



miProfile™ miRNA qPCR Arrays 配套试剂使用手册

——高通量 miRNA 表达量分析阵列配套试剂使用手册

适用于以下产品

All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit for miRNA qPCR array
Cat.No.**QP017** (Old Cat.No.AMRT-2020, 20 miRNA reverse transcription reactions)
Cat.No.**QP018** (Old Cat.No.AMRT-2060, 60 miRNA reverse transcription reactions)

All-in-One™ qPCR Mix
Cat.No.**QP001** (Old Cat.No.AOPR-0200, 20 μ l \times 200 reactions)
Cat.No.**QP002** (Old Cat.No.AOPR-0600, 20 μ l \times 600 reactions)
Cat.No.**QP003** (Old Cat.No.AOPR-1200, 20 μ l \times 1200 reactions)
Cat.No.**QP004** (Old Cat.No.AOPR-1000, 20 μ l \times 1000 reactions)
Cat.No.**QP005** (Old Cat.No.AOPR-4000, 20 μ l \times 4000 reactions)

GeneCopoeia, Inc. 广州易锦生物技术有限公司

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 F 区 8 楼
邮编: 510663
电话: 4006-020-200
邮箱: sales@iGenebio.com
网址: www.genecopoeia.com
www.iGenebio.com

使用手册

miProfile™ miRNA qPCR Array 配套试剂

- I. 产品介绍
- II. 试剂盒组成
- III. 实验前准备
- IV. 实验步骤
- V. 数据分析
- VI. 使用许可与质量保证

I. 产品介绍

MicroRNAs (miRNAs) 是一种在转录后水平调节基因表达的非编码小 RNA，长度通常在 21~23 个核苷酸之间。miRNAs 在真核生物中高度保守并在细胞通路中起到重要的调节作用。miRNAs 调节基因的正常表达与癌症、心血管障碍等多种疾病有关。

miProfile™ miRNA qPCR Arrays 主要用于分析不同组织或细胞中 miRNA 的表达量差异。这些被分析 miRNAs 的表达量差异能帮助研究者鉴定这些 miRNA 的生物学意义及与他们研究课题的重要联系。每块 96 孔板包含 84 对 (384 孔板包含 360 对) 已交联在反应孔中的 PCR 引物 (正向: miRNA 特异引物; 反向: 通用引物); 设置有 6 个 (384 孔板包含 12 个) 内参孔, 作为 array 数据标准化过程中的阳性对照; 同时设置 4 个 (384 孔板包含 8 个) 外参孔, 用于监测反转录和 qPCR 反应的效率; 另外, 每个 96 孔板还设置有 2 个 (384 孔板包含 4 个) 阴性对照孔。

RT-PCR 试剂 All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kits for miRNA qPCR array (Cat.No.QP017、QP018) 和 All-in-One™ qPCR Mix (Cat.No.QP001、QP002、QP003、QP004、QP005) 可与 miProfile™ miRNA qPCR arrays 配套使用。该系列试剂均经过优化, 具有高的灵敏度、效率和特异性。在 All-in-One™ 反转录酶混合物里, polyA 聚合酶和反转录酶以最佳比例溶解在反转录缓冲液中, 两种酶的活性得到最大发挥。PolyA 聚合酶通过对成熟 miRNAs 的 3'端加上 poly-A 形成 polyA miRNAs, 然后 M-MLV 反转录酶和独特的 oligo dT 适配引物 (与已交联在 array 反应板中的 PCR 反向通用引物兼容) 对 polyA miRNAs 进行反转录。含有 SYBR® Green 的 All-in-One™ qPCR Mix, 利用交联在 array 反应板孔中的正向 miRNAs 特异引物和反向通用引物对反转录 miRNA 得到的 cDNA 进行特异检测 (详见图 1)。其他公司的类似试剂也可能使用, 但不推荐。

实验者仅需通过普通的 real-time PCR 反应即可对 miRNAs 表达量进行高通量分析。虽然使用总 RNA 也可达到相似的效果, 但是为了增加检测的特异性, 我们推荐使用 **small RNA**。

