



miProfile™ miRNA qPCR Primer Manual and Validation Report

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

Catalog number: HmiRQP9071

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. miProfile 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。miProfile 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miProfile 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 (bp)	Package Conc.	Package size
HmiRQT0001	Positive Control cDNA Mix				10 × Mix	3 rxn

储存条件: -20 °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 (Cat Nos. AOMD-Q020 or 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2μM（即为10×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×量（即终浓度为0.2μM）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0.2μM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“miProfile 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

miProfile 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. miProfile 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205min, 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500μl冷冻的75%乙醇，弹起沉淀后 12000g
冷冻离心5min (6℃)，去上清，再稍离，吸去上清液。

5 . RNA溶解

风干约5010min (注意不能风太干，只需要沉淀泛白即可)，加入DEPC水约30μl。贴上标签后-80℃保存。

6 . RNA浓度测定

吸取1μl 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℃左右加入10ml 10×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×Mops)

取50ml 10×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

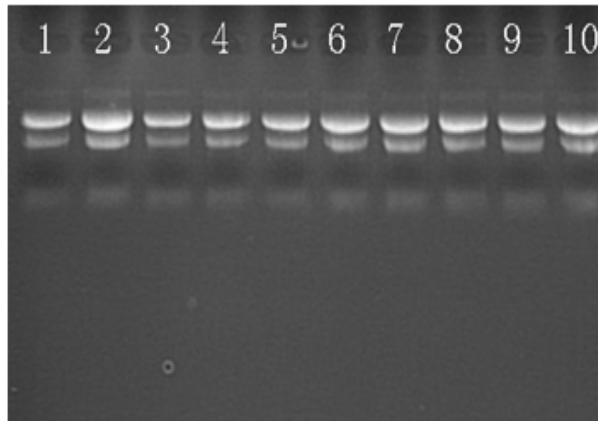
取RNA样品3μl，补充DEPC水至18μl，65℃变性10min后立即冷却，加入2μl 10×RNA loading
buffer 即可电泳

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3μl 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	Concentration (ng/μl)	OD A260/A280
1	脑	2385	1.9
2	肺	2430	1.94
3	肝	2521	1.91
4	肾	3444	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25μl

miProfile™ miRNA qPCR Primer Manual and Validation Report

试剂组分	体积	终浓度
Total RNA		2 µg
2.5 U/µl Poly A Polymerase	1 µl	2.5 U
RTase Mix	1 µl	
5X Reaction Buffer	5 µl	1X
ddH ₂ O (RNase/DNase free)	补至25µl	

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-5µg之间调整, 如使用纯化的小分子RNA, 其使用量可在0.1ng-1µg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°C反应60min, 结束后再进行85°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。混匀配制的反应mix, 短暂离心后在37°C反应60min, 结束后再进行85°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×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× All-in-One qPCR Mix	10 µL	1×
miProfile miRNA qPCR Primer	(2 µM) 2 µL	0.2 µM
Universal Adaptor PCR Primer	(2 µM) 2 µL	0.2 µM
1 st strand cDNA (5倍稀释液)	2 µL	
ddH ₂ O	4 µL	
Final Volume	20 µL	

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× Rox Reference Dye 使用在需用Rox 校正的仪器, 如ABI的定量PCR仪

3. 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。

4. 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)

miProfile™ miRNA qPCR Primer Manual and Validation Report

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

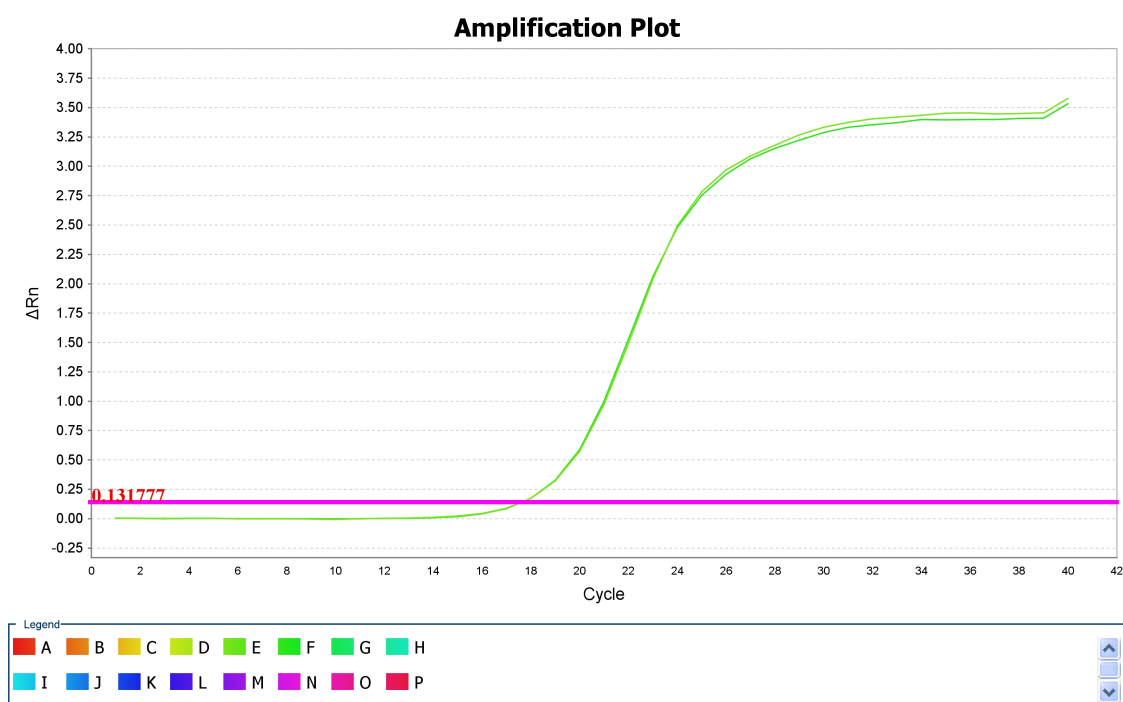
检测温度范围	升温速率	恒温时间	检测
66°C ~ 95°C	0.5°C/ 次	6 sec/ 次	是
30°C		30 sec	否

