



## All-in-One™ miRNA qPCR Primer Manual and Validation Report

For quantitative detection of mature miRNA with All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit

**Catalog number: MmiRQP9012**

**GeneCopoeia, Inc.;** 广州复能基因有限公司

地 址：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 D 区 8 楼

订购热线：4006 020 200

技术支持：020-32068595

传 真：020-32052877

网 址：[www.genecopoeia.com.cn](http://www.genecopoeia.com.cn); [www.fulengen.com](http://www.fulengen.com)

E-Mail：[sales@fulengen.com](mailto:sales@fulengen.com); [support@fulengen.com](mailto:support@fulengen.com)

邮 编：510663

**For Research Use Only**

## Primer Manual and Validation Report

- I. 概述
- II. 产品信息
- III. 推荐的配套使用试剂
- IV. 产品使用流程
- V. 产品应用
- VI. All-in-One miRNA qPCR Primer 验证报告

### I. 概述

microRNA (miRNA) 是一类由大约 22 个核苷酸组成的单链非编码小分子 RNA, 参与多个生理活动过程的调控。但由于长度太短, 一般难以检测。All-in-One miRNA qPCR Primer 是特异 mature miRNA 的 qPCR 检测上游引物, 其需配合 All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit, 主要应用于 mature-miRNA 的定量检测, 公司推出的 All-in-One miRNA qPCR Primer 都经过以 cDNA 为模板的 qPCR 实验验证

### II. 产品信息

Catalog#	Primer ID	Mature_Acc	Mature_ID	PCR size	Package Conc.	Package size
MmiRQP9012	MsnRNA U68	NR_028128.1	snoRNA68	72 bp	2 $\mu$ M	200 rxn
MmiRQT0002	Positive Control cDNA Mix				10 $\times$ Mix	3 rxn

储存条件: -20  $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融

### III. 推荐的配套使用试剂

GeneCopoeia All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit (Catalog Nos. AOMD-Q020 或 AOMD-Q050)

### IV. 产品使用流程

1. 客户收到本产品时, 需在离心机上 12000rpm 离心 30sec, 使其液体完全流到离心管底部;
2. 本产品为特异 mature miRNA 的检测上游引物, 已用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 稀释到使用浓度 2 $\mu$ M (即为 10 $\times$  Primer 包装), 使用时客户仅需参考其 PCR 反应体系的大小, 吸取一定量的本产品, 使其终浓度达整个反应体系的 1 $\times$ 量 (即终浓度为 0.2 $\mu$ M) 即可
3. 使用时客户仅需参考其 PCR 反应体系的大小, 吸取一定量的该产品引物, 使其终浓度为 0.2 $\mu$ M 即可;

该产品需推荐配合 All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit 使用，具体使用方法敬请参考“**All-in-One miRNA qPCR Primer 验证报告**”中 Page6 的“**mature miRNA 的 qPCR 检测**”部分；

4. 产品中附有公司进行产品验证的 Positive cDNA Mix 模板，客户如需要，可参考“**miRNA qPCR Primer 验证报告**”中 Page 6 的“**mature miRNA 的 qPCR 检测**”部分对本产品进行质检；
5. 本产品需配合含 SYBR Green 的 qPCR 试剂使用，不一定适合探针法检测。
6. 本产品中配有的 Positive Control cDNA Mix 是采用 All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit 中特异的 oligo-dT adaptor 引物进行反转录合成的，其检测需配合 miRNA qRT-PCR Detection Kit 中的 universal Adaptor PCR primer, 所以此 cDNA 不能应用于其它同类 miRNA qRT-PCR Detection Kit。

### V. 产品应用

All-in-One miRNA qPCR Primer 为应用于 mature miRNA 表达量检测的引物，其配合 All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit 可对 mature miRNA 进行定性、定量的 qPCR 检测。

### VI. All-in-One miRNA qPCR Primer 验证报告

#### A 材料和方法

##### 1. 验证实验仪器

iQ5 Real Time PCR Detection System: Bio-Rad

##### 2. 验证的实验材料及试剂

All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit ( Catalog Nos. AOMD-Q020 或 AOMD-Q050)