实验流程与原理

A. Prepare cDNA from your RNA Samples



B. Add qPCR Mix and cDNA to the qPCR Array Plate



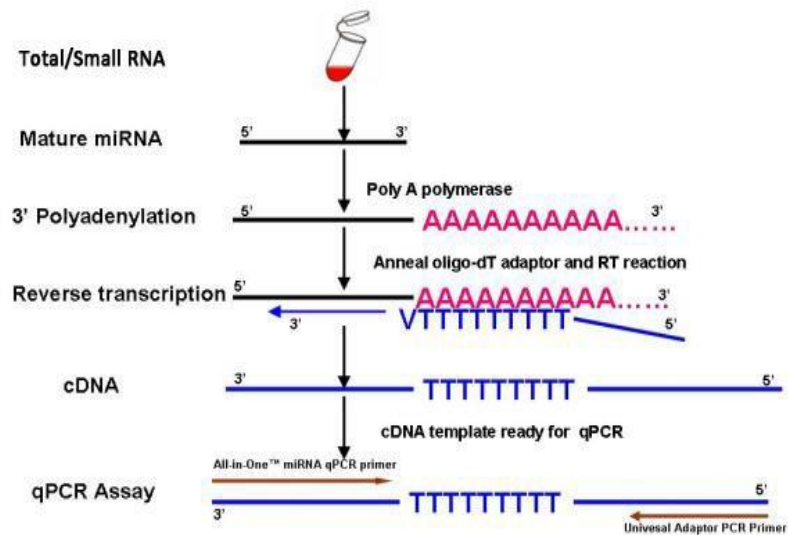
C. Perform real-time PCR



D. Analyze the qPCR Results with GeneCopia's Online Data Analysis System

qPCR Array Catalog#		HmiRWG-07	Homo Brain Assay Data(Sample)			Homo Liver Assay Data(Control)			Fold Change	T test
No.	Accession#	miRNA ID	Ct Value-1	Ct Value-2	Ct Value-3	Ct Value-1	Ct Value-2	Ct Value-3	2 ^{-ΔΔCt}	P Value
1	MIMAT0004982	hsa-miR-939	26.27	26.00	26.32	29.79	30.06	30.28	112.69	1.39E-06
2	MIMAT0004951	hsa-miR-887	27.16	27.15	27.30	30.84	30.78	30.95	98.51	3.97E-06
3	MIMAT0004804	hsa-miR-615-5p	32.75	31.59	32.55	33.93	34.02	33.87	22.32	9.52E-05
4	MIMAT0004696	hsa-miR-323-5p	20.32	20.35	20.82	27.69	27.81	27.59	1154.03	6.84E-06
5	MIMAT0003324	hsa-miR-661	27.08	27.25	27.12	31.49	31.89	31.05	156.93	6.98E-05
6	MIMAT0004983	hsa-miR-940	18.95	19.02	18.99	19.12	19.95	19.02	8.27	1.52E-04
7	MIMAT0003306	hsa-miR-636	20.40	20.39	20.45	24.97	24.78	25.11	182.60	1.49E-06
8	MIMAT0005867	hsa-miR-663b	27.41	27.39	27.42	22.80	22.48	22.59	0.28	1.01E-03
9	MIMAT0002178	hsa-miR-487a	23.93	23.94	24.01	31.83	31.56	31.78	1703.48	9.72E-07
10	MIMAT0003180	hsa-miR-487b	21.42	22.01	21.89	28.77	28.89	28.59	987.94	1.18E-05

(A)



(B)

图 1. miRNA qPCR array 实验工作流程 (A) 和 miRNA RT-PCR 机制 (B)

II. 试剂盒组成

All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit for miRNA qPCR array (Cat.No. **QP017**, **QP018**) 试剂组成如下表:

组份	体积	储存条件
2.5 U/ul Poly A polymerase	1 × 20 μl 3 × (1 × 20 μl)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
RTase Mix	1 × 20 μl 3 × (1 × 20 μl)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
5× PAP/RT Buffer	1 × 100 μl 3 × (1 × 100 μl)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
dd H₂O (RNase and DNase free)	1 × 1 ml 3 × (1 × 1 ml)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
Spike-in RT Control	1 × 20 μl 3 × (1 × 20 μl)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月

All-in-One™ qPCR Mix (Cat.No. **QP001**、**QP004**、**QP005**) 试剂组成如下表:

组份	体积	储存条件
2× All-in-One™ qPCR Mix	1 × 2 ml 5 × 2 ml 20 × (1 × 2 ml)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月
50× ROX Reference Dye	1 × 80 μl 5 × 80 μl 20 × (1 × 80 μl)	冰袋运输; -20℃ 保存至少 12 个月

III. 实验前准备

注意事项:

