

2× qPCR Mix for microRNA (ROX2 plus) 操作说明

Cat. No.: EZB-miQP2

一、试剂盒简介

本试剂盒是采用嵌合荧光染料法进行 microRNA 定量反应的专用预混试剂。试剂盒中包含了与 microRNA 逆转录试剂盒 (货号: EZB-miRT2) 配套的通用型反向引物, 且经过特殊的优化, 仅需自行设计一条正向引物, 就能够很好地用于 microRNA 的定量检测。本试剂盒的 2× qPCR Mix for microRNA (ROX2 plus) 包含化学法热启动的 DNA 聚合酶以及高度优化的 buffer, 能够极大地减少非特异性扩增; 同时, 预混了适合不同仪器型号的低浓度 ROX2 参比染料; 使用时, 只需在配制的反应体系中加入模板和引物, 再加水至指定体积即可, 十分便于使用。使用本产品进行 qPCR 反应, 可以在宽广的定量区域内得到良好的扩增曲线, 对 microRNA 表达进行准确的定量检测, 重复性好, 可信度高。

二、试剂保存条件

本试剂盒建议置于 -20°C 避光保存。

三、适用的仪器型号 (如果仪器不在下表中, 请使用 EZB-miQP1)

ABI 7500, 7500 Fast, Quant-Studio 3, 5, 6, 7, 12K Flex, Dx, ViiA™7; Stratagene MX4000™, MX3000P™, MX3005P™.
Bio-Rad CFX96™, CFX384™, iCycler iQ™, iQ™5, MyiQ™, MiniOpticon™, Opticon®, Opticon 2, Chromo4™; Roche LightCycler™ 96, Roche LightCycler™ 480; Eppendorf Mastercycler® ep realplex, realplex 2s; Illumina Eco qPCR; Qiagen/Corbett Rotor-Gene® Q, Rotor-Gene® 3000, Rotor-Gene® 6000; Thermo Scientific PikoReal Cyler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®.

四、简要操作步骤

1、使用前将 2× qPCR Mix for microRNA (ROX2 plus)、Universal 3' qPCR Primer (即所有待检测 miRNA 的 qPCR 下游引物, 包括 U6)、U6 Primer (即 U6 的 qPCR 上游引物) 从 -20°C 冰箱中取出, 冰上放置 5 ~ 10 分钟或用手紧握试剂管使之充分融化, 上下颠倒 5 ~ 10 次使之充分混匀 (非常重要), 然后使用离心机短暂离心至管底, 放在冰上备用。

2、逆转录反应得到的 cDNA 建议稀释并充分混匀后再作为模板使用, 这样可以提高实验结果的重复性。通常建议稀释 5 ~ 10 倍后再使用 (具体的稀释倍数根据基因的表达丰度来确定)。在 20 µl 的 qPCR 反应体系中: 如果模板 cDNA 稀释 5 倍, 建议使用 2 µl 的 cDNA (1 ~ 4 µl); 如果模板 cDNA 稀释 10 倍, 建议使用 4 µl 的 cDNA (2 ~ 8 µl); 如果模板 cDNA 稀释 20 倍, 建议使用 9.2 µl 的 cDNA; 如果模板 cDNA 不稀释, 建议使用 0.4 µl 的 cDNA (0.2 ~ 0.8 µl)。

假定模板 cDNA 在使用前已经用灭过菌的 ddH₂O 稀释了 5 倍 (20 µl cDNA 加 80 µl ddH₂O 稀释至 100 µl), 按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制:

成分	10 µl 体系	20 µl 体系
2× qPCR Mix for microRNA (ROX2 plus)	5 µl	10 µl
Specific forward qPCR Primer (10 µM)	0.2 µl	0.4 µl
Universal 3' qPCR Primer	0.2 µl	0.4 µl
cDNA	1 µl 0.5 ~ 2 µl	2 µl 1 ~ 4 µl
ddH ₂ O	补足到 10 µl	补足到 20 µl

3、qPCR 加样体系的配制: 为了使加样误差降低到最低, 一般建议将 cDNA 和 ddH₂O 配制成预混液, 2× qPCR Mix for microRNA (ROX2 plus)、Specific forward qPCR Primer 和 Universal 3' qPCR Primer 配制成预混液, 分别混匀后再依次加入到每个反应孔中 (例如, 对于 20 µl 的 qPCR 反应体系: 每个反应孔中, cDNA 和 ddH₂O 的预混液加 9.2 µl, 2× qPCR Mix for microRNA (ROX2 plus)、Specific forward qPCR Primer 和 Universal 3' qPCR Primer 的预混液加 10.8 µl); 或者根据个人熟练掌握的加样方式进行加样。

4、加样完成后，盖上封板膜并封紧，用离心机 1000 rpm 离心 1 分钟，将液体离心至 qPCR 孔板底部。

5、qPCR 反应程序如下：

Step	1	2	
	热启动酶活化 ^{*1}	PCR 反应	
		循环数 (40 cycles)	
		解链	退火&延伸 (采集荧光信号) ^{*2}
温度	95°C	95°C	60°C
时间	5 min	10 sec	30 sec
体积	10 µl/ 20 µl		

上述反应程序设置好后，按照仪器默认的程序添加熔解曲线。

注意： *1: 95°C 反应 5 分钟的目的是活化热启动酶，该步骤为必须步骤，因此不能省略；

*2: 在退火&延伸这一步骤需要进行荧光信号的采集。

下方表格提供了一种代表性的熔解曲线程序供参考：

Step	1	2	3
加热或降温速度	100%	100%	1%
温度	95°C	60°C	95°C
时间	15 sec	1 min	30 sec
采集数据	-	-	升温阶段 采集数据

五、关于 qPCR 反应是否良好的判断

1、如果扩增曲线呈典型的 S 型曲线，荧光背景信号阶段、荧光信号指数扩增阶段及平台期均完整可见，熔解曲线单峰，内参 Ct 值在合理范围内 (通常可在 13 ~ 22 之间，典型的内参 Ct 值在 15 ~ 20 之间)，则可认为该反应正常；

2、如果同一个模板和引物的重复孔的 Ct 值相差 0.5 以内；

同时满足以上两个条件的可以认为数据可用。

六、关于 microRNA 的 qPCR 上游引物的设计

1、首先，在 microRNA 数据库网站 (例如 miRBase，网址：<http://www.mirbase.org/>) 上搜索得到目的 microRNA 序列；

2、复制目的 microRNA 序列，将其中的 U 改成 T，然后去掉 3' 端的最后 6 个碱基；

3、在 5' 端加上 3 ~ 6 个碱基 (目的是提高引物的 Tm 值，加入的序列以 GC 为主，例如 CGGGC, GCGGGC, A/TGCCCG 等)，是上下游引物的 Tm 值相近，得到最终的正向引物序列。

七、常见的注意事项、操作要点及优化方法

1、实验开始前首先验证引物是否适用，标准与上述标准类似，主要观察扩增曲线与熔解曲线；

2、引物验证后应该分装为几份，防止污染或降解；

3、RNA 的质量及 cDNA 的质量对 qPCR 的结果具有很大的影响，应尽量保证 RNA 不降解，通常建议 RNA 提取后尽快进行逆转录，且避免反复冻融。如果预计使用量较大，则可以一次多逆转录几管 cDNA。如果不立即使用 cDNA，则建议保存在 -80°C 冰箱。