

miScript™ miRNA PCR Array 手册

miScript II RT Kit

miScript SYBR® Green PCR Kit

miScript miRNA PCR Arrays

miScript miRNA QC PCR Array

基于 SYBR Green 染料法的实时定量
PCR 技术分析侧重于信号通路的 miRNA
和基因组 miRNome 表达的分析检测



QIAGEN 样品和检测技术

在高端新型样本和分析技术领域内，QIAGEN 具有领先地位。我们的产品能对任何生物样品进行分离和检测。QIAGEN 先进、高质量的产品和服务将为您提供一套完整、可靠的从样品分离到数据分析的工作流程。

QIAGEN 在下列领域建立了标准：

- DNA、RNA 和蛋白质的纯化
- 核酸和蛋白质的检测分析
- microRNA 研究和 RNAi
- 从样品到检测的自动化技术

我们的使命是帮助您取得杰出的成果和研究突破。如果您想了解更多地信息，请浏览 www.qiagen.com。

目录

试剂盒清单	4
运输和贮存	7
产品使用限制	7
安全信息	8
质量控制	8
简介	9
原理和实验步骤	12
模板 RNA 的要求	24
用户需提供的设备和试剂	25
实验步骤	
■ 反转录：将 RNA 反转录成 cDNA 为定量，实时 PCR 作准备	26
■ 用实时 PCR 技术分析成熟 miRNA 的表达谱	30
■ 使用相对定量 $\Delta\Delta C_T$ 法分析 miScript miRNA PCR Array 的数据	35
■ 分析成熟 miRNA 前的 cDNA 的质量控制	39
■ miScript miRNA QC PCR Arrays 的质控数据分析	42
故障排除指南	46
附录 A: 实时 PCR 数据输出和熔解曲线分析	49
附录 B: 操作 RNA 的一般性建议	52
附录 C: RNA 的制备、定量、和储存	54
产品订购信息	56

试剂盒清单

miScript II RT Kit	(12)	(50)
货号	218160	218161
标准反应次数*	12	50
miScript Reverse Transcriptase Mix	24 µl	100 µl
10x miScript Nucleics	50 µl	400 µl
5x miScript HiSpec Buffer	100 µl	400 µl
5x miScript HiFlex Buffer	100 µl	400 µl
RNase-Free Water	1.9 ml	1.9 ml
Quick-Start Protocol	1	1

* 一个标准反应指总 RNA 量为 2 µg, 体积为 20 µl (当使用 miScript HiSpec Buffer)

miScript SYBR Green PCR Kit	(200)	(100)
货号	218073	218075
反应体积为 50 µl 次数	200[†]	1000[‡]
2x QuantiTect [®] SYBR Green PCR Master Mix 包含 :	3 x 1.7 ml	25 ml
■ HotStarTaq [®] DNA Polymerase		
■ QuantiTect SYBR Green PCR Buffer		
■ dNTP mix, including dUTP		
■ SYBR Green I		
■ ROX [™] passive reference dye		
■ 5 mM MgCl ₂		
10x miScript Universal Primer	1 ml	5 x 1 ml
RNase-Free Water	2 x 2 ml	20 ml
Quick-Start Protocol	2	2

[†] 试剂量足够 4 个侧重于信号传导通路的 96 孔盘 (剩余 110 µl), 2 个 384 孔盘 (剩余 1210 µl), 2 个 miRNome 384 孔盘 (剩余 1510 µl), 或 5 个 100 孔的转子光盘 (剩余 110 µl)。

[‡] 试剂量足够 20 个侧重于信号传导通路的 96 孔盘 (剩余 0 µl), 12 个 384 孔盘 (剩余 1100 µl), 13 个 miRNome 384 孔盘 (剩余 850 µl), 或 25 个 100 孔的转子光盘 (剩余 0 µl)。

Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array							
Catalog no.	Varies						
Format	A	C	D	E	F	G	R
96-well plate containing dried assays	2, 12, or 24	2, 12, or 24	2, 12, or 24	–	2, 12, or 24	–	–
384-well plate containing dried assays	–	–	–	4	–	4	–
Rotor-Disc® 100 containing dried assays	–	–	–	–	–	–	2, 12, or 24
Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (12 per plate)	24, 144, or 288	–	24, 144, or 288	–	–	–	–
Optical Adhesive Film (1 per plate)	–	2, 12, or 24	–	4	2, 12, or 24	4	–
384EZLoad Covers (1 set of 4 per plate)	–	–	–	4 sets	–	4 sets	–
Rotor-Disc Heat Sealing Film (1 per Rotor-Disc)	–	–	–	–	–	–	2, 12, or 24

miScript miRNA HC PCR Array		
Catalog no.	Varies	
Format	E	G
384-well plate containing dried assays	2, 12, or 24	2, 12, or 24
Optical Adhesive Film (1 per plate)	2, 12, or 24	2, 12, or 24

miRNome miScript miRNA PCR Array							
Catalog no.	Varies						
Format	A	C	D	E	F	G	R
96-well plate containing dried assays	Varies	Varies	Varies	–	Varies	–	–
384-well plate containing dried assays	–	–	–	Varies	–	Varies	–
Rotor-Disc 100 containing dried assays	–	–	–	–	–	–	Varies
Optical Thin-Wall 8-Cap Strips (12 per plate)	Varies	–	Varies	–	–	–	–
Optical Adhesive Film (1 per plate)	–	Varies	–	Varies	Varies	Varies	–
Rotor-Disc Heat Sealing Film (1 per Rotor-Disc)	–	–	–	–	–	–	Varies

miScript miRNA QC PCR Array							
Catalog no.	Varies						
Format	A	C	D	E	F	G	R
96-well plate containing dried assays	1	1	1	–	1	–	–
384-well plate containing dried assays	–	–	–	1	–	1	–
Rotor-Disc 100 containing dried assays	–	–	–	–	–	–	1
Optical Thin-Wall 8-Cap Strips	12	–	12	–	–	–	–
Optical Adhesive Film	–	1	–	1	1	1	–
Rotor-Disc Heat Sealing Film (1 per Rotor-Disc)	–	–	–	–	–	–	1

实时 PCR 仪与盘的格式

Format	Suitable real-time cyclers	Plate
A	Applied Biosystems® models 5700, 7000, 7300, 7500, 7700, 7900HT, ViiA™ 7 (96-well block); Bio-Rad® models iCycler®, iQ™ 5, MyiQ™, MyiQ2; Bio-Rad/MJ Research Chromo4™; Eppendorf® Mastercycler® ep realplex models 2, 2S, 4, 4S; Stratagene® models Mx3005P®, Mx3000P®; Takara TP-800	96-well
C	Applied Biosystems models 7500 (Fast block), 7900HT (Fast block), StepOnePlus™, ViiA 7 (Fast block)	96-well
D	Bio-Rad CFX96™; Bio-Rad/MJ Research models DNA Engine Opticon®, DNA Engine Opticon 2; Stratagene Mx4000®	96-well
E	Applied Biosystems models 7900HT (384-well block), ViiA 7 (384-well block); Bio-Rad CFX384™	384-well
F	Roche® LightCycler® 480 (96-well block)	96-well
G	Roche LightCycler 480 (384-well block)	384-well
R	Rotor-Gene® Q; Rotor-Gene 6000; other Rotor-Gene cyclers	Rotor-Disc 100

运输和贮存

miScript II RT Kit 和 miScript SYBR Green PCR Kit 加干冰运输。收到后应立即将试剂盒中所有的试剂和溶液放入 -20°C 的恒温冷冻箱中。

根据目的地和同运产品而定，miScript miRNA PCR Arrays 和 miScript miRNA QC PCR Arrays 加冰袋或加干冰运输。收到后应立即放在 -20°C 的条件下储存。如此保存，miRNA PCR Arrays 和 miScript miRNA QC PCR Arrays 的有效期为 6 个月。

产品使用限制

miScript II RT Kit、miScript SYBR Green PCR Kit、miScript miRNA PCR Arrays 和 miScript miRNA QC PCR Array 只能用于分子生物学研究，不能用于疾病的诊断、预防或治疗。

使用本产品时须小心谨慎。我们建议 QIAGEN® 的所有用户应遵守 NIH 制定的关于 DNA 重组实验、及其它相关应用准则。

安全信息

您工作中如接触化学试剂，请切记身着实验服、戴好一次性手套及防护眼镜。如需更多的相关信息，请参阅相关物品安全管制表 (MSDSs)。此表以 PDF 文件格式，您可在 www.qiagen.com/Support/MSDS.aspx 网页上找到。您还可在该网页上查找、浏览、打印所有 QIAGEN 产品的物品安全管制表 (MSDSs)。

24 小时紧急救助信息

应对紧急情况的医疗信息（英文、法文、德文版本）可以全天 24 小时以下列方式获得：

含毒物质信息中心，美因兹，德国

电话：+49-6131-19240

(Poison Information Center Mainz, Germany)

(Tel: +49-6131-19240)

质量控制

为确保稳定的产品质量，根据 QIAGENISO 认证的质量管理体系，每批 miScript II RT Kit 和 miScript SYBR Green PCR Kit 都已经过预定的质量标准检测。

简介

miScript PCR 系统包含 miScript II RT Kit、miScript SYBR Green PCR Kit、miScript Primer Assay、miScript miRNA PCR Array 和 miScript miRNA PCR Array 数据分析软件。该系统可以定量检测 microRNA 的表达，具备灵敏度高和特异性强等优点。该系统以总 RNA 为起始原料合成 cDNA，无需小片段 RNA 的分离富集。只需制备 cDNA 一步就可迅速地剖析成熟 miRNA 的表达。

miScript miRNA PCR Arrays 上含有与信号传导通路紧密相关的或整个 miRNome 组的成熟 miRNA 的特异性正向引物。这些反应盘有 384 孔盘，96 孔盘，Rotor-Disc 100 孔盘等格式。miScript miRNA PCR Arrays 可用于不同的物种，性能高，也可完全定制。为确保高灵敏度和高特异性，每一反应都已通过实验验证。而且，我们提供免费、基于网络的数据分析软件，可大大简化实时 PCR 的数据分析过程。您只需上载 C_T 值，采用相对定量 $\Delta\Delta C_T$ 法，软件可自动计算基因表达的变化倍数。计算结果可以几种不同的格式输出。这一简单、方便、性能稳定的分析技术使得任何一个实验室都可分析 miRNome 基因组 miRNA，成为最前沿的用实时 PCR 技术检测成熟 miRNA 的工具。

miScript miRNA PCR Array 实验流程示意图

准备反转录反应

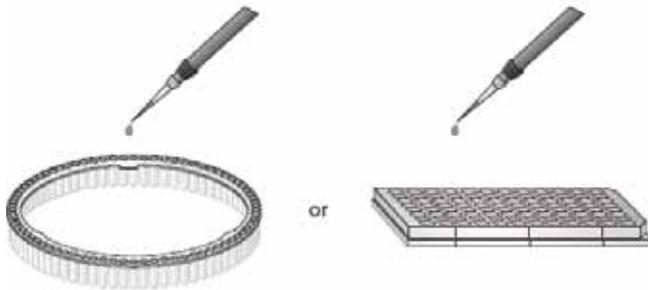


Incubate at 37°C for 60 min,
then at 95°C for 5 min

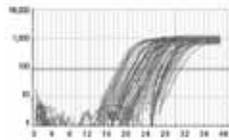
准备 PCR 混合溶液



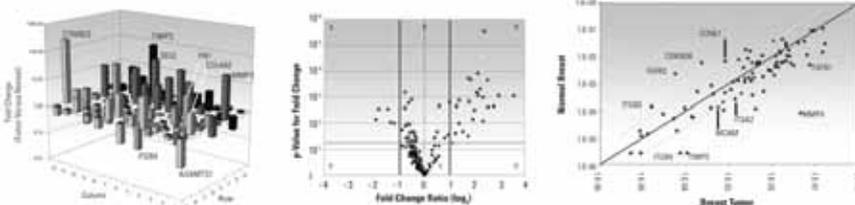
将 PCR 混合溶液加入 miScript miRNA PCR Array



进行实时 PCR 反应



使用数据分析软件分析 miScript miRNA PCR Array 的数据



miScript II RT Kit

新版本的 miScript II RT Kit 包括 miScript Reverse Transcriptase Mix、10x miScript Nucleics Mix、5x miScript HiSpec Buffer、和 5x miScript HiFlex Buffer。miScript Reverse Transcriptase Mix 含有优化的 Poly (A) 聚合酶和反转录酶。10X miScript Nucleics Mix 含有 dNTPs、rATP、oligo-dT 引物，和一个 miRNA 反转录质控参照物 (miRTC)。miRTC 用于监测反转录反应。两个缓冲液，5X miScript HiSpec Buffer 和 5X miScript HiFlex Buffer 是实时 PCR 进行 miRNA 定量分析所必需的 (图 1)。其中，5X miScript HiSpec Buffer 具备独特的配方，可选择性地将成熟 miRNA 转换成 cDNA，此 cDNA 可用于 miScript miRNA PCR Arrays 或 miScript Primer Assays 的 miRNA 定量分析。miScript HiSpec Buffer 能抑制长片段 RNA，如 mRNA 的转化。由此，所检测到的信号中不含长片段 RNA。因此，miScript HiSpec Buffer 非常适合于成熟 miRNA 表达分析中反转录反应的缓冲溶液。**用于 miScript miRNA PCR Arrays 的 cDNA 必须使用 5x miScript HiSpec Buffer 来制备。**关于如何使用 miScript Primer Assays 及其实验操作步骤，请参考 miScript PCR 系统手册。如果样品的 RNA 含量很低，可以用 5x miScript HiSpec Buffer 来制备 cDNA，然后再用 miScript PreAMP PCR Kit 来预扩增 cDNA 的量。关于如何使用 miScript PreAMP PCR Kit，请参考 miScript PreAMP 系统手册。

