

QM-Poly A miRNA qRT-PCR 引物使用说明

Poly (A) 加尾 miRNA qRT-PCR 是一种常用的 miRNA 表达量的检测方法。通用的加尾 Poly (A) 反转录原理，一次反转样品中的不同 microRNA，简单的一步法 cDNA 合成系统，无需复杂的操作，可使用同一 RNA 模板进行不同 microRNA 的定量检测，节省样品用量。QM-Poly A miRNA qRT-PCR Detection 试剂盒附带通用的 PCR 下游引物，只需设计特异性的 miRNA 上游引物即可，灵敏度高。该方法采用 SYBR Green 染料检测。

一、引物组成

试剂	浓度	储存条件	运输条件
Poly A miRNA FP (Forward Primer)	100 μmol/L	-20°C	常温运输
备注 1. 产品以100μmol/L的水溶液的形式提供，常温运输，于-20°C或更低温度储存，不反复冻融的情况下可稳定保存一年。 2. 使用前请瞬时离心引物，避免引物储存液粘附于管壁或管盖上。 3. 引物离心之后建议分装保存，减少多次反复冻融。 4. 稀释引物建议使用灭菌的ddH ₂ O或者RNA free water或DEPC水。 5. 取部分100 μmol/L的引物原液，例如取10ul的100 μmol/L的引物原液加入90ul的无RNAase水或DEPC水或灭菌的ddH ₂ O，吹打混匀，即可配置为10μmol/L的引物储存液用于后续qPCR使用。余下的100 μmol/L的引物原液-20°C保存即可。高浓度的引物更有利于引物的保存。			

使用前注意事项：

- 1) 在操作过程中，需注意避免（核酸酶 RNAase，温度，极端 PH 等）可能导致的产品降解。请遵循 RNA 及 DNA 的操作规范，带手套操作，ep 管，移液枪和枪头等都要避免污染，实验过程中，产品最好于冰上放置。
- 2) 对于细胞，组织样本（人，大鼠，小鼠）的 miRNA 相对定量检测分析，一般建议使用 U6 snRNA 等通用引物作为内参。其他物种的内参引物需客户自行选择确定。
- 3) 细胞上清/血浆/血清/尿液等及外泌体的 miRNA qPCR 检测需要在提取 RNA 前加入外参标准品 miRNA（常用外参标准品：cel-miR-39-3p）。细胞/组织等类型样本如不需要做绝对定量检测，一般无需添加外参。

实验方法

以下是搭配芊陌生物的配套试剂盒 QM-加尾法 miRNA qRT-PCR Detection Kit 进行检测试验的操作方法，若使用其它公司的 qRT-PCR 试剂盒，请参考对应试剂盒的操作说明书。

组分编号	组分名称	规格	RXN
QMS1020-1	QM polyA Enzyme Mix	25 μl	20T
QMS1020-2	QM polyA Buffer (2X)	100 μl	20T
QMS1020-3	2X Universal SYBR Green Fastq PCR Mix	2x1mL	200T
QMS1020-4	miRNA Uni-Reverse Primer (10 μM)	250 μl	500T
QMS1020-5	U6 Forward Primer (10 μM)	50 μl	100T
QMS1020-6	U6 Reverse Primer (10 μM)	50 μl	100T

QM-Poly A miRNA qRT-PCR Detection Kit 组分明细

polyA 加尾+逆转录 RT 反应

1. polyA加尾+RT反应体系

以 10ul polyA 加尾+RT 反应体系进行实验（冰上操作）：

试剂	加量/孔
RNA 模板(0.25~8ug)	? ul
QM polyA Buffer (2X)	5 ul
QM polyA Enzyme Mix	1.25 ul
无 RNAase 水/DEPC 水	补齐至 10ul

2. polyA加尾+RT反应条件

polyA加尾+RT反应体系混匀后，瞬时离心，RT 反应程序为：37℃反应60 分钟，85℃反应5分钟。反应后的产物加入90ul的无RNAase水/DEPC水，混匀，得到总体积100ul的cDNA模板，用于后续的miRNA qRT-PCR检测。

