Bulge-Loop miRNA qRT-PCR 引物使用说明

Bulge-Loop miRNA qRT-PCR 是一种常用的 miRNA 表达量的检测方法，基于特异性的茎环状 RT 引物进行 RT 反应，再结合特异性的正向引物进行 qPCR 检测，具有很高的灵敏度和特异性，确保反应不受其前体及其他因素干扰；序列高度同源的 miRNAs 也可精确区分。该方法采用 SYBR Green 染料检测。

一、引物组成

试剂	浓度	储存条件	运输条件
Bulge-Loop miRNA RT Primer	100 μmol/L	-20˚C	常温运输
Bulge-Loop miRNA Forward Primer	100 μmol/L		
Bulge-Loop miR-Reverse Primer	100 μmol/L		

备注

1. 产品以**100μmol/L的**水溶液的形式提供，**常温运输**，于-20℃或更低温度储存，不反复冻融的情况下可稳定保存**一年**。
2. 使用前请瞬时离心引物，避免引物储存液粘附于管壁或管盖上。
3. 引物离心之后建议分装保存，减少多次反复冻融。
4. 稀释引物建议使用灭菌的ddH_2O或者RNA free water或DEPC水。
5. 取部分100 μmol/L的引物原液，例如取10ul的100 μmol/L的引物原液加入90ul的无RNAase水或DEPC水或灭菌的ddH2O，吹打混匀，即可配置为10μmol/L的引物储存液用于后续qPCR使用。余下的100 μmol/L的引物原液-20℃保存即可。高浓度的引物更有利于引物的保存。

使用前注意事项：

1） 在操作过程中，需注意避免（核酸酶 RNAase，温度，极端 PH 等）可能导致的产品降解。请遵循 RNA 及 DNA 的操作规范，带手套操作，ep 管，移液枪和枪头等都要避免污染，实验过程中，产品最好于冰上放置。

2） 对于细胞，组织样本（人，大鼠，小鼠）的 miRNA 相对定量检测分析，一般建议使用 U6 snRNA、5S rRNA 通用引物作为内参。其他物种的内参引物需客户自行选择确定。

3）细胞上清/血浆/血清/尿液等及外泌体的 miRNA qPCR 检测需要在提取 RNA 前加入外参标准品 miRNA（常用外参标准品：cel-miR-39-3p）。细胞/组织等类型样本如不需要做绝对定量检测，一般无需添加外参。

实验方法

以下是搭配本司的配套试剂盒 SNB-Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Detection Kit 进行检测试验的操作方法，若使用其它公司的 qRT-PCR 试剂盒，请参考对应试剂盒的操作说明书。

组分编号	组分名称	规格	RXN
GAS1010-1	5 x RT Buffer	200μL	100T
GAS1010-2	RTase Mix	200μL	100T
GAS1010-3	2X Universal SYBR Green Fastq PCR Mix	3x1mL	300T

SNB-Bulge-Loop miRNA qRT-PCR Detection Kit 组分明细

逆转录 RT 反应

取对应 miRNA 的 Bulge-Loop miRNA RT Primer (10umol/L)，需对应目的 miRNA 使用，振荡混匀。

1. RT反应体系

以 10ul RT 反应体系进行实验（冰上操作）:

试剂	加量/孔
RNA 模板(0.5~2ug)	? ul
Bulge-Loop miRNA RT Primer (10umol/L)	0.4ul
5X RT Buffer	2ul
RTase Mix	2ul
无 RNAase 水/DEPC 水	补齐至 10ul

2. RT反应条件

RT反应体系混匀后，瞬时离心，RT 反应程序为：42℃反应60 分钟，70℃反应10分钟。

注意事项:

1. RT 反应体系可按照实验需求等比缩放。
2. RT 引物浓度可在 200nM～800nM 之间优化;
3. RNA 模板体积较大时，请确保 RNA 是溶于水中而不是 TE Buffer 中，因为 TE 会抑制逆转录反应。
4. RT 反应结束后请立即将 cDNA 产物取出，逆转录产物 cDNA(RT 反应液)可立即进行后续 qPCR 反应，或置于-20 °C 保存并在 3 个月内使用；长期存放建议分装后在-80°C 保存。cDNA 应避免反复冻融。
5. 每个 miRNA 及内参建议分别单独逆转录，有合并逆转录需要的，需先行比较合并逆转录结果和单独逆转录结果是否一致。