验证模板：小鼠源八个不同的组织所制备的 cDNA

#### B 验证流程

##### RNA 抽提

##### 1. 样品处理

取一定量的八个不同的小鼠源组织标本至冷冻的研钵中，加入液氮研磨至细粉，最后转移至有 1ml TRIzol 的离心管中，反复振荡约 5min。（如为细胞样品，则取约  $10^6\sim 10^7$  左右的细胞数至 1ml TRIzol 中，反复吹打至裂解。）

## **2. 相分离**

室温放置 10min 左右后，每 1ml TRIzol 中加入氯仿为 200 $\mu$ l，盖上盖子，剧烈振荡约 1min，室温静置 2~5min，然后 12000g 冷冻离心 15min (6 $^{\circ}$ C)，小心取出样品，通过观察可以发现样品分三层，其中最上层含有 RNA 样品。

## **3. RNA 沉淀**

小心吸取上清液约 450 $\mu$ l (每 1ml TRIzol 的吸取量) 至含有 600 $\mu$ l 冷冻异丙醇的新离心管中，混匀，-20 $^{\circ}$ C 放置约 10min，12000g 冷冻离心 10min (6 $^{\circ}$ C)。

## **4. RNA 洗涤**

去上清，加入 500 $\mu$ l 冷冻的 75% 乙醇，弹起沉淀后 12000g 冷冻离心 5min (6 $^{\circ}$ C)，去上清，再稍离，吸去上清液。

## **5. RNA 溶解**

风干约 5~10min (注意不能风太干，只需要沉淀泛白即可)，加入 DEPC 水约 30 $\mu$ l。贴上标签后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

## **6. RNA 浓度测定**

吸取 1 $\mu$ l 抽提的 RNA 用 DEPC 水稀释 10 倍后，在 Nanodrop 上测定 RNA 浓度，以 DEPC 水做空白对照，同时记录 RNA 浓度及其 A 260/OD280。

## **7. RNA 电泳检测**

### **7.1. 变性胶制备**

取 1g Agarose + 75ml 去离子水煮沸，冷却至 70 $^{\circ}$ C 左右加入 10ml 10 $\times$ Mops 和 15ml 甲醛及 EB。倒胶至宽口梳子的胶板上，盖上盖子。

### **7.2. 电泳缓冲液配制(1 $\times$ Mops)**

取 50ml 10 $\times$ Mops，用去离子水稀释至 500ml，倒入电泳槽中，再在电泳缓冲液中添加 EB。

### **7.3. RNA 样品处理**

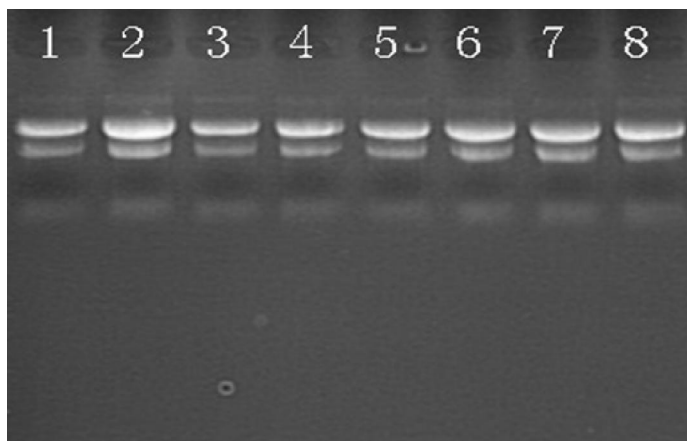
取 RNA 样品 3 $\mu$ l，补充 DEPC 水至 18 $\mu$ l，65 $^{\circ}$ C 变性 10min 后立即冷却，加入 2 $\mu$ l 10 $\times$ RNA loading buffer 即可电泳

7.4. RNA 电泳

先把 RNA 胶放入电泳槽中，100V 作用电泳约 5min，再在点样孔中点入处理过的 RNA 样品，100V 左右电泳至溴酚蓝至胶的 1/3 处，取胶拍照。

**8. RNA 检测结果**

8.1. 八个不同组织的 RNA 电泳图（取各 3 $\mu$ l RNA 样品）：



各泳道所对应的样品信息见下表 8.2

8.2 RNA 电泳的各泳道所对应的样品及其样品浓度和 A260/OD280

泳道	组织	Conc.(ng/ $\mu$ l)	A 260/OD280
1	肝	2385	1.9
2	睾丸	2430	1.94
3	肌肉	2521	1.91
4	甲状腺	2444	1.94
5	脑	2785	1.87
6	脾	2972	1.9
7	胃	3515	1.91
8	小肠	3344	1.91