1. 开始实验前请仔细阅读产品使用手册。
2. 使用前, 请移除积存在封闭的反应板表面的冷凝物, 短暂离心。
3. 严格按照 PCR 标准步骤操作, 避免核酸污染和非特异性扩增。

预计每个样本需要的 RNA 量和 RT-PCR 反应数

Array 类型	反应板数/样本	small RNA 量/样本	总 RNA 量/样本	RT 反应数/样本	qPCR 反应数/样本
96-well plate	2	0.5~1 µg	1~2 µg	1	220
	5	1.5~3 µg	3~6 µg	3	550
	10	2.5~5 µg	5~10 µg	5	1,100
	20	5~10 µg	10~20 µg	10	2,200
	40	10~20 µg	20~40 µg	20	4,400
384-well plate	1	1~2 µg	2~4 µg	2	450
	2	2~4 µg	4~8 µg	4	900
	5	5~10 µg	10~20 µg	10	2250
	10	10~20 µg	20~40 µg	20	4500

RNA 定量与质量控制

1. 使用水 (RNase-free) 稀释 RNA 样本, 检测 260nm 和 280nm 的吸光值, A260/280 应大于 1.8。
2. 使用公式 $A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} = \text{XXXX } \mu\text{g/ml}$ 计算确定样本 RNA 浓度。
3. 使用琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。

IV. 实验步骤

第一链 cDNA 合成

注意: 高质量的 cDNA 是精确检测 miRNA 表达的先决条件。All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit for miRNA qPCR array 可用于 cDNA 的合成。

1. 融解并轻柔混匀试剂盒中各种组分, 短暂离心后置于冰上保存。
2. 准备反转录反应液, 将下表中试剂加入预冷的 RNase-free 反应管至终体积为 25 µl。

成分	体积	质量
Small RNA		0.5~1.0 µg
2.5U/µl PolyA Polymerase	1 µl	2.5 U
RTase mix	1 µl	
5x PAP/RT buffer	5 µl	1 ×
Spike-in RT control	1 µl	
ddH ₂ O(RNase/DNase free)	至终体积 25 µl	

- 1 个标准 miRNA 反转录反应 (25µl) 的 cDNA 产物可用于 2 块 96 孔板检测, 1 块 384 孔板的检测则需要 2 个标准 miRNA 反转录反应的 cDNA 产物。

- 为提高阳性检出率，1 个标准反转录反应体系（25 μl）中需要加入 0.5 ~ 1.0 μg small RNA。

3. 反转录反应：

动作轻柔地混匀已准备好的反应混合物，并置于 37℃ 孵育 60 分钟。接着置于 85℃ 孵育 5 分钟（终止反转录反应）。孵育结束后，每个标准 miRNA 反转录反应加入 225 μl 无菌水将 cDNA 产物稀释 10 倍，用于后续 qPCR 反应。稀释的 cDNA 溶液可置于 -20℃ 保存数周。

qPCR 反应

注意：在开始此步骤前请确认 miProfile™ miRNA qPCR Array plate 与您的 qPCR 仪器匹配。

1. 解冻并轻柔混匀 All-in-One™ qPCR Mix 中的试剂。短暂离心使管中试剂处于底部，冰上保存。去除积存在封闭反应板表面的冷凝物，短暂离心。小心撕去 96 孔（或 384 孔）qPCR 板上的密封膜。
2. 在冰上准备 qPCR 反应液。

成分	体积/孔	体积/N 孔
2x All-in-One™ qPCR Mix	10 μl	11 μl × N
miRNA cDNA (10 times dilution)	1 μl	1.1 μl × N
50x Rox Reference Dye	0.4 μl	0.44 μl × N
ddH ₂ O		
■ 不使用 Rox Reference Dye	9 μl	9.9 μl × N
■ 使用 Rox Reference Dye	8.6 μl	9.5 μl × N
终体积	20 μl	22 μl × N

- miProfile™ miRNA qPCR Array 可对同一样本中多种 miRNA 进行同时检测。因此为了充分满足实验需要和避免实验操作产生的耗损，在配制 mix 反应液时需比实际体积多出 10%。
 - 50x Rox Reference Dye 仅用于需要 ROX 校准的 qPCR 仪器。
3. 轻柔混匀 qPCR 溶液并短暂离心。每孔精确加入 20 μl 反应混合物。每次加样都需要使用新的枪头以避免交叉污染。
 4. 使用新的密封膜覆盖 qPCR 反应板，短暂离心去除气泡。
 5. 根据下表设置三步法 PCR 程序和熔解曲线分析程序。