5x miScript HiFlex Buffer 适用于将各类 RNA (成熟 miRNA、前体 miRNA、以及其它非编码 RNA、mRNA) 转换成 cDNA，此 cDNA 可用于每一类 RNA 的定量分析。**不要使用 5x miScript HiFlex 来制备用于 miScript miRNA PCR Arrays 实时 PCR 所需的 cDNA。**关于如何使用 miScript HiFlex Buffer，请参考 miScript PCR 系统手册。

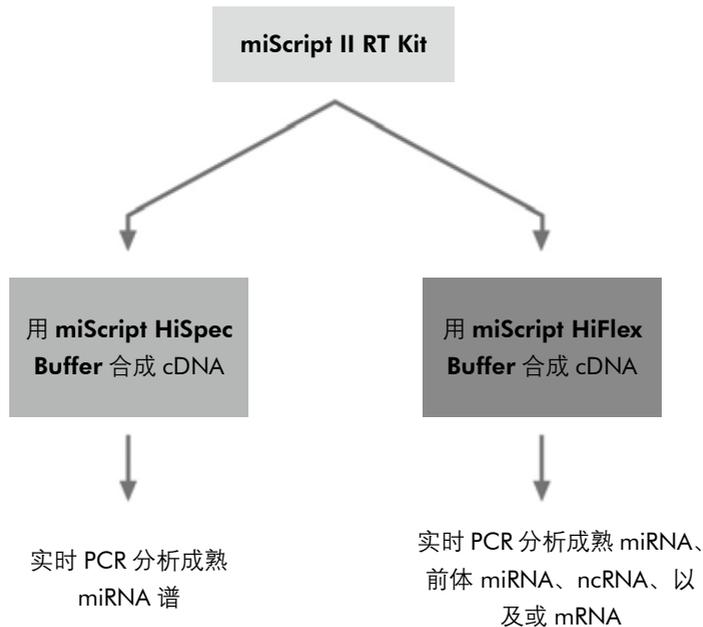


图 1. 成熟 miRNA、前体 miRNA、以及其它非编码 RNA 和 mRNA 的检测。 miScript II RT Kit 含有两种缓冲液：miScript HiSpec Buffer 合成的 cDNA 只可用于成熟 miRNA 谱的分析 (使用 miScript miRNA PCR Arrays) 或定量分析单个成熟 miRNA (使用单一 miScript Primer Assays)。关于如何使用 miScript HiSpec Buffer 和 miScript Primer Assays, 请参考 miScript PCR 系统手册。用 miScript HiFlex Buffer 合成的 cDNA 可用于各类 RNA 的定量分析, 包括成熟 miRNA、前体 miRNA、其它非编码 RNA (ncRNA)、以及或来自于同一 cDNA 的 mRNA。关于如何使用 miScript HiFlex Buffer, 请参考 miScript PCR 系统手册。

原理和实验步骤

成熟 miRNA 是一类天然、大约为 22 个碱基的非编码 RNA。它们在转录后对基因表达进行调控。与 mRNA 不同, 这些 miRNA 本身不是聚腺苷酸。

使用 miScript HiSpec Buffer 进行反转录反应

使用 miScript HiSpec Buffer 进行反转录反应时, 成熟 miRNA 和特定的小片段核 RNA 将有选择性地转换成 cDNA (snRNAs 和 snoRNAs, 参考 “Controls in miScript miRNA PCR Arrays 和 miScript miRNA QC PCR Arrays”, 第 21 页)。成熟 miRNA 由 poly (A) 聚合酶合成聚腺苷酸, 再由 oligo-dT 引物反向转录成 cDNA (图 2)。

聚腺苷酸合成和反转录反应在同一试管内同时进行。oligo-dT 引物的 3' 端含有几个简并的碱基，5' 端具有一个通用标记，可用于实时 PCR 反应时扩增成熟 miRNA。miScript miRNA PCR Arrays 和 miScript SYBR Green PCR Kit 必须一起使用来定量检测成熟 miRNA 的基因表达。聚腺苷酸合成和通用标记的完美结合可确保不会检测到基因组 DNA。

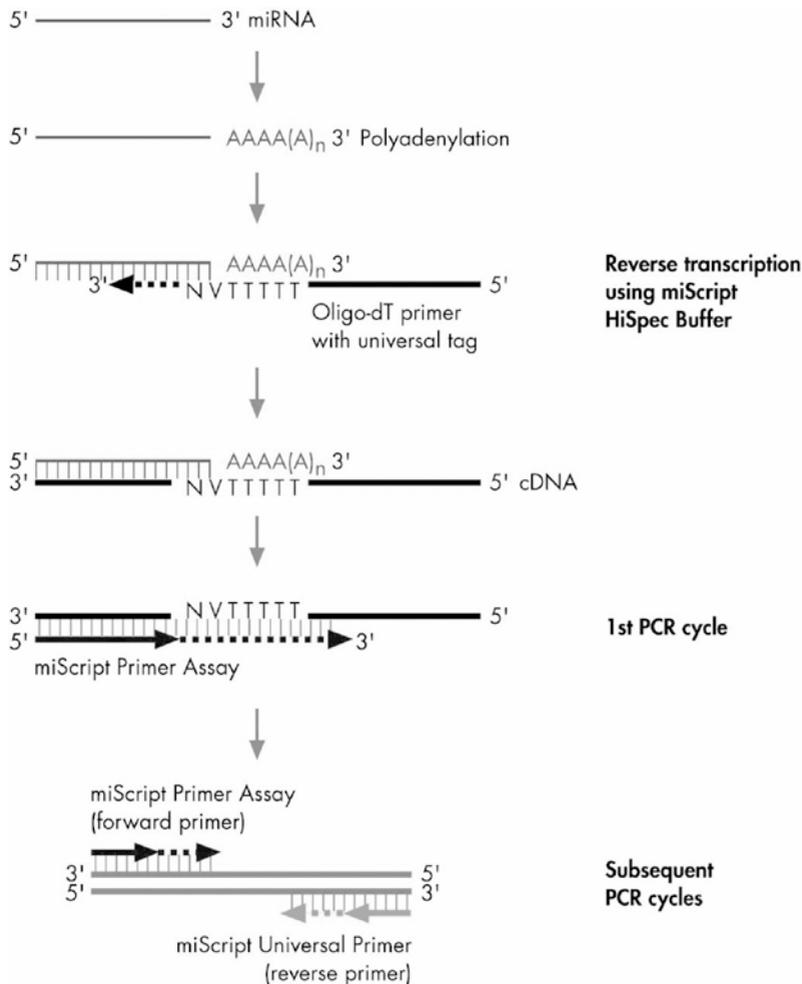


图 2. 成熟 miRNA 转换成 cDNA 的反应及其后续检测。若使用 miScript HiSpec Buffer，在反转录反应中，成熟 miRNA 先由聚 (A) 聚合酶合成聚腺苷酸，再由 oligo-dT 引物反向转录成 cDNA。此 cDNA 用于实时 PCR 检测成熟 miRNA 的表达 (使用 miScript miRNA PCR Arrays 和的 miScript miScript Universal Primer)。

可选：使用 miScript PreAMP PCR Kit 预扩增 cDNA

如果 RNA 的量很少，用户可使用 miScript PreAMP PCR Kit 来预扩增 cDNA。这一点对于分析以下样品尤为重要，如体液、福尔马林固定、石蜡包埋（FFPE）的样品，以及细胞数量很少的样品，如激光捕获显微切割（LCM）样本，流式细胞，循环肿瘤细胞，细针穿刺活检。由以上样品所获得的 RNA 产量很低，往往不足以提供可靠的 miRNA 谱的分析。

miScript PreAMP PCR Kit 与 miScript PreAMP Primer Mixes 一起使用，应用实时 PCR 可同时预扩增 400 个目标 miRNA 的 cDNA 的量。这一突破性的技术能够准确、全面地进行全基因组 miRNome 的表达分析，所需总 RNA 的量可低至于 10 纳米克。有关详细信息，请参阅 *miScript PreAMP Handbook* 或访问 www.qiagen.com/miRNA。

使用 miScript miRNA PCR Arrays 检测成熟 miRNA 的基因表达

由 miScript HiSpec Buffer 反转录合成的 cDNA 可作为 miScript miRNA PCR Arrays（含有 miScript miRNA 的特定引物）和 miScript SYBR Green PCR Kit 实时 PCR 分析的模板。miScript SYBR Green PCR Kit 含有 miScript Universal Primer（反转录引物）和 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix。先将 cDNA、miScript Universal Primer、QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 和无 RNase 的纯净水混合在一起，再将此混合物加入 miScript miRNA PCR Array 的各个孔中，就可进行成熟 miRNA 的表达分析。

miScript miRNA PCR Array 的布局

miScript miRNA PCR Arrays 有 384 孔盘，96 孔盘，Rotor-Disc 100 孔盘等格式（图 3-6）。每个盘都含有不同的质控反应物。关于每个质控反应物的用途，请详见 21 页。

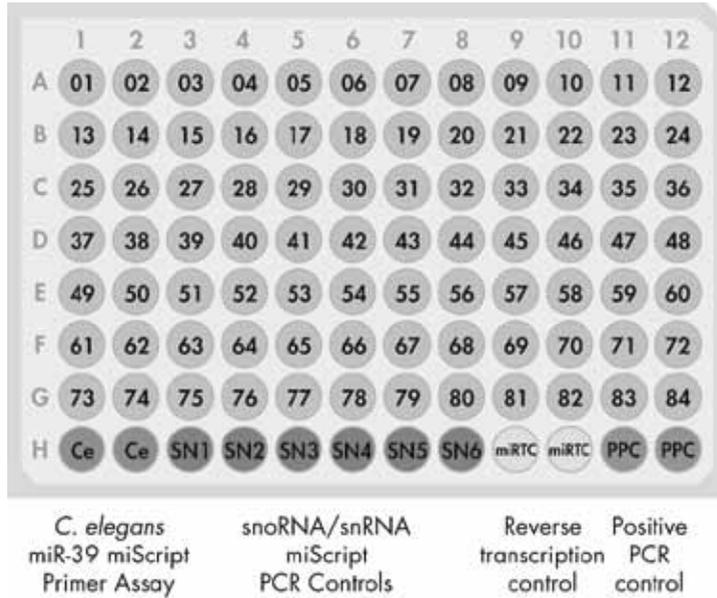


图 3. 侧重于特定信号传导通路或 miRNome 基因组 miScript miRNA PCR Array A、C、D、F 盘的设计布局。 A1 至 G12 (1–84) 孔都包含一个与通路 / 疾病 / 功能相关的检测成熟 miRNA 的 miScript 引物材料。H1 和 H2 孔含有相同的检测 *C. elegans* miR-39 miScript 的引物，以用于数据 (Ce) 的归一化。H3 至 H8，每个孔都含有一个不同的检测 snoRNA/snRNA 的材料，也可用于数据 (Ce) 的归一化 (SN1=SNORD61 检测物、SN2=SNORD68 检测物、SN3=SNORD72 检测物、SN4=SNORD95 检测物、SN5=SNORD96A 检测物 和 SN6=RNU6B/RNU6-2 检测物)。H9 和 H10 孔含有相同的反转录反应质控物 (miRTC)。H1 和 H12 孔含有相同的 PCR 反应质控物 (PPC)。