*NOTE: 抽提的 RNA 必须含有小分子 RNA 才能进行 miRNA 的检测，所以所选的试剂盒必须为总 RNA 抽提试剂盒或小分子 RNA 抽提试剂盒；同时 RNA 抽提的质量是进行下游实验的关键，敬请严格按照所使用的 RNA 抽提试剂盒要求进行抽提，抽提结束后，敬请电泳检测 RNA 抽提质量。*

**miRNA 反转录反应**

1. 融解 miRNA 反转录所需的试剂，上下轻微颠倒混匀，短暂离心后放置冰上待用。

2. miRNA 反转录反应液的配制

在冰上的预冷 RNase free 的反应管内加入以下试剂至总体积 25 $\mu$ l

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA		2 $\mu$ g
2.5U/ $\mu$ l PolyA Polymerase	1 $\mu$ l	2.5U
RTase Mix	1 $\mu$ l	
5 $\times$ Reaction Buffer	5 $\mu$ l	1 $\times$
ddH <sub>2</sub> O(RNase/DNase free)	补至 25 $\mu$ l	

*Note:* 在反应中使用的 total RNA 必须含有小分子 RNA; Total RNA 使用量可在 1ng~5 $\mu$ g 之间调整, 如使用纯化的小分子 RNA, 其使用量可在 0.1ng~1 $\mu$ g 之间调整。

3. 反转录反应

混匀配制的反应 mix, 短暂离心后在 37 $^{\circ}$ C 反应 60min, 结束后再进行 85 $^{\circ}$ C 5min 灭活处理。所得的反转录产物可用灭菌水稀释 5 倍进行下游 qPCR 实验。

**Mature miRNA 的 qPCR 检测**

1. 融解 All-in-One miRNA qRT-PCR Detection Kit 中的 2 $\times$ All-in-One qPCR mix 上下轻微颠倒混匀, 短暂离心后放置冰上待用。
2. 冰上进行 qPCR 反应液的配制 (所有 miRNA 进行复孔测试, 同时进行单孔 NTC (No template control) 测试)

试剂组分	体积	终浓度
2 $\times$ All-in-One qPCR Mix	10 $\mu$ L	1 $\times$
All-in-One miRNA qPCR Primer	(2 $\mu$ M) 2 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
Universal Adaptor PCR Primer	(2 $\mu$ M) 2 $\mu$ L	0.2 $\mu$ M
1 <sup>st</sup> strand cDNA (5 倍稀释液)	2 $\mu$ L	
ddH <sub>2</sub> O	4 $\mu$ L	
Final Volume	20 $\mu$ L	

*Note:* 在实验中设计了 NTC (No Template Control), 其为阴性对照, 即用水来代替模板 cDNA, 其它试剂不变, 从而来质控是否体系有污染; 实验中如需更改反应体积, 敬请保持最适条件下各组分比例; 试剂盒中的 50 $\times$  Rox Reference Dye 使用在需用 Rox 校正的仪器, 如 ABI 的定量 PCR 仪

## All-in-One miRNA qPCR Primer Manual and Validation Report

- 充分混匀 qPCR 反应液，添加至 PCR 反应管中，短暂离心，确保所有试剂到反应管底部。
- qPCR 反应，使用标准的三步法进行检测（以 Bio-Rad 的 iQ5 进行实验的设计）

循环数	步骤	温度	时间	检测
1	预变性	95°C	10min	否
40	变性	95°C	10sec	否
	退火	参考结果	20sec	否
	延伸	72°C	10sec	是

反应结束后，立即进行融解曲线分析

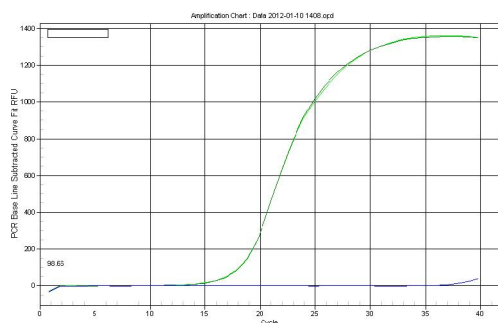
检测温度范围	升温速率	恒温时间	检测
65°C~95°C	0.5°C/次	10 sec/次	是
30°C		30sec	否

