

描述：HaiGene 的 HG miRNA SYBR Green PCR Kit 使用 Peter 改良的 miR-Q 技术，采用特异性的上下游引物对反转录所得 miRNA 的 cDNA 产物进行定量检测【参考文献 1】。不同于其它公司的单条特异性引物扩增方法，HaiGene 采用双向特异性扩增引物（原理如图 1），从而极大提高了 miRNA 的检测特异性，其可以区分极高相似度的 miRNA 分子、减少非特异性扩增（图 2，3 所示），该试剂盒的检测灵敏度可达 0.001fM。该试剂盒对可以对任何 miRNA 分子进行检测。HG miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒共有一万余种，每一个 miRNA 分子对应一个检测试剂盒，可于 [HG miRNA qPCR kit.xls](#) 中查询 (http://www.haigene.cn/microna_qpcr_kit.html)。如果您研究的 mircoRNA 分子不在我们的列表中，请来信咨询，我们将及时给您优化设计。该试剂盒中的每一对引物均经过设计优化，确保扩增效率和特异性。使用该方法进行 miRNA 定量检测已被大量文献所采用【参考文献 2~11】。

组分

名称	(100T×20 μl)
2XHi SYBR Green qPCR Mix	1ml
50×ROX Reference Dye	200 μl
miRNA Primer F(10μM)	100 μl
miRNA Primer R(10μM)	100 μl
miRNA 标准品(1pM)	100 μl

储存：避光置于-20℃，可保存 2 年；避免反复冻融

常用内参 HG miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒

内参名称	货号	适用物种
RNU6B	AP01501	哺乳动物
RNU48	AP01502	人
RNU44	AP01503	人
SnoRNA135	AP01504	鼠
SnoRNA202	AP01505	鼠

注：其它 miRNA 荧光定量检测试剂盒见 [HG miRNA qPCR kit.xls](#)。

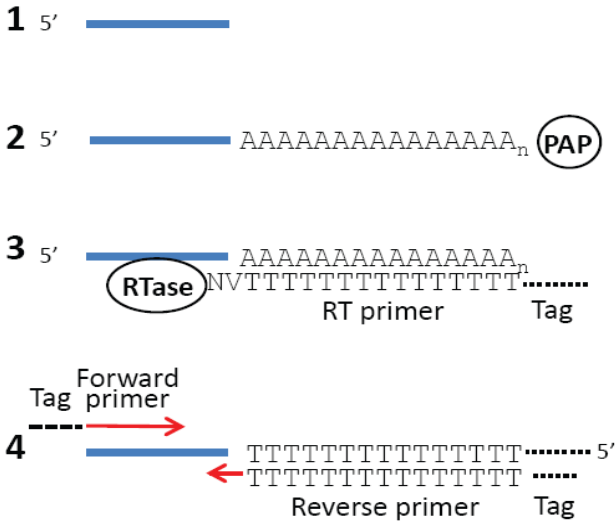


图 1：Peter 改良 miR-Q 检测原理图

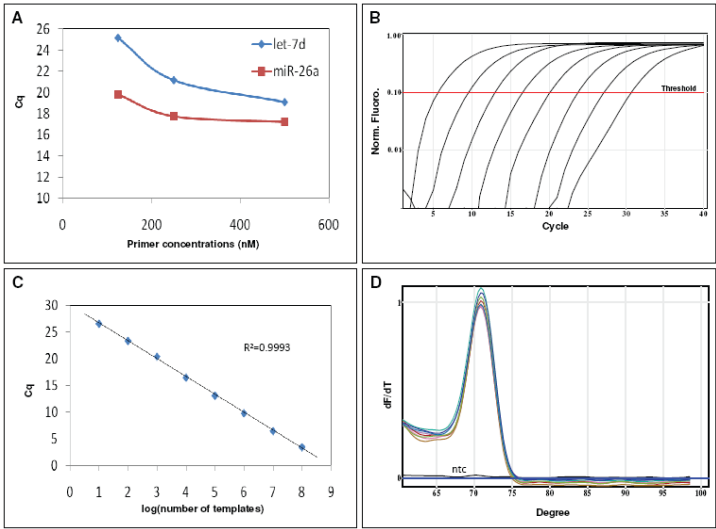


图 2：高效的扩增 miRNAs

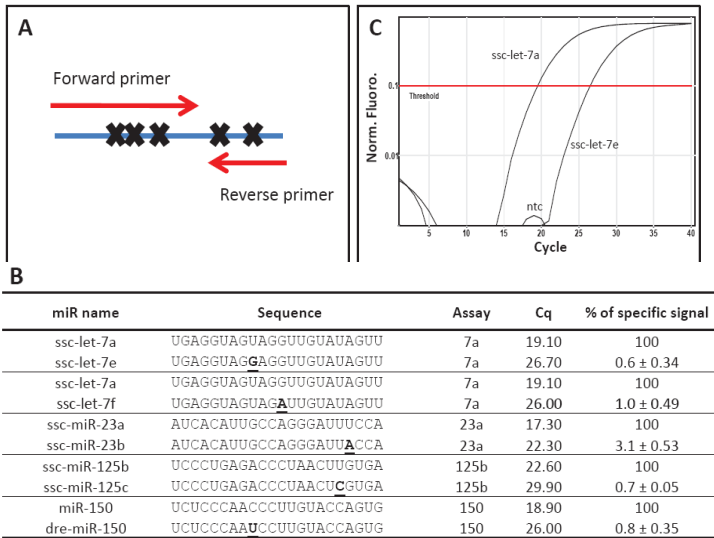


图 3：有效的区分相似度很高的 miRNAs

操作方法

1. 按以下组分配制反转录反应液

microRNA (0.01-0.1 µg) or Total RNA	0.1-2 µg
4×One step miRNA RT Solution	5 µl
*10×miRNA RT Primer	2 µl
Rnase Free H ₂ O	Up to 20 µl

