



GenePharma

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



B041-V002-20200622

Direct S-Poly(T) Plus miRNA qPCR-assay 使用说明

产品介绍:

Direct S-Poly(T) Plus 是一种不需提取核酸，直接以经简单处理的血清或血浆 (S/P) 为模板检测循环 microRNA (miRNA) 的实时荧光定量 RT-qPCR 方法, 主要包括: S/P 的预处理, miRNA 加尾及逆转录 (polyA/RT) 和 qPCR 定量检测三个步骤 (见图 1)。本方法使用由 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 (RT), 显著增强了 poly(A) tailed miRNA 与特异 RT 引物之间的结合力, 从而大幅度提高 cDNA 的合成效率及其特异性, 最终使后续 qPCR 检测的灵敏度提高至少一个数量级 (图 2)。为了在降低成本的同时进一步提高检测的特异性, 本公司对每一种 RT 引物做了优化设计, 实现了一次 RT 反应可同时对 11 个 miRNA 的特异性 RT, 并在后续 qPCR 反应中使用了 miRNA 特异上游引物 and 对应每个 RT 引物的特异下游引物、通用 Taqman 探针以及热启动直扩 HS-Taq 酶。本产品针还针对 265 个循环 miRNA 进行了引物分组和测试, 制备了含有上下游特异引物的 PCR 预制板, 从而实现对循环 miRNA 生物标志物的快速高通量筛选。

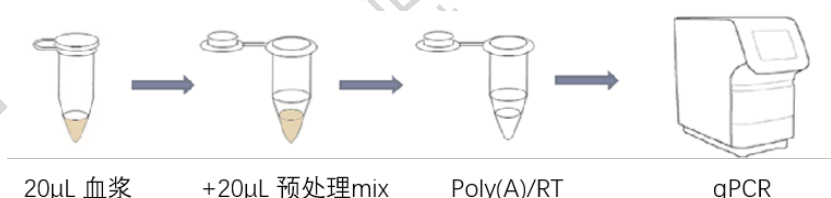


图 1. Direct S-Poly(T) Plus 主要流程

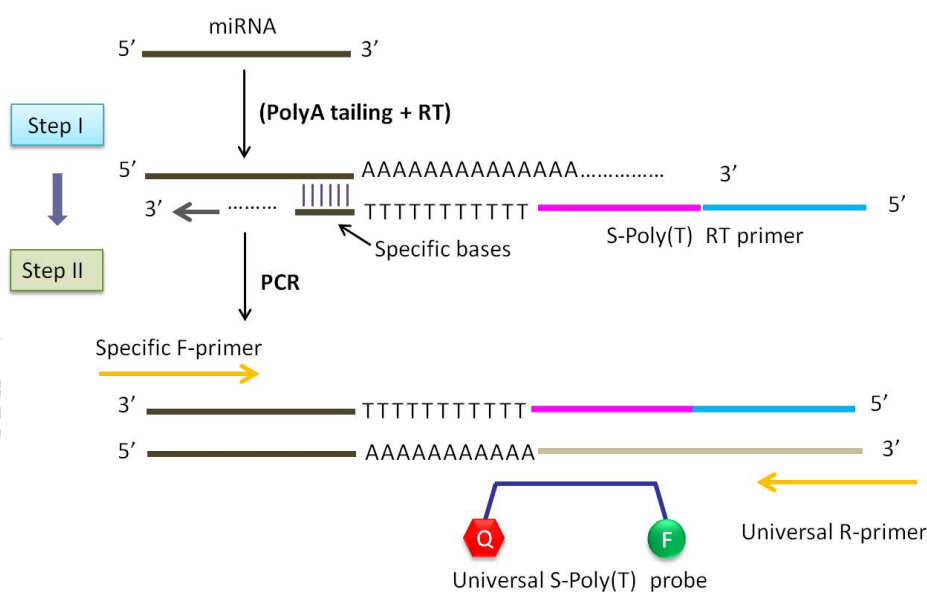


图 2. S-Poly(T) Plus 法检测 miRNA 原理图

产品特点:

- (1) **简单快速:** 直接用预处理的血浆或血清进行 RT-qPCR。
- (2) **降低成本:** 无需提取核酸, 使检测成本显著降低。
- (3) **微量样品:** 检测一个 miRNA 最多不超过 1 μ L 血浆。
- (4) **减少污染:** 不使用提取核酸所必需的有机试剂, 极大的减少污染。
- (5) **避免丢失:** 不提取核酸可以有效防止因提取造成的丢失现象。
- (6) **高特异性:** 使用特异的 S-Poly(T)引物进行 RT 反应, 最大程度的提高 cDNA 合成的效率和特异性; 此外, PCR 过程使用特异的 miRNA 上游引物及与每一种 RT 引物对应的特异下游引物, 进一步保证扩增反应的特异性。
- (7) **高灵敏度:** 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 20 倍以上。与提取核酸的 S-Poly(T) Plus 方法相比, 按照等量的血浆计算, Direct S-Poly(T) Plus 检测循环 miRNA 的灵敏度更高。
- (8) **数据归一化简单:** 适合用等体积样本进行数据归一化处理, 结果更可靠。
- (9) **技术门槛低:** 操作简单, 对技术人员的要求不高。