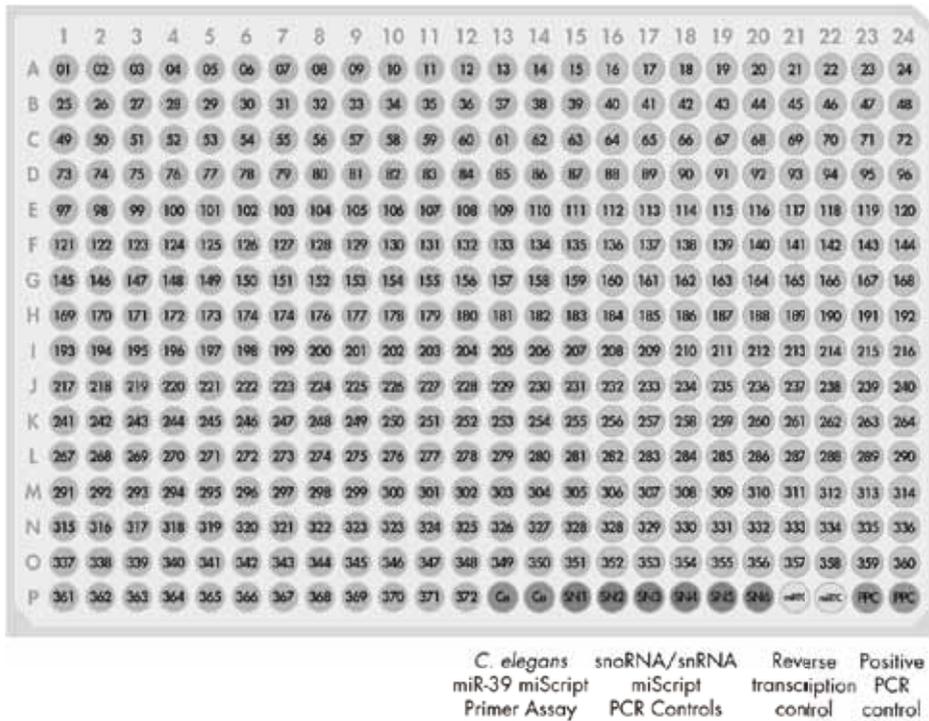


图 5. miRNome 基因组 miScript miRNA PCR Array E、G 盘设计布局。 A1 至 P12 (1-372) 孔都包含一个与通路 / 疾病 / 功能相关的检测成熟 miRNA 的引物。P13 和 P14 孔含有相同的检测 *C. elegans* miR-39 miScript 的引物, 用于数据的归一化 (Ce)。H15 至 H20, 每个孔都含有一个不同的检测 snoRNA/snRNA 的引物, 也用于数据 (Ce) 的归一化 (SN1=SNORD61 检测物、SN2=SNORD68 检测物、SN3=SNORD72 检测物、SN4=SNORD95 检测物、SN5=SNORD96A 检测物, SN6=RNU6B/RNU6-2 检测物)。P21 和 P22 孔含有相同的反转录反应质控物 (miRTC)。H1 和 H12 孔含有相同的 PCR 反应质控物 (PPC)。

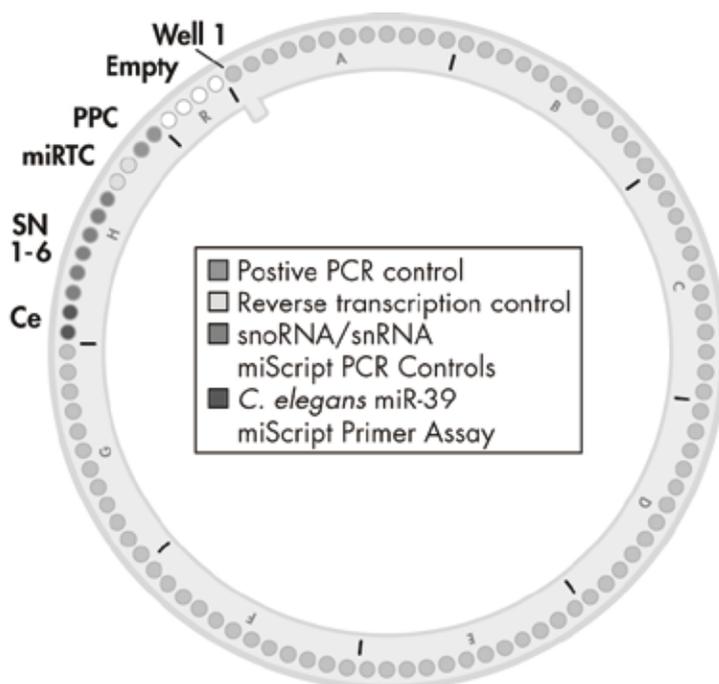


图 6. miScript miRNA PCR Array R 盘设计布局。孔 1 至 84 每一孔都包含一个与通路 / 疾病 / 功能相关的检测成熟 miRNA 的引物。孔 85 和 86 含有相同的检测 *C. elegans* miR-39 miScript 的引物，可用于数据的归一化 (**Ce**)。孔 87 至 92，每个孔都含有一个不同的检测 snoRNA/snRNA 的引物，也用于数据 (**Ce**) 的归一化 (**SN1**=SNORD61 检测物，**SN2**=SNORD68 检测物，**SN3**=SNORD72 检测物，**SN4**=SNORD95 检测物，**SN5**=SNORD96A 检测物，**SN6**=RNU6B/RNU6-2 检测物)。孔 93 和 94 含有相同的反转录反应质控物 (**miRTC**)。孔 95 和 96 孔含有相同的 PCR 反应质控物 (**PPC**)。第 97-100 孔为空孔。

miScript miRNA QC PCR Array 布局

miScript miRNA QC PCR Arrays 可用于实时 PCR 检测评估多种 cDNA 样品的质量。miScript miRNA QC PCR Arrays 有 384 孔盘、96 孔盘、Rotor-Disc 100 孔盘等格式 (图 7-9)。每个 miScript miRNA QC PCR Array 均有与 miScript miRNA PCR Array 相同的质控检测材料。关于每个质控反应的用途，请详见 21 页。96 孔盘和 Rotor-Disc 100 孔盘可同时检测 8 个 cDNA 样品。384 孔盘可同时检测 32 个 cDNA 样品。



C. elegans miScript snoRNA miRTC Positive
 miScript Primer Assays miScript PCR miScript PCR
 Primer Assay Controls Primer Assay control

图 7. miScript miRNA QC PCR Array A、C、D、F 盘设计布局。 每一行的第 1 和第 2 孔含有相同的检测 *C. elegans* miR-39 miScript 引物。第 3 至第 8 孔的每个孔都含有一个不同的检测 snoRNA/snRNA 的材料 (SN1=SNORD61 检测物、SN2=SNORD68 检测物、SN3=SNORD72 检测物、SN4=SNORD95 检测物、SN5=SNORD96A 检测物、SN6=RNU6B/RNU6-2 检测物)。第 9 和第 10 孔含有相同的反转录反应质控材料 (miRTC)。第 11 和第 12 孔含有相同的 PCR 反应质控材料 (PPC)。这些盘同时检测 8 个 cDNA 样品。

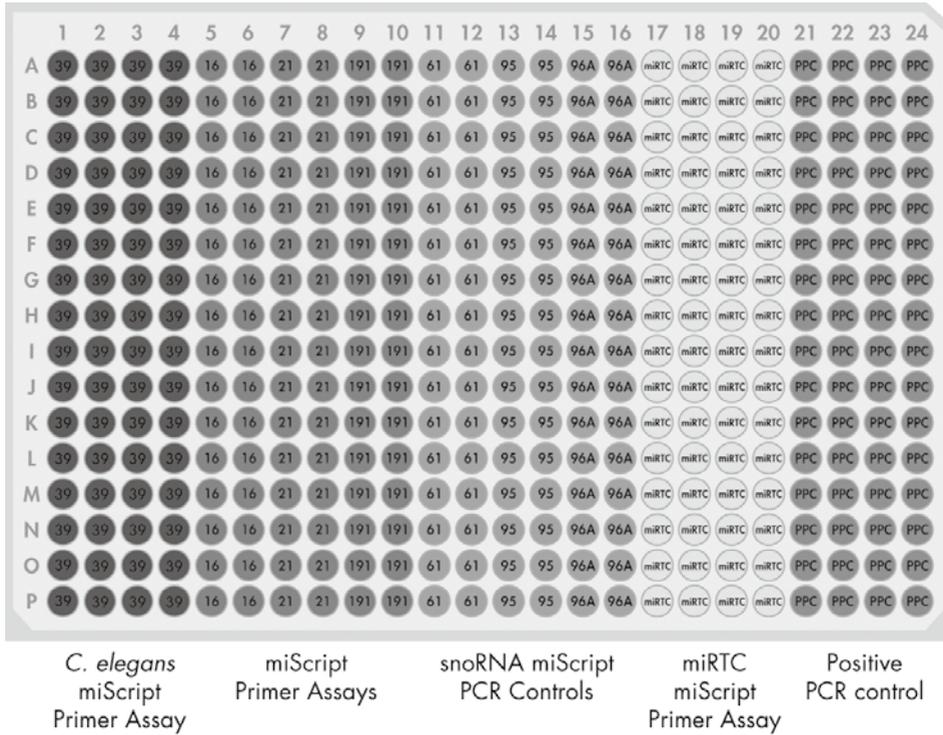


图 8. miScript miRNA QC PCR Array E 和 G 盘设计布局。 每一行的第 1 至第 4 孔含有相同的检测 *C. elegans* miR-39 miScript 引物 (Ce)。第 5 至 16 孔的每个孔都含有一个不同的检测 snoRNA/snRNA 的材料 (SN1=SNORD61 检测物、SN2=SNORD68 检测物、SN3=SNORD72 检测物、SN4=SNORD95 检测物、SN5=SNORD96A 检测物、SN6=RNU6B/RNU6-2 检测物)。第 17 至 20 孔含有相同的反转录反应质控材料 (miRTC)。第 21 至第 24 孔含有相同的 PCR 反应质控材料 (PPC)。这些盘可同时检测 32 个 cDNA 样品。

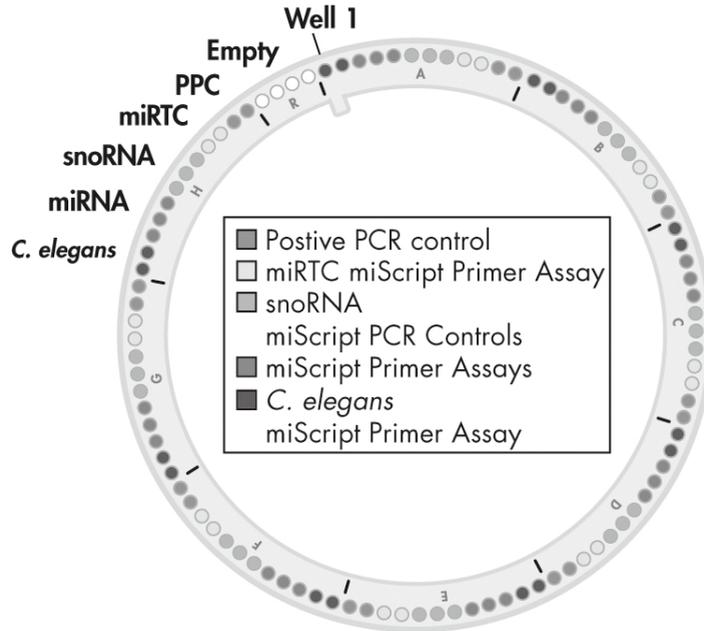


图 9. miScript miRNA QC PCR Array Rotor-Disc R 盘设计布局。 第 1 和第 2 孔含有相同的检测 *C. elegans* miR-39 miScript 引物 (Ce)。第 3 至第 8 孔的每个孔都含有一个不同的检测 snoRNA/snRNA 的材料 (SN1=SNORD61 检测物, SN2=SNORD68 检测物、SN3=SNORD72 检测物、SN4=SNORD95 检测物、SN5=SNORD96A 检测物、SN6=RNU6B/RNU6-2 检测物)。第 9 和 10 孔含有相同的反转录反应质控材料 (**miRTC**)。第 11 和 12 孔含有相同的 PCR 反应质控材料 (**PPC**)。这个布局重复七次, 分布在第 13 至 96 孔。第 97-100 孔为空孔。此盘可同时检测 8 个 cDNA 样品。

miScript miRNA PCR Arrays 和 miScript miRNA QC PCR Arrays 质控检测

每个盘的最后 12 个孔均含有 miRNA PCR Array 质控检测材料。这些质控检测材料的用途列于表 1。

表 1. 每一 miScript PCR Array 含有的质控检测物

质控检测	用途
检测 <i>C. elegans</i> miR-39 miScript 引物	使用外生 Syn-cel-miRNA-39 miScript miRNA Mimic 来归一化数据
3 个成熟 miRNA miRNA miScript 引物检测 (miR-16、miR-21、miR-191) *	无处不表达的成熟 miRNA
6 个 snoRNA/snRNA miScript 引物检测 (miScript PCR 质控) sNORD61 检测 sNORD95 检测 sNORD96A 检测 sNORD68 检测 [†] sNORD72 检测 [†] RNU6B/RNU6-2 检测 [†]	用于基于 $\Delta\Delta C_T$ 相对定量法的数据归一化
miRNA 反转录质控反应	监测反转录反应的好坏
阳性 PCR 质控反应	监测 PCR 反应的好坏

