



GenePharma

股票代码: 430601

吉玛基因  
www.genepharma.com

## 引物套装（探针法）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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> O 配制成 10 μM 储存液
TaqMan probe (探针)	HPLC		在管中加入 100 μL RNase-free H <sub>2</sub> O 配制成 10 μM 储存液
RNase-free H <sub>2</sub> 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°C 短期储存, 长期保存置于 -20°C, 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°C, 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 <sub>2</sub> O		To 20 μL

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

运行 miRNA 逆转录程序: 26°C 40 min, 42°C 40 min, 85°C 10 min, 4°C 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. 探针法定量 PCR 20 μL 反应加样量体系<sup>[1,2]</sup>

试剂	终浓度	加量/孔
2× Real-time PCR Master Mix (FAM)	1×	10 μL
PCR Primer set (10 μM)	0.2 μM	0.4 μL
TaqMan Probe (10 μM)	0.1 μM-0.2 μM	0.2 μL-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 <sub>2</sub> 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 反应来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  $\Delta Ct$  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  $\Delta Ct$  值减去校正样品的  $\Delta Ct$  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<sup>[3,4]</sup>

### 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  $\mu\text{M}$  为推荐浓度, 可在 0.1-0.5  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{g}$  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. Zhang Y, Yao J, Huan L, et al. GNAI3 inhibits tumor cell migration and invasion and is post-transcriptionally regulated by miR-222 in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Letters, 2015, 356(2).Cancer Letters. 2015, 356(2):978-984.
2. Dong W, Bi J, Liu H, et al. Circular RNA ACVR2A suppresses bladder cancer cells proliferation and metastasis through miR-626/EYA4 axis[J]. Molecular Cancer, 2019, 18:95.
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-V001A-20201229