循环数	步骤	温度	持续时间	检测与否
1	预变性	95℃	10 min	否
40	变性	95℃	10 sec	否
	退火	60℃	20 sec	否
	延伸	72℃	10 sec	是

温度范围	热比	恒定温度	检测与否
65℃~95℃	0.5℃/单位时间	6 sec/单位时间	是
30℃		30 sec	否

- All-in-One™ qPCR Mix 中使用的 DNA 聚合酶是一种经过特异性化学修饰的热启动酶，预变性能够充分活化这种酶。
- miProfile™ miRNA qPCR Arrays 板孔中交联引物的退火温度均经过设计和优化。为了区分某些 miRNA 之间的单碱基差异，例如，在检测 miProfile™ Human Single-Nucleotide Mismatch miRNA qPCR Array (Cat.No.QM003) 时，需要设置更高的退火温度 (65℃)。
- 以上设置的 PCR 延伸时间适用于 Bio-Rad iQ5 real-time PCR 仪器。请参照您所使用仪器的操作手册调整延伸时间。
- 当使用 SYBR Green 染料监测 qPCR 反应时，需要在 qPCR 循环结束后立即进行溶解曲线分析。

V. 数据分析

1. 确定基线

基线是定量 PCR 扩增前期的荧光本底信号，一般都由仪器自动设置。不同的仪器类型，基线的设置也略有不同，往往在荧光信号指数扩增阶段的前几个循环处，一般将定量 PCR 的前 15 个循环信号作为荧光本底信号，如果实验数据中最低 Ct 还小于基线的设置上限，研究人员则需要手动设置。其设置原则为：起始值设置为 2 或 3，终止值的设置为整个反应板中扩增最强检测因子的 Ct 值减去 2 或 3 所得的值即可，一般设置在 2-10 的范围内，不要超过 15。

为了确保实验数据分析的可比性，每次定量 PCR 的基线设置值须保持一致。

2. 设定域值

荧光域值的正确设置是进行数据分析的关键一步，荧光域值的设置往往在荧光信号指数扩增的起始阶段。一般情况下，内参基因的表达水平往往高于大多数的检测基因。

3. Ct 或 Cp 值的获得

所谓 Ct 值就是在荧光 PCR 扩增过程中，当扩增产物的荧光信号达到设定的阈值时所经过的扩增循环次数，也被称为 Cp 值。

4. 数据的导出。多数的定量 PCR 仪是以 Excel 的形式导出 Ct 值。

5. 选取合适的内参基因，用 $\Delta\Delta Ct$ 数据分析方法对定量 PCR 结果进行相对定量分析。

6. 所有 Ct 值大于 35 或显示 N/A，均认为没有检测到该基因的表达。

7. 可通过 GeneCopoeia 的在线数据分析系统 (<http://www.genecopoeia.com/product/mirna-solutions/mirna-qpcr-arrays/>) 进行数据分析。

VI. 使用许可与质量保证

使用许可

以下条款适用于 miProfile™ miRNA qPCR Array 配套试剂 All-in-One™ miRNA First-Strand cDNA Synthesis Kit (for miRNA qPCR array)和 All-in-One™ qPCR Mix 系列产品。若您不能接受这些条款，请在 5 个自然日内将产品完整退还给 GeneCopoeia。产品购买者需遵守最终用户限制许可条例。本产品仅限购买者内部研究使用，不得用于人体或诊断、治疗。未经 GeneCopoeia 事先书面同意，本产品不得转售，不得重新包装或修改后转售，不得用于生产商用产品。

质量保证

GeneCopoeia 保证产品与产品数据表中描述的规格保持一致。若经 GeneCopoeia 证实产品未达到规格要求，GeneCopoeia 将为您替换产品。若无法替换，GeneCopoeia 将退款给购买者。此质量保证仅适用于最初产品购买者。GeneCopoeia 仅负责替换产品或退还实际的购买金额。对于由使用或不正确使用产品产生的损害或使用其他相关材料和试剂产生的损耗，GeneCopoeia 不承担责任。GeneCopoeia 不提供任何形式的明示的或者默示的保证，包括对适销性、适用于特定用途的默示保证。

GeneCopoeia 致力于为消费者提供高质量的研究产品。如果您对 GeneCopoeia 的产品有任何问题或疑虑，请拨打电话 4006-020-200 联系我们

© 2016 GeneCopoeia, Inc.