* 只有 miScript miRNA QC PCR Array 含有。

[†] 只有 Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array, miRNome miScript miRNA PCR Array, 和 miScript miRNA HC PCR Array 含有。

C. elegans miR-39 miScript Primer Assay 可作为 miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control (货号 219610) 的质控检测, 也称为 Syn-cel-miRNA-39 miScript miRNA Mimic (货号 MSY0000010)。此引物是 *C. elegans* miR-39 的类似物, 可加入血清或血浆等样品中, 用以检测总 RNA 的制备反应及后续反应中的变量。样品纯化后, 实时 PCR *C. elegans* miScript miRNA Mimic 的基因表达的数据可用于归一化 miRNA 的表达。关于如何使用 Syn-cel-miRNA-39 miScript miRNA Mimic, 请参阅 QIAGEN Supplementary Protocol: Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit。此信息可在 www.qiagen.com/miRNeasyMiniResources 网页上找到。

miScript miRNA QC PCR Array 含有检测 miR-16, miR-21, and miR-191 表达的引物。snoRNA/snRNA miScript PCR 质控材料的目标 miRNA 通常只在细胞、组织和全血样本中表达。与 snoRNA/snRNA miScript PCR 质控材料不同, 这些目标 miRNA 可广泛地在各种细胞、组织和体液样本中表达 (包括全血、血清和血浆)。此外, 这些成熟 miRNA 的序列在许多不同物种中具有保守性, 包括 miScript miRNA PCR Arrays 目前所支持的物种。这一优势使得 miR-16, miR-21, and miR-191 miScript 引物成为理想的评估样品质量的检测材料。

使用实时 PCR 定量检测 miRNA 时, 为确保结果的准确性与重现性, 需要有一个合适的内参 RNA 来归一化目标 miRNA 的量。这种方法称为相对定量法。归一化可修正那些可能会导致结果不准确的因素。这些因素包括起始 RNA 的量、RNA 降解或 RNA 样品中存在的抑制剂、或样品处理过程的差异等等。归一化也可直接比较从不同实验和不同样品的结果。miScript PCR 质控材料是一些特定设计的引物, 用以定量检测 5 个 snoRNA (SNORD61、SNORD68、SNORD72、SNORD95 和 SNORD96A) 以及 snRNA 的 RNU6B (RNU6-2) 的表达。设计这些引物时已考虑到人类、老鼠、鼠、狗的同源性, 因此可用于这四种物种。而且, 已证实这些小片段 RNA 在组织和细胞表达水平上相对稳定。因此, miScript PCR 质控材料可用于 miScript PCR 系统的相对定量质控归一化。所有质控材料的扩增效率都可达到 100%。如需更多的信息和数据, 请查阅 www.qiagen.com/miRNAControls 网页。

miRNA 的反转录质控材料 (miRTC) 用于检测评估反转录反应。它通过 miScript II RT Kit 来检测从试剂盒中 RNA 质控材料合成的模板, 可用于监测任何抑制反转录反应的变量。

PCR 阳性质控材料 (PPC) 含有一个 DNA 序列和检测这一序列的反应物。可用于检测任何引起抑制 PCR 反应的变量。

数据分析

QIAGEN 提供免费的数据分析软件。网址为 <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>。用户既可使用基于网络的软件, 也可使用基于 Excel® 模板的软件。这两个分析工具使用基于 $\Delta\Delta C_T$ 的相对定量法自动进行定量计算, 并对质控实验数据作以解释 (如需更多的信息, 请参阅第 35 页)。计算结果可用表格格式、散点图、三维剖面图、或火山图 (只能用于有重复实验的情况下) 等形式输出。

RNA 模板的要求

miScript miRNA PCR Arrays 的起始材料是含有 miRNA 的总 RNA，无需富集小分子 RNA。我们提供各种用于纯化 miRNA 的产品 (见表 2)。

表 2. 纯化含 miRNA 的总 RNA 的试剂盒

试剂盒	产品号	起始材料
miRNeasy Micro Kit	217084	少量细胞和组织
miRNeasy Mini Kit	217004	动物 / 人体组织、细胞和血清 / 血浆
miRNeasy 96 Kit	217061	动物 / 人体组织和细胞
miRNeasy Serum/Plasma Kit	217184	动物 / 人体血清 / 血浆
miRNeasy FFPE Kit	217504	福尔马林固定蜡封 (FFPE) 组织样本
PAXgene [®] Tissue miRNA Kit	766134	被固定和稳定在 PAXgene Tissue Containers 的动物 / 人体组织
PAXgene Blood miRNA Kit	763134	被稳定在 PAXgene Blood RNA Tube 的人体血液

用户自备设备和试剂

当使用化学品时，请切记身穿适当的实验工作服，戴好一次性手套和保护眼罩。如需更详细的信息，请向产品供应商咨询相关的材料安全数据书 (MSDSs)。

反转录反应

- 薄壁、无 DNase、无 RNase 的 PCR 管 (20 μ l 的反应)
- 冰
- 热循环加热器、加热块、或水浴 (能够达到 95°C)
- 离心机

定量实时 PCR

- 实时 PCR 仪，第 7 页的表中列有适于各个 PCR 盘的 PCR 仪
- 多通道加样器
- 无核酸酶的加样头和试管

实验步骤：定量反转录实时 PCR

实验前注意事项

- miScript II RT Kits 包括 2 个缓冲液：5x miScript HiSpec Buffer 和 5x miScript HiFlex Buffer。只有用 5x miScript HiSpec Buffer 制备的 cDNA 才可用于侧重于信号传导或 miRNome 基因组 miScript miRNA PCR Arrays 检测成熟 miRNA
- **重要注意事项：用于 miScript miRNA PCR Arrays 分析的 cDNA 只能用 miScript HiSpec Buffer 来制备**
- **重要注意事项：用于 miScript miRNA PCR Arrays 分析的 cDNA 不能用 miScript HiFlex Buffer 来制备**
- **重要注意事项：如果需要进行反转录反应，以用于 miScript PreAMP PCR Kit，请参阅 *miScript PreAMP Handbook***
- 起始原料应为含 miRNA 的总 RNA。关于如何纯化 RNA，请参阅第 24 页。该实验步骤适用于最多含有 2 微克的 RNA。如果使用较高的 RNA 量，应该线性扩大反应物。表 3 列有所建议的起始量。对于初次使用者，请阅读附录 B（第 52 页）
- 如果某份 RNA 样品中 miRNA 的含量富集（例如，使用 miRNeasy Mini Kit），使用所建议的总 RNA 用量的十分之一。例如，如果对于一个 Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array，如所建议的总 RNA 用量为 125–250 纳米克，应使用 12.5–25 纳米克这一富集 miRNA 样品
- 为避免 RNA 降解，所有的反应都需在冰上进行
- 不要振动 RNA 模板或 miScript II RT 的任何成分

表 3. 建议 RNA 起始的用量和反转录反应的缓冲液

PCR 应用	检测方法	缓冲液	建议 RNA 起始量 *
侧重于信号传导通路的成熟 miRNA 检测	Pathway-Focused	5x miScript	每一 RNA 样品含有
	miScript miRNA PCR	HiSpec	125–250 ng [†]
	Arrays	Buffer	
高含量、侧重于信号传导通路的成熟 miRNA 检测	miScript miRNA HC	5x miScript	每一 RNA 样品含有
	PCR Arrays	HiSpec	250–500 ng [†]
		Buffer	
全基因组 miRNome 成熟 miRNA 检测	miRNome miScript	5x miScript	每个 384 孔盘或每 4 个 96 孔盘
	miRNA PCR Arrays	HiSpec	/ 转子圆盘需含 RNA 250–250 ng
		Buffer	(miRNome miScript miRNA PCR Array 盘的数目随不同物种种类的不同而不同) [§]

* 如有足够量的 RNA 样品，使用建议的上限。

[†] 如果 RNA 是从 100–200 µl 血清或血浆中由 miRNeasy Serum/Plasma Kit 制备，每一 miScript miRNA PCR Array，建议使用 1.5 µl 的此 RNA（大约是最后洗脱液的十分之一）

[‡] 如果 RNA 是从 100–200 µl 血清中由 miRNeasy Serum/Plasma Kit 制备，每一 384 孔盘，或 4 个 96 孔盘，或 4 个转子圆盘，建议使用 1.5 µl 的此 RNA（大约是最后洗脱液的十分之一）

[§] 根据 RNA 的起始量不同，每一反转录反应可为 8 × 384 孔盘或 32 × 96 孔盘 / 转子圆盘提供足够的 cDNA 量。

实验步骤

1. 冰上溶化 RNA 模板。在室温溶化无 RNase 的水、10x miScript Nucleics Mix 和 5x miScript HiSpec Buffer (15–25°C)。

用手轻敲将溶液混匀，短暂离心将溶液沉集到试管底，放在冰上待用。

2. 根据表 4 在冰上准备反转录反应溶液。

轻轻将溶液混匀，放在冰上待用。除 RNA 模板外，反转录反应溶液含有合成 cDNA 第一链所需的所有成分。

注意: miScript Reverse Transcriptase Mix应在实验前从-20°C的冰箱中取出。轻轻混匀,放在冰上待用。用完后,应立即放回-20°C的冰箱中。

注意: 若需准备多个反应,所备反应溶液的体积应超出所需体积的10%。

表 4. 反转录反应成分

反应成分	每一反应的体积
5x miScript HiSpec Buffer	4 μ l
10x miScript Nucleics Mix	2 μ l
RNase-free water	可变
miScript Reverse Transcriptase Mix	2 μ l
Template RNA (用于第三步)	可变 (参考表 3) *
总体积	20 μl

* 如果 RNA 是从 100–200 μ l 血清或血浆 miRNeasy Serum/Plasma Kit 制备,反转录反应中可加入 9 μ l 此 RNA (足够 6 个 384 孔盘或 24 个 96 孔盘 / 转子圆盘)。

3. 将 RNA 模板加入含反转录反应溶液的试管中。轻轻混匀,短暂离心,然后放在冰上保存。

4. 在 37°C 反应 60 分钟。

5. 在 95°C 反应 5 分钟以抑制 miScript 反转录反应溶液的活性,然后放在冰上保存。

6. 根据表 5 用无 RNase 的纯净水稀释 cDNA, 立即进行实时 PCR 反应。

若不立即进行实时 PCR 反应,应将稀释后的反转录反应溶液放入 -20°C 冷冻箱中,或分装成几份,每份 110 μ l,放入 -20°C 冷冻箱中保存。

表 3. 建议 RNA 起始的用量和反转录反应的缓冲液

PCR 应用	检测方法	溶液稀释
分析侧重于信号传导通路	Pathway-Focused miScript miRNA PCR Arrays	在每一 20 μ l 的反转录反应中加入 200 μ l 无 RNase 纯净水
分析高含量、侧重于信号传导通路	miRNome miScript HC PCR Arrays	在每一 20 μ l 的反转录反应中加入 90 μ l 无 RNase 纯净水
分析全基因组 miRNome	miRNome miScript miRNA PCR Arrays	<p>根据所需 miRNome miScript miRNA PCR Array 盘的数目不同而稀释</p> <p>每一 384 孔盘或 4 个 96 孔盘 / 转子圆盘： 在 20 μl 的反转录反应液中加入 90 μl 无 RNase 纯净水</p> <p>每 2 个 384 孔盘或 8 个 96 孔盘 / 转子圆盘： 在 20 μl 的反转录反应液中加入 200 μl 无 RNase 纯净水</p> <p>每 3 个 384 孔盘或 12 个 96 孔盘 / 转子圆盘： 在 20 μl 的反转录反应液中加入 310 μl 无 RNase 纯净水</p> <p>每 4 个 384 孔盘或 16 个 96 孔盘 / 转子圆盘： 在 20 μl 的反转录反应液中加入 420 μl 无 RNase 纯净水</p>