注意事项：

1. polyA 加尾+RT 反应体系可按照实验需求等比缩放。
2. RNA 模板体积较大时，请确保 RNA 是溶于水中而不是 TE Buffer 中，因为 TE 会抑制逆转录反应。
3. 逆转录产物 cDNA (polyA 加尾+RT 反应液)可立即进行后续 qPCR 反应，或置于-20 °C 保存并在 3 个月内使用；长期存放建议分装后在-80℃ 保存。cDNA 应避免反复冻融。

miRNA qPCR 反应（冰上操作）

染料法定量 PCR 20 μL 反应加样量体系（推荐以 20ul qPCR 反应体系进行实验）

试剂	终浓度	加量/孔
2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix	1×	10 μL
Poly A miRNA FP (10 μmol/L) / U6 Forward Primer (10 μmol)	0.2 μmol/L	0.4 μL
miRNA Uni-Reverse Primer (10 μmol/L) / U6 Reverse Primer (10 μmol)	0.2 μmol/L	0.4 μL
RT product （建议100pg-50ng之间为佳）		? μL
无RNAase水/DEPC水		补至 20 μL

注 意 事 项：

- 1: 配制好反应体系轻轻混匀上述反应体系（避免剧烈涡旋振荡）
- 2: Forward Primer, Reverse Primer 初始反应浓度推荐使用 200nM，最佳浓度可以在 100nM~800nM 之间优化；。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，并优化反应体系。
- 3: DNA最高使用量不宜超过 qPCR 反应体系的 1/10，对于表达丰度较高的miRNA，可将 cDNA 稀释后再进行qPCR，一般稀释比例可以在 10~1000 倍之间，请根据具体的Ct 值进行调整。
- 4: 该miRNA qPCR反应程序适用于市面上所有型号的荧光定量PCR仪器（包括HighROX、LowROX以及NoROX需求的仪器），无需额外添加ROX。
- 5: miRNA Uni-Reverse Primer为miRNA通用引物，但不可用于U6/5S，U6/5S需用对应的U6/5S的Reverse Primer。
- 6: 2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix在使用前请充分溶解，避免强光直射，并注意避光保存。

7: 2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix中含有甘油, 在使用前请轻轻混匀, 避免产生气泡; 取用之前应混匀并离心。使用后应立即放回-20°C冰箱保存。

8: 2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix含有DNA聚合酶, 使用时请置于冰上, 短时间内多次使用可在4°C暂存, 应尽量避免反复冻融。

实时定量 PCR 反应程序

客户可依据具体需求以及结合日常 qPCR 常用程序选择二步法或者三步法来进行 qPCR 反应。

二步法qPCR程序设置如下:

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95°C	3 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95°C	5 sec	PCR 模板变性
	退火+延伸	60°C	30~34 sec	退火+延伸

溶解曲线分析: 采集荧光信号, 建议按照仪器qPCR反应程序仪器默认的采集信号设置

*注: 确保延伸后立刻进行荧光信号采集。延伸时间根据qPCR仪所需数据采集时间自行调整: 使用 StepOnePlus请设定为30s; 使用7300请设定为31s; 使用7500请设定为34s。

三步法qPCR程序设置如下:

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95°C	3 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95°C	5 sec	PCR 模板变性
	退火	60°C	20 sec	退火
	延伸	70°C	10 sec	延伸

溶解曲线分析: 采集荧光信号, 建议按照仪器qPCR反应程序仪器默认的采集信号设置

备注:

- 1: 无特殊说明, 我司 qPCR 引物退火温度均按 $60 \pm 3^\circ\text{C}$ 进行设计。qPCR 程序设置时选择通用退火温度 60°C , 最佳退火温度可在 $57^\circ\text{C} \sim 63^\circ\text{C}$ 之间适当调整;
- 2: 部分仪器如 ABI 系列仪器收集荧光信号需要较长的恒温时间方能收集信号, 使用此类仪器建议使用两步法, 将退火及延伸反应合并, 退火延伸温度设置为 60°C , 时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。
- 3: SYBR Green 染料法进行的 qPCR 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 $70^\circ\text{C} \sim 95^\circ\text{C}$, 升温速率为 $0.5^\circ\text{C}/\text{次}$, 恒温时间为 5 sec/次。

数据分析

1. 重复管之间Ct值的STD < 0.2, 不同批次间同一实验的Ct值的 STD < 0.5 (不同批次同一实验对比需保证阈值设置基本一致)。
2. 扩增产物的熔解曲线无明显非特异性扩增产物(杂峰)或引物二聚体杂峰(必要时请进行琼脂糖电泳确认), 并且熔解曲线的Tm值一般在80-95°C之间。

温馨提示: 如涉及到使用本公司产品发表文章请引用产品来源, QianMoBio Co. Ltd, Shanghai, China, 上海芊陌生物科技有限公司。对于引用注释本公司产品发表的 SCI paper, 联系销售或者本公司, 可获取对应的科研奖励金。