



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

引物套装（染料法）操作说明

一、试剂组成及配制

试剂	纯化方式	净含量	溶液配制
RT Primer (特异性逆转录引物)	PAGE	粉剂 1 nmol×1 支	在管中加入 100 μL RNase-free H ₂ O 配制成 10 μM 储存液
PCR Primer set (PCR 引物对)	PAGE	粉剂 2 nmol×1 支	在管中加入 200 μL RNase-free H ₂ O 配制成 10 μM 储存液
RNase-free H ₂ O (去 RNA 酶水)		液体 1.5 mL×1 支	
备注:	干粉剂溶解前, 10000 r/min, 离心 15~30 s, 将干粉离心于管底。 引物溶液 4℃短期储存, 长期保存置于-20℃, 可保存 6 个月。		

二、操作步骤

1. 基因特异性逆转录反应体系的制备

A 在无 RNase 的离心管中混合下列试剂进行预变性

试剂	终浓度	加量/孔
RT primer (1 μM)	60 nM	1.2 μL
RNA Sample	1 μg	2 μL

B 加热 70℃, 5 min 后, 马上置于冰盒上*

C 按照下表提供的 20 μL 逆转录反应体系混合其他试剂

试剂	终浓度	加量/孔
5× MMLV RT Buffer	1×	4 μL
dNTP (10 mM)	0.375 mM	0.75 μL
RNasin (40 U/μL) (可选*)	0.5 U/μL	0.25 μL
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/μL)	40 U	0.2 μL
RNase-free H ₂ O		To 20 μL

D 运行 mRNA 逆转录程序: 42℃ 45 min, 85℃ 5 min, 4℃保存

运行 miRNA 逆转录程序: 26℃ 40 min, 42℃ 40 min, 85℃ 10 min, 4℃保存

注*: 根据用户具体需求, 步骤 B 可选择省略; RNasin 为非必需试剂, 请客户自备。

2. 染料法定量 PCR 20 μL 反应加样量体系^[1,2]

试剂	终浓度	加量/孔
2× Real-time PCR Master Mix (SYBR)	1×	10 μL
PCR Primer set (10 μM)	0.2 μM	0.4 μL
ROX reference dye (50×) (依据机器型号选择*)	1× or 5×	0.4 μL or 2 μL
Taq DNA polymerase (5 U/μL)	1 U	0.2 μL
RT product		2 μL
RNase-free H ₂ O		To 20 μL



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因
www.genepharma.com

3. 实时定量 PCR 反应程序

A: 一步法扩增 (推荐)

95°C 3 min, 1× 循环; 95°C 12 s, 62°C 40 s, 40× 循环, 采集荧光信号

B: 两步法扩增 (可选*)

95°C 3 min, 1× 循环; 95°C 12 s, 62°C 30 s, 72°C 30 s, 40× 循环, 采集荧光信号

注*: 用户可根据具体需求选择扩增反应程序, 操作步骤参考本公司荧光定量检测试剂盒。

三、数据计算

1. 进行荧光定量 PCR 反应得到每个反应的目标基因和内参基因的 Ct 值。

2. 计算样品和校正样品三复孔的平均值。

3. 目标基因的平均 Ct 值减去内参基因的平均 Ct 值, 计算各个样品的 ΔCt 值。

$$\Delta Ct (\text{试验样品}) = Ct (\text{试验样品目的基因}) - Ct (\text{试验样品内参基因})$$

$$\Delta Ct (\text{校正样品}) = Ct (\text{校正样品目的基因}) - Ct (\text{校正样品内参基因})$$

4. 试验样品的 ΔCt 值减去校正样品的 ΔCt 值, 计算得到各个样品的 $\Delta\Delta Ct$ 值。

$$\Delta\Delta Ct (\text{样品}) = \Delta Ct (\text{试验样品}) - \Delta Ct (\text{校正样品})$$

5. 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算相对基因表达比率, 参考文献^[3,4]

四、注意事项 (使用前请仔细阅读)

1. 本说明书操作步骤及反应体系均在本公司实验条件下研发, 如使用其他公司产品, 请以其说明书为准。
2. 由于本公司设计的 miRNA 是特异性茎环结构引物, 如果使用 miRNA 引物套装时, 逆转录一定要使用设计对应的特异逆转录引物 (RT Primer), 若使用其他逆转录引物, 引物效果将无法保障。miRNA 引物套装不适用通用逆转录引物如 random primer、oligo dT 等产物扩增检测。
3. 本说明书中 PCR Primer set 终浓度 0.2 μM 为推荐浓度, 可在 0.1-0.5 μM 范围内调整。
4. 建议退火温度 (62°C) 及反应程序, 可根据仪器设备、反应试剂等实际情况适当优化。
5. 建议样品用量: 1 μg 左右, 可根据 RNA 质量、目的基因丰度、反应试剂效率等实际情况进行优化调整; RT 产物建议稀释后使用 (一般稀释 5-10 倍)。
6. 在一次标准的基因特异性逆转录中, 逆转录引物的终浓度为 60 nM。此用量针对参考试剂盒提供的 MMLV 酶, 如果逆转录酶为客户自购, 请以其说明书为准。
7. ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差, Applied Biosystems 7000/7300/7500/7500 Fast/7900 Real-Time PCR System 建议配套 ROX 终浓度为 $1 \times (0.4 \mu\text{L})$, Applied Biosystems StepOnePlus™ Real-Time PCR System 建议配套 ROX 终浓度为 $5 \times (2 \mu\text{L})$, 其他品牌仪器不需要 ROX 校准。

参考文献:

1. Lai, N., Wu, D., Fang, X. et al. Serum microRNA-210 as a potential noninvasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma. Br J Cancer 112, 1241-1246 (2015)
2. Zhou, K., Zhang, C., Yao, H. et al. Knockdown of long non-coding RNA NEAT1 inhibits glioma cell migration and invasion via modulation of SOX2 targeted by miR-132. Mol Cancer 17, 105 (2018).
3. Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. Methods. 2008 Jan;44(1):31-8.
4. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8.

B043-V001B-20201229