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。

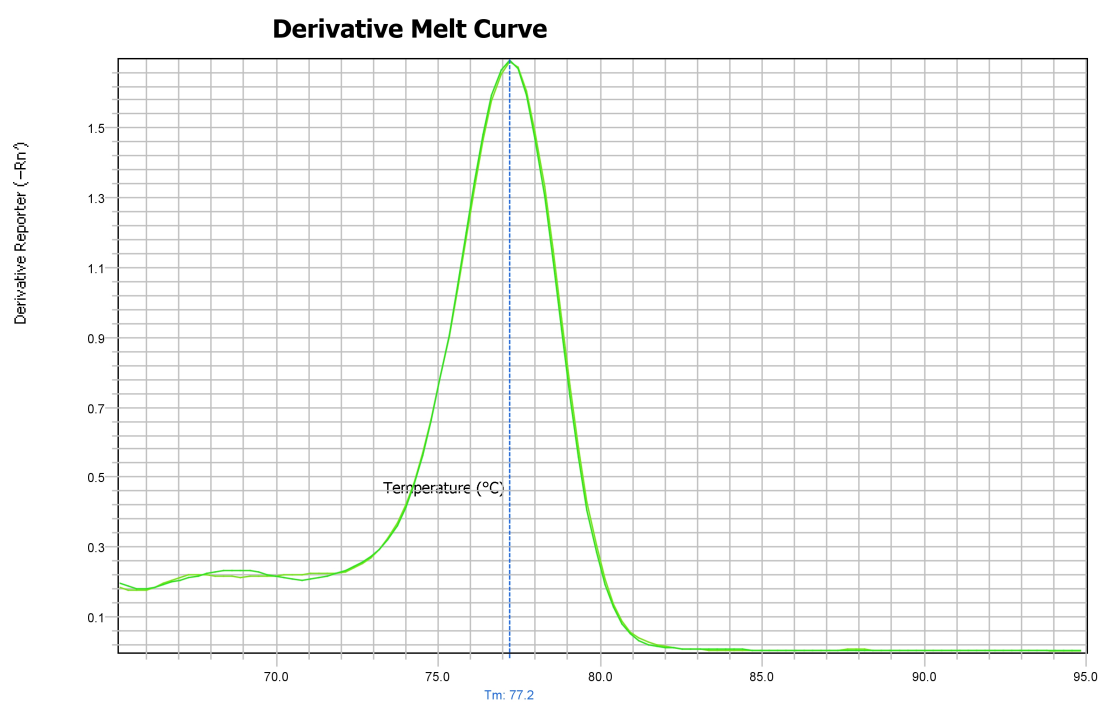
C.引物验证结果

1. SNORD68 (hsnRNA U68 primer)

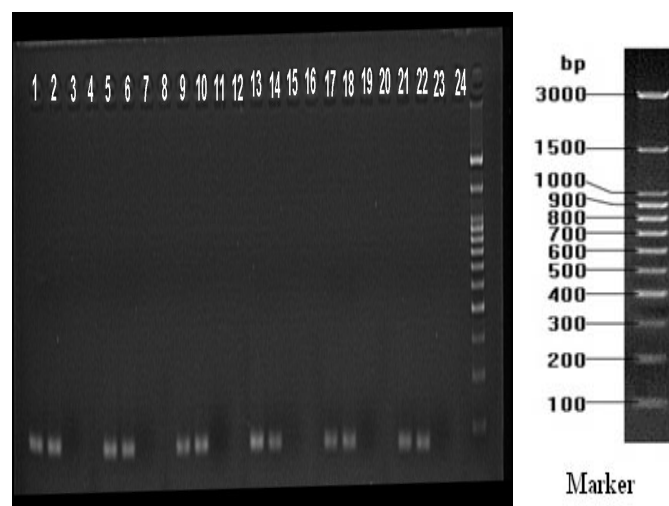
推荐退火温度为60°C



SNORD68 Amplification curve



SNORD68 melting analysis curve



Electrophoresis Result in lane 17-18-19-20 (contains two positive controls and two NTC)(5 μ l of the PCR of products, run on 3% agarose gel)

miProfile™ miRNA qPCR Primer Manual and Validation Report

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。

GeneCopoeia Products are for Research Use Only

Copyright © 2016 GeneCopoeia, Inc

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

NanoDrop™ (Thermo Scientific)

AOPM1309