实验操作步骤：用实时 PCR 分析成熟 miRNA 的表达谱

此实验操作步骤适于由 miScript II RT Kit 与 miScript HiSpec Buffer 制备的 cDNA 作为起始材料。该实验操作步骤介绍用 miScript miRNA PCR Arrays 和 miScript SYBR Green PCR Kit, 实时 PCR 分析成熟 miRNA 的表达。其中, miScript SYBR Green PCR Kit 包含 miScript Universal Primer (反转录引物) 和 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix。

实验前重要注意事项

- PCR 扩增的 **第一步必须始于在 95°C 保温 15 分钟** 以激活 HotStarTaq DNA 聚合酶 (包括 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix)
- **重要注意事项: 用于 miScript miRNA PCR Arrays 分析的 cDNA 只能用 miScript HiSpec Buffer 来制备**
- **重要注意事项: 用于 miScript miRNA PCR Arrays 分析的 cDNA 不能用 miScript HiFlex Buffer 来制备**
- 确保正确稀释 20 μ l cDNA 合成反应溶液。请参阅表 5。如果 cDNA 经过 miScript PreAMP PCR Kit 预扩增, 请参阅 *miScript PreAMP Handbook* 所建议的稀释方法
- 不能用涡旋式混和器震荡 cDNA 模板或 miScript SYBR Green PCR Kit 的成分
- 对于 384 孔盘, 每孔的标准反应体积是 10 μ l; 96 孔盘的每孔标准反应体积是 25 μ l; 100 孔转子圆盘的每孔标准反应体积是 20 μ l
- miScript SYBR Green PCR Kit (200) 提供的试剂量足够 4 个 96 孔盘 (110 μ l 剩余), 2 个 384 孔盘 (1210 μ l 剩余), 2 个 384 孔 HC 盘 /miRNome 盘 (1510 μ l 剩余), 或 5 个 100 孔转子圆盘 (110 μ l 剩余) 所需的试剂量。miScript SYBR Green PCR Kit (1000) 提供的试剂量足够 20 个 96 孔盘 (0 μ l 剩余), 12 个 384 孔盘 (1100 μ l 剩余), 13 个 384 孔 HC 盘 /miRNome 盘 (850 μ l 剩余), 或 25 个 100 孔转子圆盘 (0 μ l 剩余) 所需的试剂量
- 若使用 iCycler IQ, iQ5 或 MyiQ™ 实时 PCR 仪, 每个实验开始时必须先收集孔的参数。此参数用于校正系统或移液不均匀所导致的误差。详情信息, 请参阅仪器所提供的用户手册或在 www.qiagen.com 网页上参阅技术信息: Technical Information: Using QuantiTect SYBR Green Kits on Bio-Rad cyclers
- miScript miRNA QC PCR Array 可做为使用 miScript miRNA PCR Array 之前的 cDNA 样品的质量检测 (关于实验步骤, 参考 39 页)

实验步骤

1. 在室温 (15–25°C) 解冻 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10x miScript Universal Primer, cDNA 引物, 及无 RNase 的纯净水。混匀每一溶液。
2. 根据表 6 (侧重于信号传导通路的 miScript miRNA PCR Array) 或表 7 (基因组的 miScript miRNA PCR Array) 配制反应混合液。轻轻混匀。

由于 hot start 这一步, 在反应设置或实时 PCR 仪的参数设置时, 样品没有必要在冰上保存。

表 6. 配制侧重于信号传导通路的 miScript miRNA PCR Array 反应混合溶液

盘格式: 成分	384 孔盘 (4 个 96 孔盘) E、G 格式 *	96 孔盘 A、C、D、F 格式	100 孔转子圆盘 R 格式
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [†]	550 µl	1375 µl	1100 µl
10x miScript Universal Primer	110 µl	275 µl	220 µl
无 RNase 的纯净水	340 µl	1000 µl	780 µl
cDNA 模板 [‡]	100 µl	100 µl	100 µl
总体积	1100 µl	2750 µl	2200 µl

* 所示溶液体积量足够的一个 cDNA 模板。侧重于信号传导通路的 miScript miRNA PCR Array 384 孔盘提供 4 个相同的重复实验, 所以总共需求 4 个 cDNA 模板 (见第 16 页图 4)。

[†] 无需优化 Mg²⁺ 的浓度。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 提供最佳最终 Mg²⁺ 浓度。

[‡] 每孔需 0.5–1 ng cDNA。

表 3. 建议 RNA 起始的用量和反转录反应的缓冲液

盘格式： 成分	384 孔盘 E、G 格式	96 孔盘 A、C、D、F 格式	100 孔转子圆盘 R 格式
2x QuantiTect SYBR Green Master Mix [†]	2050 µl	1375 µl	1100 µl
10x miScript Universal Primer	410 µl	275 µl	220 µl
无 RNase 的纯净水	1540 µl	1000 µl	885 µl
cDNA 模板 [§]	100 µl	100 µl	25 µl
总体积	4100 µl	2750 µl	2200 µl

* 反应体积适于一个盘或转子圆盘。分析一套 miRNome 所需盘的数目取决于物种种类。根据所需盘的数目线性扩大所需溶液体积。若一套 miRNome 只需不到一半，相应减少所需溶液体积。

[†] 对 miScript miRNA HC PCR Arrays, 使用表中 384 孔盘的反应体积，见格式 E、G 反应体积。

[‡] 无需优化 Mg²⁺ 的浓度。2xQuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 提供最佳最终 Mg²⁺ 浓度。

[§] 每孔需 0.5–1 ng cDNA。

3. 小心从密封袋中取出 miScript miRNA PCR Array 盘。

96 孔盘和 384 孔盘可选项：如果反应溶液存放于试管中，转移到一个移液槽中，例如 RT2 PCR Array Loading reservoir (货号 338162)。

4. 按以下步骤将反应混合物加入 miScript miRNA PCR Array 盘。

注意：对于 96 孔盘和 384 孔盘，可用多孔道加样枪将反应混合物加入盘中。对于 100 转子圆盘，可使用重复性移液器或 QIAgility[®] 将反应混合物加入盘中。

384 孔 miScript miRNA PCR Array: 每孔加入 10 µl。

96 孔 miScript miRNA PCR Array: 每孔加入 25 µl。

100 孔 Rotor-Disc miScript miRNA PCR Array: 每孔加入 20 µl。

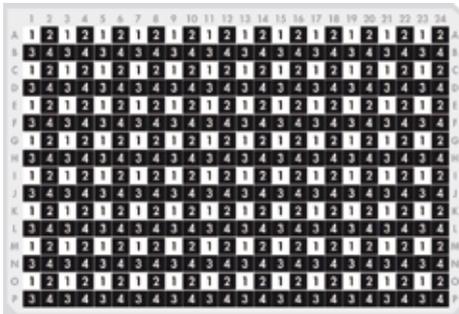
侧重于信号传导的 miScript miRNA PCR Array 384 孔盘 (4 个 96 孔盘) 加样

注意：每个侧重于信号传导的 miScript miRNA PCR Array 384 含有 4 套相同的 96 个反应，所以每盘可分析 4 个样品。每一样品所对应的 PCR 反应相隔一孔，因此，加每个样品时标准的多通道加样枪

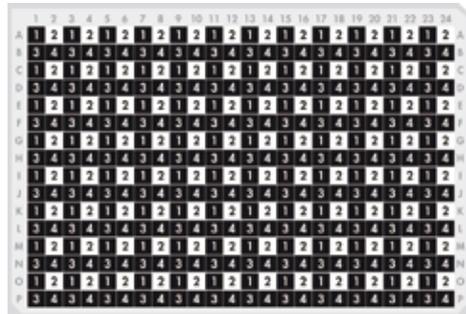
枪尖的间距正好隔一行或一列。请参照图 10，使用多通道加样枪和 384EZLoadCovers (提供)，确保加样正确。不要重复使用 384EZLoadCovers。

- 把 384EZLoad Cover 1 (白色) 放在 PCR 盘上。向露出的孔中 (A、C、E、G、I、K、M 和 O 行的奇数孔) 加入 10 μ l 样品 1 的 PCR 反应混合物。移开并弃置 384EZLoad Cover 1
- 把 384EZLoad Cover 2 (黄色) 放在 PCR 盘上。向露出的孔中 (A、C、E、G、I、K、M 和 O 行的偶数孔) 加入 10 μ l 样品 2 的 PCR 反应混合物。移开并弃置 384EZLoad Cover 2
- 把 384EZLoad Cover 3 (黑色) 放在 PCR 盘上。向露出的孔中 (B、D、F、H、J、L、N 和 P 行的奇数孔) 加入 10 μ l 样品 3 的 PCR 反应混合物。移开并弃置 384EZLoad Cover 3
- 把 384EZLoad Cover 4 (红色) 放在 PCR 盘上。向露出的孔中 (B、D、F、H、J、L、N 和 P 行的偶数孔) 加入 10 μ l 样品 4 的 PCR 反应混合物。移开并弃置 384EZLoad Cover 4

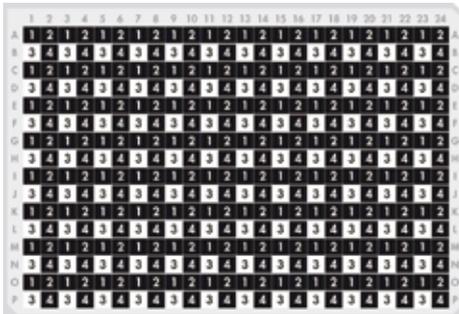
用于样品 1 的 Cover 1 (白色)



用于样品 2 的 Cover 2 (黄色)



用于样品 3 的 Cover 3 (黑色)



用于样品 4 的 Cover 4 (红色)

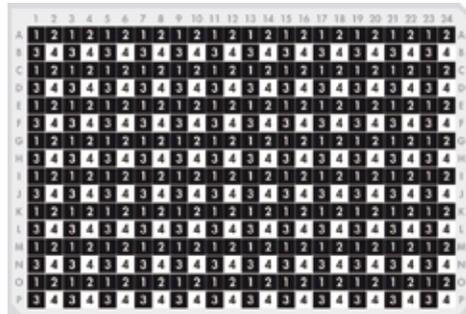


图 10. 在侧重于信号传导通路的 miScript miRNA PCR Arrays E 或 G 384 孔盘上加样。向图中交错显示的数字相同的孔中加入每个样品的 10 μ l PCR 反应混合物。

5. 小心用透光薄壁 8-Cap Strips (A 和 D 盘)、透光粘性密封膜 (C、E、F 和 G 盘) 或 Rotor-Disc 热封膜密封 miScript PCR Array。
6. 在室温 (15–25°C)，以 1000 g 的速度离心 1 分钟，去除气泡。
注意：Rotor-Disc 用户可忽略此步。
7. 按照表 8 设定 PCR 程序。
注意：分析解离 (融化) 曲线来验证 PCR 产物的特异性。实时 PCR 仪带有测定融化曲线的程序。请参阅仪器说明。

表 8. 实时 PCR 仪 的程序设计

步骤	时长	温度	注解
PCR 初始步骤	15 分钟	95°C	这一加热过程激活 HotStart DNA Taq Polymerase
3 步循环过程: *†‡			
变性过程	15 秒	94°C	
融合过程	30 秒	55°C	
延伸过程 §	30 秒	70°C	收集荧光数据
循环数	40 秒 ¶		循环数取决于 cDNA 模板量和目标基因的含量。

* 对于 Bio-Rad models CFX96 和 CFX384: 调整温度变化速度为 1°C/ 秒。

† 对于 Eppendorf Mastercycler ep realplex 型号 2, 2S, 4, and 4S: 对于 银热块, 调整温度变化速率至 26%; 对于铝热块, 调整温度变化速率至 35%。

‡ 对于 Roche LightCycler 480, 调整温度变化速率至 1°C/s。

§ 由于软件所需, 对于 ABI PRISM® 7000 orf Roche LightCycler 480, 调整温度变化速率至 1°C/s。

¶ Roche LightCycler 480 仪, 使用 45 个循环。

8. 将盘或 Rotor-Disc (转子圆盘) 放入 PCR 仪, 开始 PCR 程序。
9. 进行数据分析。

实验操作步骤：基于 $\Delta\Delta C_T$ 相对定量法分析 miScript miRNA PCR Arrays

此步骤介绍如何分析 miScript miRNA PCR Arrays 的数据。第一步由用户完成。此后的步骤由 QIAGEN 免费提供的数据分析软件来完成。此数据分析软件可在以下网页上找到 <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>。QIAGEN 提供基于网络的数据分析软件和基于 Excel 数据分析模板，都可在该网页上找到。这两种数据分析方法都使用 $\Delta\Delta C_T$ 相对定量法自动进行分析，并对质控参照数据做出解释。