*Note* : 以上的反应条件主要参考的为 Bio-Rad 的 iQ5 定量 PCR 仪器，如使用的为不同公司的定量 PCR 仪，请按照不同的仪器要求，调整 qPCR 反应的延伸时间及其融解曲线分析的条件；各 miRNA 的退火温度可能例有差别，具体请参考测试结果部分。

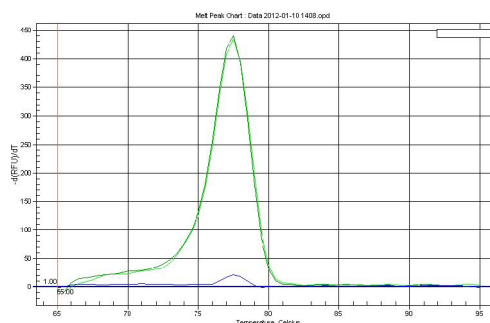
## C. 引物验证结果

### 1. snoRNA68 (MsnoRNA U68 primer)

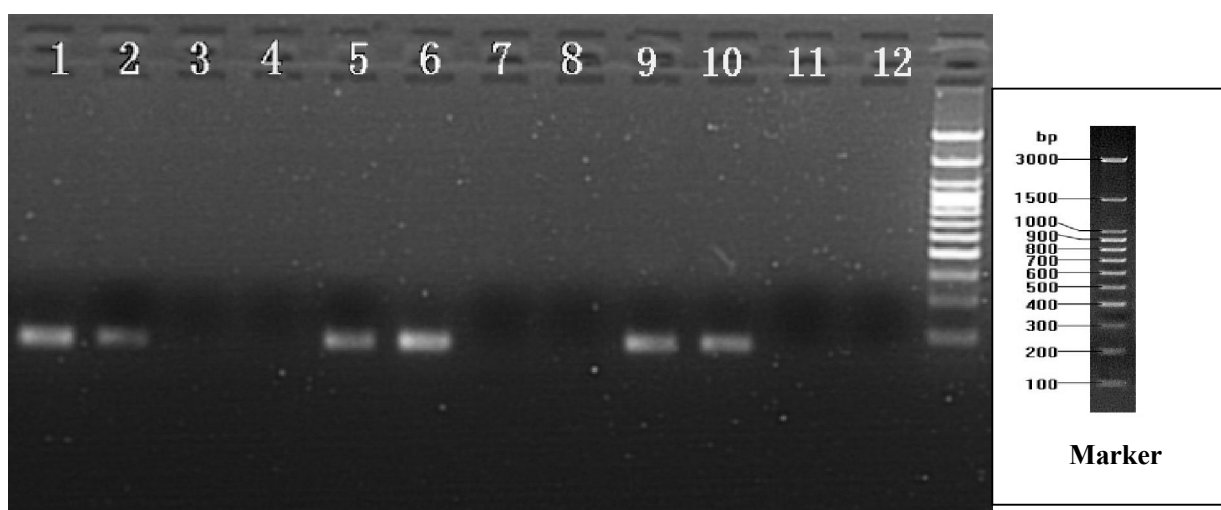
推荐退火温度为 60℃



snoRNA68 Amplification curve



snoRNA68 melting analysis curve



Electrophoresis Result in lane 1-2-3-4 (contains two positive controls and two NTC)

(5  $\mu$ l of the PCR of products, run on 3% agarose gel)

该产品仅限于实验科学研究用，若有任何单位或个人将该产品用于临床诊断、治疗等其他国家专门规定的特殊用途，本公司概不承担任何责任。

GeneCopeia Products are for Research Use Only

Copyright © 2009 GeneCopeia, Inc.

Trademarks: iQ5™ (Bio-Rad); GeneCopeia™, OmicsLink™, All-in-One™, (GeneCopeia Inc.); Trizol™ (Invitrogen);

NanoDrop™ (Thermo Scientific)

AOPM1001