



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: HmiRQP0227, HmiRQP9001

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; www.fulengen.com

E-Mail: sales@fulengen.com; 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
HmiRQP0227	hsmq-0031	MIMAT0000069	hsa-miR-16	75bp	2 μ M	200 rxn
HmiRQP9001	hsnRNA U6	NR_002752.1	RNU6B	75	2 μ M	200 rxn
HmiRQT0001	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 ddH₂O 稀释到使用浓度 2 μ 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 μ 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 μ 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：人源十个不同的组织所制备的 cDNA

B 验证流程

RNA 抽提

1. 样品处理

取一定量的十个不同的人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 μ 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 μ l (每 1ml TRIzol 的吸取量) 至含有 600 μ 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 μ 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 μ l。贴上标签后 -80 $^{\circ}$ C 保存。

6. RNA 浓度测定

吸取 1 μ 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 μ l，补充 DEPC 水至 18 μ l，65 $^{\circ}$ C 变性 10min 后立即冷却，加入 2 μ l 10 \times RNA loading buffer 即可电泳

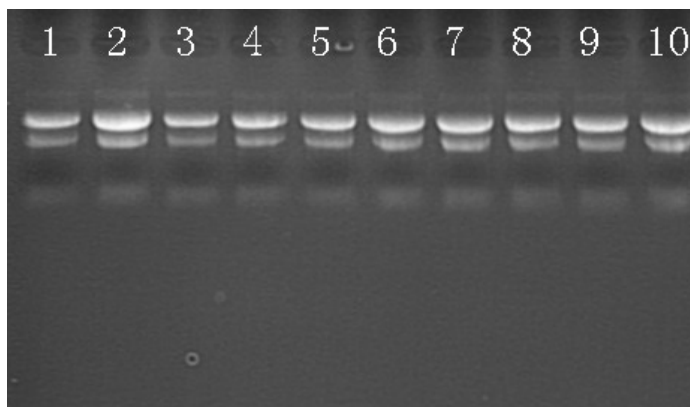
7.4. RNA 电泳

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. 十个不同组织的 RNA 电泳图（取各 3 μ 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/ μ l)	A 260/OD280
1	脑	2385	1.9
2	肺	2430	1.94
3	肝	2521	1.91
4	肾	6444	1.94
5	乳腺	2785	1.87
6	睾丸	2972	1.9
7	胎盘	3515	1.91
8	脾	3344	1.91
9	心脏	3394	1.91
10	胰腺	3101	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 μ l

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA		2 μ g
2.5U/ μ l PolyA Polymerase	1 μ l	2.5U
RTase Mix	1 μ l	
5 \times Reaction Buffer	5 μ l	1 \times
ddH ₂ O(RNase/DNase free)	补至 25 μ 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 μ g 之间调整, 如使用纯化的小分子 RNA, 其使用量可在 0.1ng~1 μ 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 μ L	1 \times
All-in-One miRNA qPCR Primer	(2 μ M) 2 μ L	0.2 μ M
Universal Adaptor PCR Primer	(2 μ M) 2 μ L	0.2 μ M
1 st strand cDNA (5 倍稀释液)	2 μ L	
ddH ₂ O	4 μ L	
Final Volume	20 μ 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

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

组分比例；试剂盒中的 50× Rox Reference Dye 使用在需用 Rox 校正的仪器，如 ABI 的定量 PCR 仪

- 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

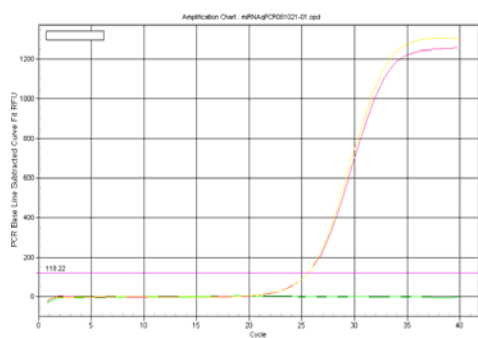
检测温度范围	升温速率	恒温时间	检测
65°C~95°C	0.5°C/次	10 sec/次	是
30°C		30sec	否