分析数据前重要注意事项

- 以下标以 ■ 的表示用于 96 孔盘和 384 孔盘 (A, C, D, E, F 和 G 盘)；标以 ▲ 的表示用于 100 孔盘 (R 盘)。

分析步骤

由用户完成的步骤

1. 设置基线

基线是初始循环时的噪音水平，无荧光信号，也无 PCR 产物产生。

■ 使用线性视图查看扩增曲线来确定最早的可见扩增。基线可设在循环 2 至最早可见扩增的前 2 个循环。不要超过 15 个循环。用于计算基线的循环是可改变的，随着模板量的增大，循环数应减小。有关实时 PCR 数据输出的更多信息，请参阅附录 A，第 48 页。

▲ 对于 Rotor-Gene Q，我们建议使用“动态管”的设置，并使用“坡度校正”和 / 或“忽略第一”的设置。有关更多信息，请参阅 Rotor-Gene Q 的用户手册。

注意： 以确保进行实验结果的比较，所有 PCR 实验都应使用相同的基线设置。

2. 设置阈值

对数扩增曲线图的线性范围应很容易识别，因此使用对数扩增曲线图来设置阈值。在对数扩增曲线图中，应将阈值放置噪音水平之上，扩增曲线的线性范围内的下半部分之内。阈值不能设置在曲线的水平阶段。对于所有的 PCR 实验，使用统一的阈值相对于阈值的绝对值更为重要。

■ 针对 PCR 扩增仪的不同（如 Applied Biosystems models 7500 and ViiA 7, and Stratagene models Mx3005P and Mx3000P），为确保数据分析正确，默认“手动设置 C_T ”法设置的阈值 0.2，可能需要调整。用户可以 0.2 作为起点。

▲ 对于 Rotor-Gene Q，我们建议使用 0.2 作为阈值。

注意：以确保进行实验结果的比较，所有 PCR 实验都应使用相同的阈值。

3. 根据 PCR 扩增仪提供的手册，输出 C_T 值

4. 根据以下链接访问免费的数据分析软件。

www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php

用户可选择基于网络的数据分析软件和基于 Excel 的数据分析模板，根据说明来进行数据分析。

由数据分析软件来完成的步骤

5. ■ 将所有大于 35 或 N/A（无法检测）的 C_T 值调整为 35，▲ 将所有大于 35 或 N/A（无法检测）的 C_T 值调整为 33。

如此，任何 ■ 等于 35 的 C_T 值或 ▲ 等于 33 的 C_T 值将被视为阴性。

6. 按以下方法检查阳性 PCR 质控参照（PPC）的 C_T 值

如果 RNA 样品的质量很好，PCR 扩增仪的程序运行正确，阈值设置正确，所有 PCR 盘或样品的 C_T^{PPC} 的值都应为 ■ 19 ± 2 or ▲ 15 ± 2 。

7. 根据检查阳性 PCR 质控参照（PPC）的 C_T 值来，按以下方法计算反转录质控参照（miRTC）的 C_T 值：

$$\Delta C_T = \text{AVG } C_T^{\text{miRTC}} - \text{AVG } C_T^{\text{PPC}}$$

如果数值小于 7，说明反转录反应没有受到明显抑制。无需采取任何行动。如果数值大于 7，说明存在抑制反转录反应的不纯物。请参阅 46 页的“故障排除指南”。

注意：此 $\Delta C_T = \text{AVG } C_T^{\text{miRTC}} - \text{AVG } C_T^{\text{PPC}}$ 计算公式只适用于侧重于信号传导的 miScript miRNA PCR Arrays。对于 miRNA 基因组的 miRNome miScript miRNA PCR Arrays，由于 cDNA 分加于很多孔中，根据所用的盘的数目，计算时应引入一个校正因子。此因子可校正 miRNA 的稀释倍数。计算方法示于表 9。

表 9. 计算 miRNA PCR Arrays $\Delta C_T^{(miRTC-PPC)}$ miScript 的方法

盘 / 转子圆盘的数目			校正因子	$C_T^{(miRTC-PPC)}$ 的计算方法
384 孔	96 孔	100 孔		
1	4	4	1.1	$(AVG C_T^{miRTC} - 1.1) - (AVG C_T^{PPC})$
2	8	8	2.1	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.1) - (AVG C_T^{PPC})$
3	12	12	2.7	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.7) - (AVG C_T^{PPC})$
4	16	16	3.1	$(AVG C_T^{miRTC} - 3.1) - (AVG C_T^{PPC})$

* For miScript miRNA HC PCR Arrays, use the calculation shown for 1 x 384-well plate.

8. 根据以下公式计算成熟 miRNA 的 ΔC_T 值: $\Delta C_T = C_T^{miRNA} - AVG C_T^{SN1/2/3/4/5/6}$ 。

注意: 选择一合适的 snoRNA/snRNA 参照来归一化数据。每盘含有 6 个 snoRNA/snRNA 参照反应物 (SN1-6)。确保所选择的参照不受反应条件的影响。如果一个或多个参照 snoRNA/snRNA 已经实验验证, 可使用所有参照 snoRNA/snRNA 的平均 C_T 值。当有多重测定样本和 / 或多重复测定时, 每一样品的 ΔC_T 值可根据所有重复实验的 snoRNA/snRNA 的平均 C_T 值来计算。

9. 根据以下公式计算两组 miScript miRNA PCR Arrays 或两组样品, $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{组 2}) - \Delta C_T(\text{组 1})$, 其中组 1 是参照组, 组 2 是实验组。

10. 根据 $2^{(\Delta\Delta CT)}$ 计算每个基因从组 1 到组 2 的表达水平的变化倍数。

可选项：如果倍数变化大于 1，结果为上调几倍。如果倍数变化小于 1，结果则为下降几倍。

11. 数据分析软件可将倍数变化以几种不同的方式输出，包括图表格式，散点图，三维图和火山图（当实验数据含有几个重复实验时）。

实验操作步骤：分析成熟 miRNA 数据前的 cDNA 的质量控制

miScript miRNA QC PCR 可用来检测由 miScript HiSpec Buffer 制备的 cDNA 的质量，以节省时间和试剂。用 miScript miRNA QC PCR 检测 miRNA 的质量，只需要 5 μ l 稀释的 cDNA 样品。此实验步骤适用于由 miScript HiSpec Buffer 制备的 cDNA，用于 miRNA 表达分析的实验之前 cDNA 样品的质量检测。使用 miScript SYBR Green PCR Kit and miScript miRNA QC PCR Array，可检测多个 cDNA 样品的质量。一个 384 孔的 miScript miRNA QC PCR Array 可同时分析 32 个 cDNA 样品。一个 96 孔的 miScript miRNA QC PCR Array 可同时分析 8 个 cDNA 样品。一个 100 孔 Rotor-Disc miScript miRNA QC PCR Array 可同时分析 8 个 cDNA 样品。

如果 cDNA 经过 miScript PreAMP PCR Kit 和 miScript PreAMP Primer Mix 预扩增，请参阅有关特定预扩增、质量控制的说明，见 *miScript PreAMP Handbook*。

分析数据前重要注意事项

- PCR 反应**必须起始于在 95°C 保温 15 分钟**，以激活 HotStarTaq DNA Polymerase (包含 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix)。
- 只有由 miScript HiSpec Buffer 制备的 cDNA 模板才可用于此实验方法。
- cDNA 样品必须是按照 26 页的方法制备的，而且 20 μ l 的 cDNA 样品也是按照 29 页的表 5 正确稀释。
- 不能用涡旋式混和器震动 cDNA 样品或 miScript SYBR Green PCR Kit 的成分。
- 384 孔盘每孔的标准反应体积是 10 μ l；96 孔盘的每孔标准反应体积是 25 μ l；Rotor-Disc 100 孔盘的每孔标准反应体积是 20 μ l。
- 若使用 iCycler IQ, iQ5 或 MyiQ™ 实时 PCR 仪，每一实验开始时必须先收集孔的参数。此参数用于校正系统或移液不均匀所导致的误差。详情信息，请参阅仪器所提供的用户手册或在 www.qiagen.com 网页上参阅技术信息：*Technical Information: Using QuantiTect SYBR Green Kits on Bio-Rad cyclers*。

实验步骤

1. 在室温 (15–25°C) 解冻 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 10x miScript Universal Primer, cDNA 模板, 及无 RNase 的纯净水。混匀每一溶液。

2. 根据表 10 配制反应混合液。轻轻混匀。

由于 hot start 这一步, 在反应设置或实时 PCR 仪的参数设置时, 样品没有必要在冰上保存。

表 10. miScript miRNA QC PCR Array 反应混合溶液的配制 *

Array 格式: 成分	384 孔盘 E、G 格式 [†]	96 孔盘 A、C、D、F 格式 [†]	100 孔转子圆盘 R 格式 [†]
2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix [‡]	75 µl	175 µl	150 µl
10x miScript Universal Primer	15 µl	35 µl	30 µl
无 RNase 的纯净水	55 µl	135 µl	115 µl
cDNA 模板	5 µl	5 µl	5 µl
总体积	150 µl	350 µl	300 µl

* 384 孔盘的每孔反应体积为 10 µl, 96 孔盘的每孔反应体积为 25 µl, 100 孔转子圆盘的每孔反应体积为 20 µl。

[†] 所示溶液体积的量足够的一个 cDNA 模板。一个 96 孔 miScript miRNA QC PCR Array 可同时分析 8 个 cDNA 样品。一个 100 孔 Rotor-Disc miScript miRNA QC PCR Array 可同时分析 8 个 cDNA 样品, 一个 384 孔的 miScript miRNA QC PCR Array 可同时分析 32 个 cDNA 样品。

[‡] 无需优化 Mg²⁺ 的浓度。2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 提供最佳的最终 Mg²⁺ 浓度。

3. 小心从密封袋中取出 miScript miRNA QC PCR Array 盘。

4. 按以下步骤将反应混合物加入 miScript miRNA QC PCR Array 盘。

384 孔 miScript miRNA QC PCR Array: 每孔加入 10 µl。

96 孔 miScript miRNA QC PCR Array: 每孔加入 25 µl。

100 孔 Rotor-Disc miScript miRNA QC PCR Array: 每孔加入 20 µl。

5. 心用透光薄壁 8-Cap Strips (A 和 D 盘)、透光粘性密封膜 (C、E、F 和 G 盘) 或 Rotor-Disc 热封膜 (R 盘) 密封 miScript miRNA QC PCR Array。
6. 在室温 (15–25°C)，以 1000 g 的速度离心 1 分钟，去除气泡。
注意：Rotor-Disc 用户可忽略此步。
7. 按照表 11 设定 PCR 程序。
注意：分析解离 (融化) 曲线来验证 PCR 产物的特异性。实时 PCR 仪带有测定融化曲线的程序。请参阅仪器说明。

表 11. 实时 PCR 仪 的程序设计

步骤	时长	温度	注解
PCR 初始步骤	15 分钟	95°C	这一加热过程激活 HotStart DNA Taq Polymerase
3 步循环过程: *†‡			
变性过程	15 秒	94°C	
融合过程	30 秒	55°C	
延伸过程 §	30 秒	70°C	收集荧光数据
循环数	40 秒 ¶		循环数取决于 cDNA 模板量和目标基因的含量。

* 对于 Bio-Rad models CFX96 和 CFX384: 调整温度变化速度为 1°C/秒。

† 对于 Eppendorf Mastercycler ep realplex 型号 2, 2S, 4, and 4S: 对于 银热块, 调整温度变化速率至 26%; 对于 铝热块, 调整温度变化速率至 35%。

‡ 对于 Roche LightCycler 480, 调整温度变化速率至 1°C/s。

§ 根据软件, 对于 ABI PRISM® 7000 orf Roche LightCycler 480, 调整温度变化速率至 1°C/s。

¶ Roche LightCycler 480 仪, 使用 45 个循环。

8. 将盘或 Rotor-Disc (转子盘) 放入 PCR 仪, 开始 PCR 程序。
9. 进行数据分析。

实验操作步骤：miScript miRNA QC PCR Arrays 的质控分析

此步骤介绍进行 miScript miRNA QC PCR Arrays 的数据分析。第一步由用户完成。此后的步骤由 QIAGEN 免费提供的数据分析软件来完成。此分析软件可在以下网页上找到 <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>。QIAGEN 提供基于网络的数据分析软件和基于 Excel 的数据分析模板。二者都可在该网页上找到。这两种数据分析方法都使用 $\Delta\Delta C_T$ 相对定量法自动进行分析，并对质控参照数据做出解释。

如果 cDNA 经过 miScript PreAMP PCR Kit 和 miScript PreAMP Primer Mix 预扩增，请参阅有关的数据分析说明，见 *miScript PreAMP Handbook*。