miRNA qPCR 反应 （冰上操作）

染料法定量 PCR 20 μL 反应加样量体系（推荐以 20ul qPCR 反应体系进行实验）

试剂	终浓度	加量/孔
2X Universal SYBR Green Fast qPCR Mix	1×	10 μL
Bulge-Loop miRNA Forward Primer（10 μmol/L）	0.2 μmol/L	0.4 μL
Bulge-Loop miR-Reverse Primer （10 μmol/L）	0.2 μmol/L	0.4 μL
RT product （建议100pg-50ng之间为佳）		Variable
无RNAase水/DEPC水		补至 20 μL

注 意 事 项 ：

1：配制好反应体系轻轻混匀上述反应体系（避免剧烈涡旋振荡）

2：Forward Primer，Reverse Primer 初始反应浓度推荐使用 200nM，最佳浓度可以在 100nM～800nM 之间优化；。扩增效率不高的情况下，可提高引物的浓度；发生非特异性反应时，可降低引物浓度，并优化反应体系。

3：DNA最高使用量不宜超过 qPCR 反应体系的 1/10，对于表达丰度较高的miRNA，可将 cDNA 稀释后再进行qPCR，一般稀释比例可以在 10～1000 倍之间，请根据具体的Ct 值进行调整。

4：该miRNA qPCR反应程序适用于市面上所有型号的荧光定量PCR仪器（包括HighROX、LowROX以及NoROX需求的仪器），无需额外添加ROX。

5：Bulge-Loop miR-Reverse Primer为miRNA通用引物，但不可用于U6/5S，U6/5S需用对应的U6/5S的Reverse Primer.

6：2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix在使用前请充分融解，避免强光直射，并注意避光保存。

7：2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix中含有甘油，在使用前请轻轻混匀，避免产生气泡；取用之前应混匀并离心。使用后立即放回-20°C冰箱保存。

8：2 X universal SYBR Green Fast qPCR Mix含有DNA聚合酶，使用时请置于冰上，短时间内多次使用可在4°C暂存，应尽量避免反复冻融。

实时定量 PCR 反应程序

客户可依据具体需求以及结合日常 qPCR 常用程序选择二步法或者三步法来进行 qPCR 反应。

二步法qPCR程序设置如下：

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95℃	3 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95℃	5 sec	PCR 模板变性
	退火+延伸	60℃	30~34 sec	退火+延伸
溶解曲线分析：采集荧光信号，建议按照仪器qPCR反应程序仪器默认的采集信号设置 *注：确保延伸后立刻进行荧光信号采集。延伸时间根据qPCR仪所需数据采集时间自行调整：使用StepOnePlus请设定为30s；使用7300请设定为31s；使用7500请设定为34s。				

三步法qPCR程序设置如下：

循环	步骤	温度	时间	内容
1 X	预变性	95℃	3 min	Taq 酶激活
40 X	变性	95℃	5 sec	PCR 模板变性
	退火	60℃	20 sec	退火
	延伸	70℃	10 sec	延伸
溶解曲线分析：采集荧光信号，建议按照仪器qPCR反应程序仪器默认的采集信号设置				

备注：

1：无特殊说明，我司 qPCR 引物退火温度均按 60±3℃进行设计。qPCR 程序设置时选择通用退火温度 60℃， 最佳退火温度可在 57℃ ~ 63℃之间适当调整；

2：部分仪器如 ABI 系列仪器收集荧光信号需要较长的恒温时间方能收集信号，使用此类仪器建议使用两步法，将退火及延伸反应合并，退火延伸温度设置为 60℃，时间设置为仪器收集信号所需的最短时间。

3： SYBR Green 染料法进行的 qPCR 检测反应都需要在循环结束后立即进行熔解曲线分析，检测温度为 70℃ ~ 95℃，升温速率为 0.5℃/次，恒温时间为 5 sec/次。

数据分析

1.重复管之间Ct值的STD < 0.2，不同批次间同一实验的Ct值的 STD < 0.5（不同批次同一实验对比需保证阈值设置基本一致）。

2.扩增产物的熔解曲线无明显非特异性扩增产物(杂峰)或引物二聚体杂峰(必要时请进行琼脂糖电泳确认)，并且熔解曲线的Tm值一般在80-95℃之间。