

EZ-Probe qPCR Master Mix for microRNA (ROX1 plus)

说明书

Cat. No.: EZB-miProbe-R1

一、产品简介

本试剂盒是采用探针法 qPCR 对 microRNA 表达进行定量检测的专用预混型试剂。试剂盒中包含与 EZ-press microRNA Reverse Transcription Kit 系列试剂盒 (货号: EZB-miRT4 和 EZB-miRT1) 配套的通用型反向引物 (Universal 3' qPCR Primer) 和探针 (Probe) 以及常用内参 U6 的 qPCR 正向引物 (U6 Primer), 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× EZ-Probe qPCR Master Mix for microRNA (ROX1 plus) 包含具有超强扩增能力和抗干扰能力的化学法热启动的 DNA 聚合酶和高度优化的缓冲液体系, 极大地减少非特异性扩增。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, 特异性、灵敏度高, 重复性好, 可信度高。

二、产品组分

组分	货号 (规格)	EZB-miProbe-R1-S (200 Rxns, 20 µl/Rxn)	EZB-miProbe-R1 (500 Rxns, 20 µl/Rxn)
2× EZ-Probe qPCR Master Mix for microRNA (ROX1 plus) ^{*1}		2 ml	5 ml
Probe (10 µM)		90 µl	220 µl
Universal 3' qPCR Primer (10 µM)		200 µl	500 µl
U6 Primer (10 µM)		100 µl	250 µl

注: *1. 预混的 ROX1 用于校正不同孔之间的荧光信号误差。

三、保存条件

本产品所有组分建议置于 -20°C 避光保存。收到产品以后, 如果近期使用不多, 建议将探针分装为 3~4 管, 避光冻存于 -80°C。过期日期详见产品标签中的有效期信息。

四、适用的仪器型号 (如果仪器不在下表中, 请使用 EZB-miProbe-R2)

ABI 5700, 7000, 7300, 7700, 7900, 7900HT, 7900HT Fast; StepOne™, StepOne Plus™.
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 Cycler; Analytikjena qTOWER 3G; Cepheid SmartCycler®; Bioer Linegene 9600; HONGSHI SLAN®-96P.

五、注意事项

1. 实验开始前首先验证引物是否适用, 参考此说明书第七项标准, 主要观察扩增曲线及 Ct 值。扩增曲线正常且 Ct 值在合理范围内 (通常为 13~32 之间) 的一般可以认为引物可用。
2. 引物验证好用后应分装几份并放在 -20°C 保存, 以防止污染或降解。
3. microRNA 及 cDNA 的质量均对 qPCR 的结果具有很大的影响, 应尽量保证 microRNA 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，则可以一次多逆转几管 cDNA。如果不立即使用 cDNA，则建议保存在 -80°C 冰箱。

六、操作步骤

1. 使用前，将 2× EZ-Probe qPCR Master Mix for microRNA (ROX1 plus) 等试剂从 -20°C 冰箱中取出，冰上放置 5 ~ 10 min 或用手紧握试剂管使之充分融化，上下颠倒 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表达丰度来确定）。假定模板 cDNA 在使用前已经用灭过菌的 ddH₂O 稀释了 5 倍，按照如下表格进行 qPCR 反应体系的配制（为了使加样误差降低到最低，建议将 cDNA 和 ddH₂O 配制成预混液，下表剩余组分配制成预混液，分别混匀后再依次加入到每个反应孔中）：

成分	10 μl 体系	20 μl 体系
2× EZ-Probe qPCR Master Mix for microRNA (ROX1 plus)	5 μl	10 μl
Probe (10 μM)	0.2 μl	0.4 μl
Specific forward qPCR Primer (10 μM)	0.4 μl	0.8 μl
Universal 3' qPCR Primer (10 μM)	0.4 μl	0.8 μl
cDNA	1 μl (0.5 ~ 2 μl)	2 μl (1 ~ 4 μl)
ddH ₂ O (灭过菌)	补足到 10 μl	补足到 20 μl

注：※关于引物浓度：通常引物终浓度为 0.4 μM，也可以根据情况在 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整终浓度。

3. 加样完成后，盖上封板膜并封紧，用离心机 1000 rpm 离心 1 min，将液体离心至 qPCR 孔板底部。
4. qPCR 反应程序如下：

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

注意：1. 95°C 反应 5 min 的目的是活化热启动酶，此步骤为必须步骤，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；3. 不需要跑熔解曲线；4. 本试剂盒采用的是 TaqMan 探针法 qPCR，试剂盒中 Probe 的 5'端标记的荧光报告基团是 FAM、3'端标记的荧光淬灭基团是 MGB。

七、关于 qPCR 反应是否良好的判断

- ① 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，内参 Ct 值在合理范围内（通常在 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 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。

八、关于 microRNA 的 qPCR 正向引物的设计

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, GCGGC, ATGCCCC 等），使上下游引物的 Tm 值相近，得到最终的正向引物序列。