分析数据前重要注意事项

- 以下标以 ■ 的表示用于 96 孔盘和 384 孔盘 (A, C, D, E, F 和 G 盘)；标以 ▲ 的表示用于 100 孔盘 (R 盘)。

分析步骤

由用户完成的步骤

1. 设置基线

基线是初始循环时的噪音水平，无荧光信号，也无 PCR 产物产生。

■ 使用线性视图查看扩增曲线来确定最早的可见扩增。基线可设在循环 2 至最早可见扩增的前 2 个循环。不要超过 15 个循环。用于计算基线的循环是可改变的，随着模板量的增大，循环数应减小。有关实时 PCR 数据输出的更多信息，请参阅附录 A，第 49 页。

▲ 对于 Rotor-Gene Q，我们建议使用“动态管”的设置，并使用“坡度校正”和 / 或“忽略第一”的设置。有关更多信息，请参阅 Rotor-Gene Q 的用户手册。

注意：为了比较实验结果，所有 PCR 实验都应使用相同的基线设置。

2. 设置阈值

对数扩增曲线图的线性范围应很容易识别，因此使用对数扩增曲线图来设置阈值。在对数扩增曲线图中，应将阈值放置噪音水平之上，扩增曲线的线性范围内的下半部分之内。阈值不能设置在曲线的水平阶段。对于所有的 PCR 实验，使用统一的阈值相对于阈值的绝对值更为重要。

■ 随 PCR 扩增仪的不同 (如 Applied Biosystems models 7500 and ViiA 7, and Stratagene models Mx3005P and Mx3000P), 为确保数据分析正确, 默认“手动设置 C_T ”法的设置的阈值 0.2, 可能需要调整。用户可以 0.2 作为起始阈值。

▲ 对于 Rotor-Gene Q, 我们建议使用 0.2 作为阈值。

注意: 以确保进行实验结果的比较, 所有 PCR 实验都应使用相同的阈值。

3. 根据 PCR 扩增仪提供的手册, 输出 C_T 值

4. 根据以下链接访问免费的数据分析软件。

www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php

用户可选择基于网络的数据分析软件和基于 Excel 的数据分析模板, 根据说明来进行数据分析。

由数据分析软件来完成的步骤

5. ■ 将所有大于 35 或 N/A (无法检测) 的 C_T 值调整为 35; ▲ 将所有大于 35 或 N/A (无法检测) 的 C_T 值调整为 33。

如此, 任何 ■ 等于 35 的 C_T 值或 ▲ 等于 33 的 C_T 值将被视为阴性。

6. 按以下方法检查阳性 PCR 质控参照 (PPC) 的 C_T 值

如果 RNA 样品的质量很好, PCR 扩增仪的程序运行正确, 阈值设置正确, 所有 PCR 盘或样品的 C_T^{PPC} 的值都应为 ■ 19 ± 2 or ▲ 15 ± 2 。

7. 检查阳性 PCR 质控参照 (PPC) 的 C_T 值, 按以下方法计算反转录质控参照 (miRTC) 的 C_T 值: $\Delta C_T = \text{AVG } C_T^{\text{miRTC}} - \text{AVG } C_T^{\text{PPC}} - \text{校正因子}$

如果数值小于 7, 说明反转录反应没有受到明显抑制。无需采取任何行动。如果数值大于 7, 说明存在抑制反转录反应的不纯物。请参阅 46 页的“故障排除指南”。

注意: 此 $\Delta C_T = \text{AVG } C_T^{\text{miRTC}} - \text{AVG } C_T^{\text{PPC}}$ 计算公式只适用于侧重于信号传导的 miScript miRNA PCR Arrays。对于 miRNA 基因组的 miRNome miScript miRNA PCR Arrays, 由于 cDNA 分加于很多孔中, 根据所用的盘的数目, 计算时应引入一个校正因子。此因子可校正 miRNA 的稀释倍数。计算方法示于表 12。

表 12. miScript miRNA QC PCR Arrays 的计算 $\Delta C_T^{(miRTC-PPC)}$ 方法

cDNA 的用途	校正因子	AVG $C_T^{(miRTC-PPC)}$ 的计算方法
侧重于信号传导通路的 miScript miRNA PCR Arrays	1.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 1.5) - (AVG C_T^{PPC})$
侧重于信号传导通路的 miScript miRNA HC PCR Arrays	0.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 0.5) - (AVG C_T^{PPC})$
全基因组: 1 个 384 孔盘或 4 个 96 孔盘 / 转子圆盘	0.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 0.5) - (AVG C_T^{PPC})$
全基因组: 2 个 384 孔盘或 8 个 96 孔盘 / 转子圆盘	1.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 1.5) - (AVG C_T^{PPC})$
全基因组: 3 个 384 孔盘或 12 个 96 孔盘 / 转子圆盘	2.0	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.0) - (AVG C_T^{PPC})$
全基因组: 4 个 384 孔盘或 16 个 96 孔盘 / 转子圆盘	2.5	$(AVG C_T^{miRTC} - 2.5) - (AVG C_T^{PPC})$

8. 检查 miR-16、miR-21 和 miR-191 质控反应的 C_T 值

注意: miR-16, miR-21, and miR-191 可广泛地在各种细胞、组织和体液样本中表达 (包括全血、血清和血浆)。

9. 检查 SNORD61、SNORD95 和 SNORD96A 质控反应的 C_T 值

注意: 经验证, 这些小片段 RNAs 在不同样本和细胞中的表达相对稳定。但是, snoRNA/snRNA 质控反应物的 C_T 值仍然与样本有关, 因此, 它们在不同样本中的 ΔC_T 值应需检测。如果某一质控反应物的表达随实验条件的不同而不同, 该质控反应物不能用于数据的归一化。有关这些质控反应物在不同样本中的 C_T 值, 请参阅 miScript PCR Controls 的应用数据, 见网页 www.qiagen.com/miRNAControls。

10. 检查线虫 (*C. elegans*) 的 miR-39 miScript Primer Assay 的 C_T 值 (C_e)

如果在纯化 RNA 之前，样品中加入了 Syn-cel-miR-39 miScript miRNA Mimic，线虫的 miR-39 的 C_T 值应在阈值以上。有关更多信息，请参阅 QIAGEN 的 Supplementary Protocol: Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit，见网页 www.qiagen.com/miRNeasyMiniResources。

11. 如果上述条件均已达到，cDNA 的质量足够用于 miScript miRNA PCR Array 的实验。

故障排除指南

此故障排除指南也许能解决可能出现的任何问题。有关更多信息，可浏览我们的技术支持中心网页的常见问题解答：www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx。QIAGEN 技术支持部门的研究人员愿意为您解答关于这份手册的相关信息、实验方法、样品及检测技术的任何问题（联系方式请见封底或浏览：www.qiagen.com）。

注解和建议

反转录反应效率低（ $AVG C_T^{miRTC} - AVG C_T^{PPC}$ 的值大于 7）

- | | |
|----------------|--|
| a) RNA 质量差 | 测定 RNA 样品的 $A_{260}:A_{280}$ 和 $A_{260}:A_{230}$ 的比值。切记要用无 RNase、10mM Tris-Cl, pH 7.5 稀释样品，来进行分光光度计检测。如有必要，用如 RNeasy Mini Kit 一类的离心柱来重新纯化 RNA。 |
| b) 计算中没有引入校正因子 | 若使用全基因组 miRNome miScript miRNA PCR Arrays、miRNA HC PCR Arrays 或 miScript miRNA QC PCR Arrays，确保按 37 页的表 9 或 44 页的表 12 所示的校正因子来计算 |

PCR 扩增效率低（不同盘的 $AVG C_T^{PPC}$ 的值大于 7 变化大于 2，和 / 或 96 孔盘、384 孔盘的 $AVG C_T^{PPC}$ 大于 21，100 孔 Rotro-Discs 的 $AVG C_T^{PPC}$ 大于 17）

- | | |
|----------------------------|---|
| a) 实时 PCR 仪的灵敏度 | 实时 PCR 仪的灵敏度各有不同。对于 96 孔盘和 384 孔盘，如果 PCR 阳性对照 (PPC) 的平均 C_T^{PPC} 难于达到 19 ± 2 ，或 100 孔转子圆盘的平均 C_T^{PPC} 难于达到 15 ± 2 ，只要不同盘间的平均 C_T^{PPC} 值的上下波动不超过 2 个循环，也可接受 |
| b) HotStarTaq DNA 聚合酶没有被激活 | 确保第一步必须始于在 95°C 保温 15 分钟，其它循环参数都根据实验步骤设置正 |

注解和建议

- c) RNA 质量差，可能含有抑制 PCR 的不纯物 测定 RNA 样品的 $A_{260}:A_{280}$ 和 $A_{260}:A_{230}$ 的比值。切记要用无 RNase、10 mM Tris-Cl, pH 7.5 来稀释样品进行分光光度计检测。如有必要，选用如 RNeasy Mini Kit 一类的离心柱法来重新纯化 RNA。

无产物或产物只能在实时 PCR 反应的最后才能检测到 (表明问题出在反转录反应这一步)

- a) 在设置反转录反应时加样出错或没有加入试剂 检查实验使用的加样枪的设置。试剂溶化后，混合均匀，重复反转录反应
- b) 反转录反应设置错误 确保在冰上设置反应
- c) 反转录反应的 RNA 质量差，或加入 RNA 模板的量不对 检查 RNA 模板的浓度，完整性，纯度。RNA 模板融化后，混合均匀。即使很少量的 RNases 也可能 cDNA 的合成和 RT-PCR 的灵敏度，尤其当 RNA 的量很少时。
- d) RNA 的浓度过高或过低 参考 27 页表 3 所建议的 RNA 的用量
- e) RNA 变性 没有必要将 RNA 变性。如果 RNA 变性了，RNA 的完整性可能会受到影响
- f) 保温时的温度过高 反转录反应应在 37°C 进行。温度过高会减短 cDNA 产物的长度，或抑制 miScript Reverse Transcriptase Mix 的活性。检查加热块或热水浴的温度。

注解和建议

无产物或产物只能在实时 PCR 反应的最后才能检测到，或只能检测到引物二聚体（表明问题出在实时 PCR 反应这一步）

- | | |
|----------------------------|---|
| a) PCR 退火时间过短 | 使用实验步骤中所指定的退火时间 |
| b) PCR 扩张时间过短 | 使用实验步骤中所指定的扩张时间 |
| c) 在设置 PCR 反应时加样出错或少加试剂 | 检查引物和 cDNA 的浓度和保存条件 |
| d) HotStarTaq DNA 聚合酶没有被激活 | 确保激活 HotStarTaq DNA 聚合酶的设置正确；有关详细信息，请参考实验步骤 |
| e) 荧光测试没有激活 | 检查循环程序中荧光测试设置，确保荧光器被激活 |
| f) 测试步骤设置错误 | 确保在 PCR 循环程序的扩张步骤中测试荧光产物 |
| g) 染料层 / 过滤器设置错误 | 确保染料层 / 过滤器正确激活 |
| h) 起始模板的量不足 | 增加起始 cDNA 模板的量 |

C_T 值与模板量指数值的比例不是线性关系

- | | |
|-----------|-------------------------------------|
| a) 模板的量过多 | cDNA 模板的量不要超过所建议的最大量。有关详细信息，请参考实验步骤 |
| b) 模板的量过少 | 增加 RNA 模板的量 |

荧光强度不稳定

- | | |
|-----------------|----------------------|
| a) 实时 PCR 仪被污染了 | 根据仪器说明书校正去除 PCR 仪的污染 |
| b) 实时 PCR 仪没经校正 | 根据仪器说明书校正 PCR 仪 |

附录 A：实时 PCR 的数据输出和融解曲线的分析

在一个典型实时 PCR 反应的扩增图中，荧光信号与周期数的关系成 S 形（使用线性刻度时）。阈值循环数（ C_T ）用来计算每一样品的起始模板量。 C_T 值是首次检测到荧光信号增加时的周期数。因此，根据所用实时 PCR 扩增仪的不同，如何确定 C_T 值有可能有所不同。

