	20 × probe & PCR primers **	100 μl	200 μl	500 μl
	10 × miRNA RT primer	20 μl	40 μl	100 μl

* 内含 PCR buffer，Mg^{2+}，dNTP Mixture 等。

** 内含探针，特异上游引物，通用下游引物。

储存条件: -20℃保存，避免反复冻融。

使用方法:

（1） 一步 PolyA 加尾和逆转录反应 (在冰上操作)

Component	Volume (μl)
Total RNA*	Variable (1 ng~1 μg)
4×Reaction Buffer Mix	2.5
PolyA/RT Enzyme Mix	1
10×miRNA RT primer **	1
RNase-free Water	Up to 10
Total volume	**10**

* 对于从血清、血浆、尿液等材料中提取的 RNA 样品，如浓度较低，可按最大体积量来添加。建议使用本公司生产的 S/P RNAiso kit (Cat. No. AB-MIS-001)来提取体液样本 miRNA，RNA 回收效率可提高数倍。

** **建议同时加入等量内参基因 RT primer 进行逆转录**，从而减少定量检测的误差。内参基因信息请查看附录 1。

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

（2） 荧光定量 PCR （Real-Time PCR）

Component	Volume (μl)
4×PCR Buffer	5
HS-Taq	0.2
Rox Reference Dye (100×)*	0~0.2
20×probe & miRNA PCR primer **	1
cDNA***	X
dH_2O	Up to 20
Total volume (μl)	**20**

* Rox Reference Dye 的使用方法请参考附录 2。

** 探针荧光基团(reporter)：FAM，淬灭基团(Quencher)：None。

*** 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 μl 加入荧光定量 PCR 反应。

（3） Real-time PCR 反应程序

95℃ 10 min	1 Cycle
95℃ 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 ΔΔCt 值法，也可以使用相对标准曲线法。

（1）ΔΔCt 值法

1) 去除 Ct 值 >35 的值，剩余的复孔取平均值（AVG）；
2) 计算 ΔCt 值。ΔCt = AVG（检测的 miRNA）– AVG（内参基因）；
3) 计算 ΔΔCt 值。ΔΔCt = ΔCt (处理组) – ΔCt (对照组)；
4) 计算倍数变化(fold change)。fold change = 2^-ΔΔCt。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)。fold change =“处理组”归一化的 miRNA 相对表达水平 / “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。
提取的 RNA 含有较多的抑制剂	更换 RNA 提取试剂盒。
反转录酶失活	反转录酶应当在-20℃保存，加样过程始终在冰上进行。
目的 miRNA 表达水平低	RNA 用量，并增加 qPCR 的 cDNA 模板量。

Q2: PCR 复孔重复性不好

原因分析	解决办法
提取的 RNA 含有较多的抑制剂	更换 RNA 提取试剂盒。
加样误差	应尽可能配制 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 μl），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，则为非特异扩增。

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	增加 RNA 用量，并增加 PCR 反应中 cDNA 的模板量。
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	Normalization control 1	Normalization control 2	Normalization control 3	Normalization control 4 *
Homo sapiens	Snord44	Snord47	U6	Cel-miR-54-5p
Mus musculus	snoRNA202	snoRNA234	U6	Cel-miR-54-5p
Rattus norvegicus	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×Rox Reference Dye/20 μl Reaction
ABI PRISM 7000/7300/7700/7900HT 和 7900HT Fast，ABI Step One Plus	0.2 μl
ABI 7500，7500 Fast, Stratagene Mx3000P，Mx3005P Mx4000，Research Chromo4，Opticon (II)，Corbett Rotor Gene 3000	0.02 μl
Thermo Cycler Dice™ Real Time System Single，LightCycler/LightCycler 480 System (Roche Diagnostics)，CFX96 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)	不需要