制品内容:

分类	名称	规格		
		20RT/ 100PCR	40RT/ 200PCR	100RT/ 500PCR
One Step miRNA cDNA Synthesis Core Reagent Kit	4 $\times$ Reaction Buffer Mix	50 μ l	100 μ l	250 μ l
	PolyA/RT Enzyme Mix	20 μ l	40 μ l	100 μ l
Probe Premix HS-Taq	4 $\times$ PCR Buffer *	500 μ l	1000 μ l	2500 μ l
	100 $\times$ ROX Reference Dye	20 μ l	40 μ l	100 μ l
	HS Taq	20 μ l	40 μ l	100 μ l
S-Poly(T) ^{plus} miRNA qPCR-assay primer set	20 $\times$ probe & PCR primers	100 μ l	200 μ l	500 μ l
	10 $\times$ miRNA RT primer	20 μ l	40 μ l	100 μ l
Direct lysis Kit	Lysis Buffer	400 μ l	800 μ l	2000 μ l
	Lysis Enzyme	20 μ l	40 μ l	100 μ l

* 内含 PCR buffer, Mg²⁺, dNTP Mixture 等。

** 内含探针, 特异上游引物, 通用下游引物。

储存条件: -20 $^{\circ}$ C 保存, 避免反复冻融。

使用方法:

(1) S/P 预处理 (在冰上操作)

Component	Volume (μl)
S/P	20 μl
Lysis Buffer	20 μl
Lysis Enzyme	1 μl
Total volume	41 μl

混匀后, 50 °C 15 分钟, 95 °C 5 分钟; 4 °C 下 13000 rpm 离心 5 分钟, 上清为 crude RNA, 建议立即进行下一步实验。此法 20 μl 血浆至少可以提取出满足 6 个 RT 体系使用的 crude RNA, 最多可以检测 66 个 miRNAs。

(2) 一步 PolyA 加尾和逆转录反应 (在冰上操作)

Component	Volume (μl)
crude RNA	4
4×Reaction Buffer Mix	2.5
PolyA/RT Enzyme Mix	1
10×RT primer Mix*	1
RNase-free Water	Up to 10
10×Spike-in Cel-54	1*
Total volume	10

* 如需加入外参基因建议加入外参基因的同时加入 1μl 0.5 μM 外参 RT primer。

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

(3) 荧光定量 PCR (Real-Time PCR)

Component	Volume (μl)
4×PCR Buffer	5
HS-Taq (5U/μl)	0.2
Rox Reference Dye (100×)*	0~0.2
20 × probe & PCR primers**	1
cDNA***	X
ddH ₂ O	Up to 20
Total volume (μl)	20

* Rox Reference Dye 的使用方法请参考附录 2。

** 已包含相应的 F primer 与 R primer。

*** 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。

(4) Real-time PCR 反应程序

95℃	10 min	1 Cycle
95℃	10 sec	40 Cycles
60℃*	30 sec	

* 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 $\Delta\Delta Ct$ 值法，也可以使用相对标准曲线法。

(1) $\Delta\Delta Ct$ 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。 $\Delta Ct = \text{AVG}(\text{检测的 miRNA}) - \text{AVG}(\text{内参基因})$ ；
- 3) 计算 $\Delta\Delta Ct$ 值。 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{处理组}) - \Delta Ct(\text{对照组})$ ；
- 4) 计算倍数变化(fold change)。 $\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。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)。 $\text{fold change} = \frac{\text{“处理组”归一化的 miRNA 相对表达水平}}{\text{“对照组”归一化的 miRNA 相对表达水平}}$ 。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，如佩戴手套、口罩，使用 RNase-free 的吸头、离心管。
血浆处理方法不当	更换裂解酶。
加尾/反转录酶失活	加尾/反转录酶应当在 -20℃ 保存，加样过程始终在冰上。
目的 miRNA 表达水平低	建议用提取的方法富集核酸。。

Q2: PCR 复孔重复性不好

原因分析	解决办法
预处理 S/P 含有较多抑制剂	用提取 RNA 的方法进行检测。
加样误差	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 4μl），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，则确定是非特异扩增，解决方案见问题 3。

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	一步 PolyA 加尾和反转录反应中增加 RNA 用量，并增加 qPCR 的模板量。
样品中 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	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4 *
Human	Snord44	Snord47	U6	Cel-miR-54-5p
Mouse	snoRNA202	snoRNA234	U6	Cel-miR-54-5p
Rat	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, 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