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。

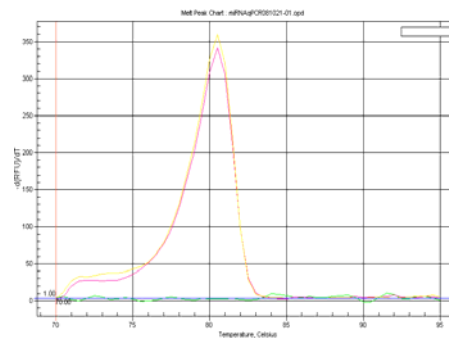
C. 引物验证结果

1. hsa-miR-16 (hsmq-0031 primer)

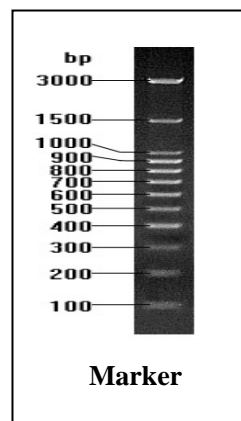
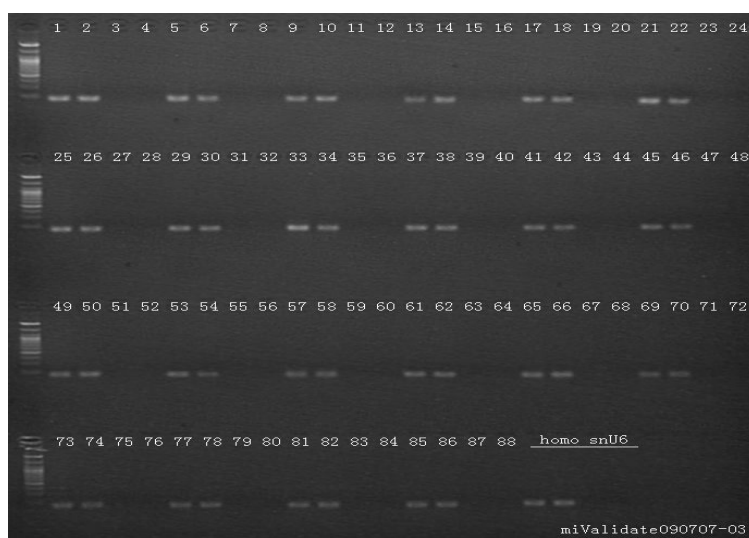
推荐退火温度为 60℃



hsa-miR-16 Amplification curve



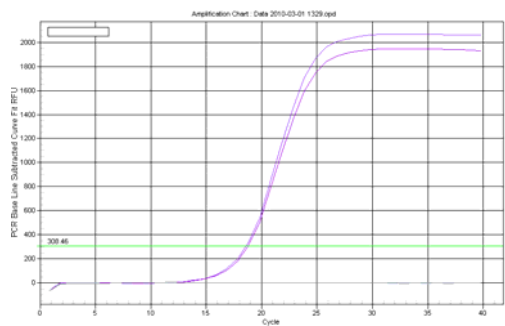
hsa-miR-16 melting analysis curve



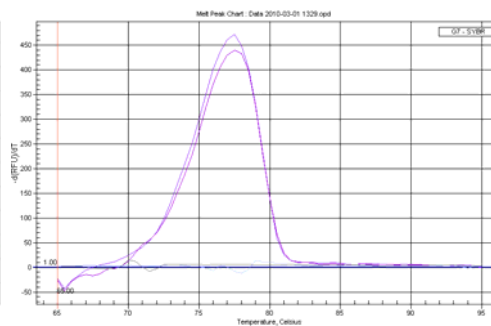
Electrophoresis Result in lane **37-38-39-40** (contains two positive controls and two NTC)
(5 µl of the PCR of products, run on 3% agarose gel)

2. RNU6B (hsnRNA U6 primer)

推荐退火温度为 60℃



RNU6B Amplification curve



RNU6B melting analysis curve

Electrophoresis Result in lane **homo snU6** (contains two positive controls and two NTC)

(5 µl 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。