2. 在 PCR 仪上按以下条件进行反应:

37°C	60min
95°C	5min

3. 获得 cDNA 产物后使用 HG miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒进行 miRNA 定量检测。

根据机型选择步骤 A 或 B，配制反应体系

A: 需要添加 ROX 染料进行反应孔间信号矫正的 Real-Time PCR 仪, 包括: ABI PRISM 7900HT、7300、7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems); Mx3000P (Stratagene)等。按照如下组分配制 20 µl PCR 反应体系:

终浓度

2×Hi SYBR Green qPCR Mix	10 µl	1×
50×ROX Reference Dye	0.4 µl	1×
miRNA Primer F(10µM)	0.4 µl	
miRNA Primer R(10µM)	0.4 µl	
cDNA 模板	1~2.5 µl	
ddH ₂ O	Up to 20 µl	

*:引物初次使用请用 0.4 µl, 视实验结果进行调整。

B:无需添加 ROX 染料进行反应孔间信号矫正的 Real-Time PCR 仪, 包括: LightCycler (Roche Diagnostics); MiniOpticon、Opticon2、Mx3000P (Stratagene)等。按照如下组分配制 20µl PCR 反应体系:

2×Hi SYBR Green qPCR Mix	10 µl	1×
miRNA Primer F(10µM)	0.4 µl	
miRNA Primer R(10µM)	0.4 µl	
cDNA 模板	1~2.5 µl	
ddH ₂ O	Up to 20 µl	

*:引物初次使用请用 0.4 µl, 视实验结果进行调整。

4 进行 Real-Time PCR 反应,

通常采用两步法, 程序如下:

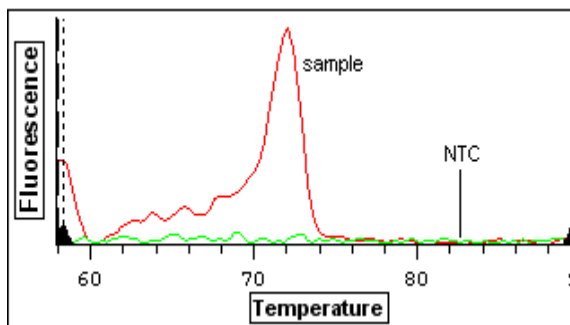
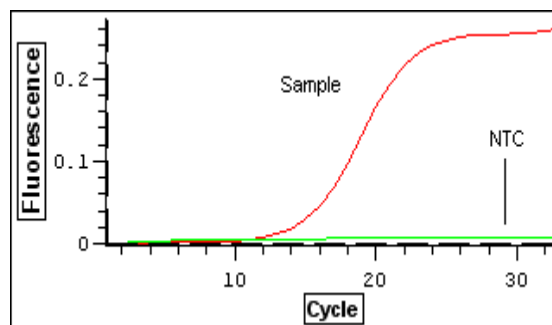
Stage 1:	95°C	15min
Stage 2:	95°C	10s
	60°C	30s 35cycles

Stage 3: Dissociation analysis

注意:使用该方法通常可以准确检测到>0.01fM 的 microRNA 分子, 过多的循环数会造成精确性降低。推荐的循环数为 30 个, 在检测极低样品浓度时可将循环数调整到 35 个。

5. 扩增结果分析和数据处理

反应结束后确认 Real-Time PCR 的 cDNA 样品和 NTC 阴性对照的扩增曲线和融解曲线。



6. 标准品的使用

该试剂盒配备的标准品为单链 DNA 分子，其与目标 microRNA 分子反转录产物完全相同，因此可直接用于 PCR 扩增，从而检测 PCR 体系的可靠性。其浓度为 1pM，通常 20µl PCR 体系中加入 1µl，可获得 Ct 值在 15 左右的数据。除此外，可以使用 TE Buffer 进行稀释，最低可稀释到 0.01fM，用于标准曲线扩增或绝对定量试验。

参考文献

- [1] Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. BMC Biotechnol. 2011 Jun 25; 11: 70. PMC3135530.
- [2] Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. J Anim Sci Biotechnol. 2012 PMID:22958414.
- [3] Reliable reference miRNAs for quantitative gene expression analysis of stress responses in Caenorhabditis elegans. BMC Genomics. 2014. PMID:24656064.
- [4] Profiling microRNAs in lung tissue from pigs infected with Actinobacillus pleuropneumoniae. BMC Genomics. 2012. PMID:22953717.
- [5] The role of viral and host microRNAs in the Aujeszky's disease virus during the infection process. PLoS One. 2014. PMID:24475202.
- [6] MicroRNA polymorphisms and environmental smoke exposure as risk factors for oesophageal squamous cell carcinoma. PLoS One. 2013. PMID:24205249.
- [7] Plasma proANP and SDMA and microRNAs are associated with chronic mitral regurgitation in a pig model. Endocr Connect. 2013. PMID:24029364.
- [8] Advances in microRNA experimental approaches to study physiological regulation of gene products implicated in CNS disorders. Exp Neurol. 2012. PMID:22245616.
- [9] Maternally deposited germline piRNAs silence the tirant retrotransposon in somatic cells. EMBO Rep. 2013. PMID:23559065.
- [10] miRNA expression profile analysis in kidney of different porcine breeds. PLoS One. 2013. PMID:23372853
- [11] Determination of reference microRNAs for relative quantification in porcine tissues. PLoS One. 2012. PMID:22970213.