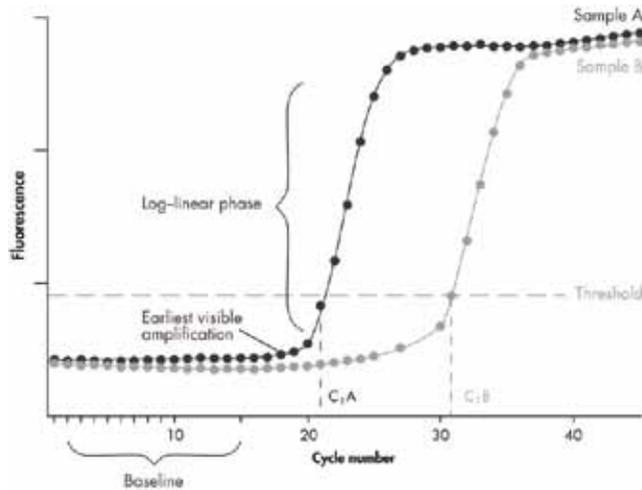


图 11. 扩增曲线。扩增曲线显示 2 个样品的荧光增加（A 和 B）。样品 A 含有的起始模板量比样品 B 多。

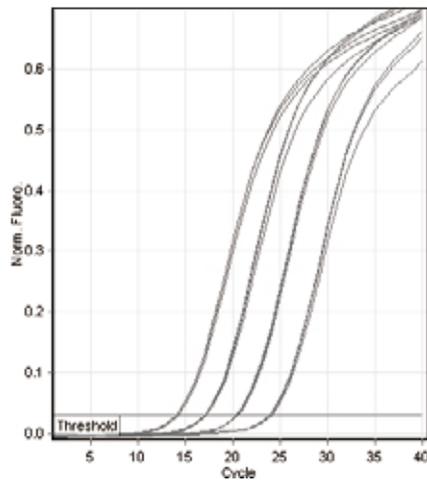


图 12. 典型的扩增曲线。不同量 miR-21 的扩增曲线。此图所示是 Rotor-Gene Q 扩增仪的测试结果。

熔解曲线分析

分析 PCR 产物的熔解曲线可用来验证产物的特异性和准确性。实时 PCR 仪的软件带有此功能。请参考供应商提供的说明书。

进行熔解曲线分析,将温度非常缓慢地从低(如 65°C)升高(如 95°C)。在低温条件下,PCR 产物为双链,与 SYBR Green I 染料结合,因此荧光信号很高。在高温下,PCR 产物变性,荧光信号快速下降。

随温度的增加,连续测量荧光信号,将荧光值与温度的关系绘制成图。因为在低温区,荧光信号下降较慢,而在高温,非特异与特异性 PCR 产物达到分解温度,荧光信号下降很快,因此将产生一条曲线。检测系统计算该曲线的一级倒数,在每一相应 PCR 产物的分解温度 T_m 处将产生一个峰(图 13 和 14)。低于特定 PCR 产物 T_m 的曲线表明引物形成二聚体,如有不同 T_m 峰或高原峰,表明含有非特异性产品或杂质。

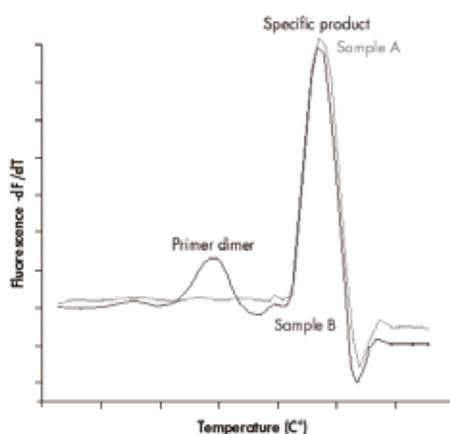


图 13. 熔解曲线分析。2 个样品的解离曲线分析 (A 和 B)。样品只有 1 个峰,表明扩增产物具有特异性(无引物二聚体扩增产物)。样品 B 有两个峰,一个峰来自于专一产物,温度较低的峰来自于引物二聚体的扩增产物。

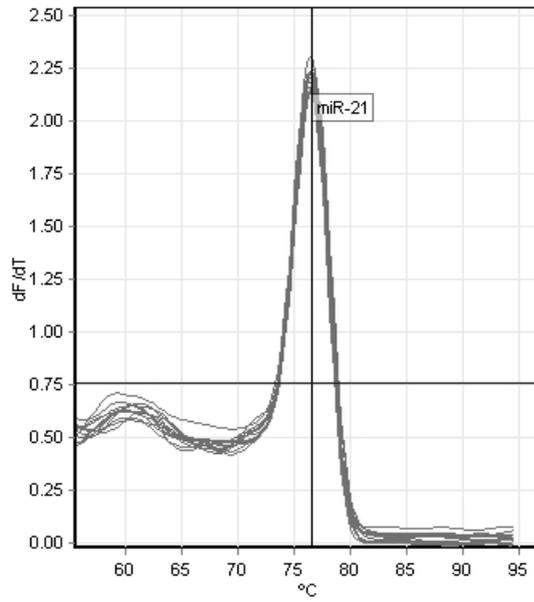


图 14. miRNA 的熔解曲线。miR-21 的熔解曲线只有一个单峰，表明扩增产物具有特异性。此 miRNA 的熔解曲线是用 Rotor-Gene Q 扩增仪检测的。

附录 B：操作处理 RNA 的一般说明

操作 RNA

核糖核酸酶 (RNases) 的稳定性很高, 属于不需要辅助因子、活性很高的一类酶。RNases 的活性很难被抑制, 即使很少量的酶就足以降解 RNA, 因此千万不要使用没有经过去除 RNase 污染的塑料或玻璃器皿。无论在操作纯化前或纯化后的 RNA 样品过程中, 都要特别小心不要引入 RNases。为制造或维持一个无 RNase 的工作环境, 在预处理或使用一次性或非一次性的器皿和溶液时, 都必须遵从以下规则。

一般注意事项

操作 RNA 样品时, 切记使用适当的无菌微生物技术。最常见的 RNase 的污染来自于手和尘埃粒子携带的细菌和霉菌。在处理试剂和 RNA 样品时, 切记戴上乳胶或乙烯基手套以防止由皮肤表面或从尘土飞扬的实验室设备引起的 RNase 污染。勤换手套并尽可能地保持试管口封闭。将纯化的 RNA 放置冰上, 进行样品分装。

建议使用 5 PRIME (www.5prime.com) 生产的 RNaseKiller (货号 2500080) 来去除实验台、非一次性塑料器皿和实验室设备 (如移液管和电泳槽等) 的 RNase 污染。也可以使用一般性实验室试剂来去除 RNase 污染。若要去除塑料器皿的污染, 可先使用 0.1 M NaOH, 1 mM EDTA* 来清洗, 然后再用无 RNase 的纯净水来清洗。若塑料器皿具有耐氯仿性, 最后一步可用氯仿* 来清洗。若要去除电泳池的污染, 可先使用清洁剂 (例如, 0.5% 的 SDS) 清洗, 然后再用无 RNase 的纯净水来清洗, 再用乙醇冲洗 (如果电泳池耐乙醇) 最后晾干。

一次性塑料器皿

建议在整个实验操作过程中使用无菌的, 一次性的塑料试管。这些试管一般都不含 RNase, 不需要进行灭活 RNase 的预处理。

* 操作化学品, 切记总是要穿上合适的白大褂, 戴一次性手套和护目镜。有关更多信息, 请咨询产品供应商提供的相应的材料数据表 (MSDS)。

玻璃器皿

玻璃器皿在使用前应经过处理，以确保不含 RNase。用于操作 RNA 样品的玻璃器皿，在使用前应用洗涤剂清洗*，彻底冲洗，在 240°C 的烤箱烘烤 4 小时或更长时间（为方便起见，可过夜）。若只使用高压灭菌法，许多核糖核酸酶可能不能完全被灭活。玻璃器皿也可用 DEPC（焦碳酸二乙酯）来处理，见下面的“解决方案”。

解决方案

注意：QIAGEN 所提供的溶液，如 miScript Nucleics Mix、miScript HiFlex Buffer、miScript HiSpec Buffer 和 RNase-free water 确保不含 RNase，而且没有经过 DEPC 处理，因此无任何 DEPC 污染。

溶液（水和其它溶液）都应经过 0.1% DEPC 的处理。DEPC 是很有效的抑制核糖核酸酶的抑制剂，但并不是绝对的。0.1% 浓度的 DEPC 通常用来灭活玻璃或塑料器皿上的核糖核酸酶，或配置无 RNase 的溶液和水。DEPC 通过与核糖核酸酶形成共价键，来抑制其活性。将 0.1 毫升到 100 毫升的 DEPC 加入所要处理的溶液中，剧烈震荡以充分溶解。然后在 37°C 保温 12 小时，再高压灭菌 15 分钟，以消除残留的 DEPC。DEPC 与伯胺反应，因此不能直接用于处理 Tris* 缓冲液。DEPC 在 Tris 缓冲液中非常不稳定，能迅速分解成乙醇和二氧化碳。当制备 Tris 缓冲液时，先用 DEPC 处理水，然后再溶解 Tris 配制适当的缓冲溶液。即使微量的 DEPC 也能将 RNA 中的嘌呤乙氧基化。乙氧基化的 RNA 在无细胞系统中被翻译的效率非常低。但是，除非大量的嘌呤已被修改，其形成 DNA:RNA 或 RNA:RNA 杂交的能力并不受到严重影响。残留的 DEPC 必须经过高压灭菌或在 100°C 加热 15 分钟以从溶液中去除。

附录 C：制备、定量与储存 RNA

RNA 的制备及质量

由于 PCR 反应含有多个循环反应，因此，与比单步酶催化反应相比，它对如蛋白质、酚 / 氯仿、盐、EDTA 等不纯物更为敏感。污染物可干扰荧光信号的检测，因此，核酸模板的纯度在实时 PCR 反应中尤其重要。请参见 24 页表 2 所示的纯化总 RNA 的试剂盒，包括纯化 miRNA 的试剂盒。有关更多的纯化 miRNA 详细信息，请访问 www.qiagen.com/miRNA。

测定 RNA 的浓度和纯度

RNA 的浓度应通过分光光度计测量在 260 nm (A_{260}) 的吸收。由于吸光度和浓度之间的关系 (A_{260} 时值为 $1=40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNA) 由在水中测定的消光系数计算，因此，样品应用水来稀释。为确保测量有效，读数应在 0.15 到 1.0 之间。

注意，吸光度不能区分 DNA 和 RNA。根据制备 RNA 方法不同，RNA 可能被 DNA 污染，这会导致所测得的 A_{260} 值偏高。

吸光度在 260 nm 和 280 nm 的比值可用来估计 RNA 的纯度。要测定 RNA 的纯度，我们建议在 10 mM Tris•Cl, pH 7.5.* 缓冲液中测定吸光度在 260 nm/280 nm 的比值和 260 nm/230 nm 的比值。纯度高的 RNA 样品， A_{260}/A_{280} 的比值应为 1.9–2.1， A_{260}/A_{230} 的比值应为 2.0–2.2[†]。比值低表明存在如蛋白质一类的污染物。

RNA 的保存

纯化的 RNA 应保存在 -20°C 或 -70°C 无 RNase 的水中。若 RNA 是由 QIAGEN 系统纯化的，如此保存，RNA 至少 1 年内不会降解。稀释的 RNA (例如，标准测定使用的稀释系列) 应分装存放，只能解冻一次。我们建议尽可能地使用经过硅化的试管分装、储存 RNA。这样可避免 RNA 在管壁上的吸附，这将减少溶液中的 RNA 浓度。

* 操作化学品，切记总是要穿上合适的白大褂，戴上一次性手套和护目镜。有关更多信息，请咨询产品供应商提供的相应的材料数据表 (MSDS)。

[†] 在某些分光光度计上，纯度高的 RNA (在 10 mM Tris•Cl, pH 7.5 中) 的 $A_{260}:A_{280}$ 的值可高达 2.3。

来自不同组织纯化 RNA 样品中 DNA 污染

随着用于纯化 RNA 的组织不同，荧光信号也可能产生“无 RT”控制反应。从含 DNA 量很高的组织，如脾脏或胸腺等，纯化的 RNA 样品需要更严格的处理。对于这样的组织，我们建议用 miRNeasy Mini 和 miRNeasy 96 Kits 纯化 RNA 时，进行 DNase 酶降解。

产品订购信息

产品	规格	货号
miScript II RT Kit (12)	For 12 cDNA synthesis reactions: miScript Reverse Transcriptase Mix, 10x miScript Nucleics Mix, 5x miScript HiSpec Buffer, 5x miScript HiFlex Buffer, RNase-Free Water	218160
miScript II RT Kit (50)	For 50 cDNA synthesis reactions: miScript Reverse Transcriptase Mix, 10x miScript Nucleics Mix, 5x miScript HiSpec Buffer, 5x miScript HiFlex Buffer, RNase-Free Water	218161
miScript SYBR Green PCR Kit (200)	For 200 reactions: QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, miScript Universal Primer	218073
miScript SYBR Green PCR Kit (1000)	For 1000 reactions: QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, miScript Universal Primer	218075
miScript Primer Assay (100)	10x miScript Primer Assay (contains one miRNA-specific primer)	Varies*
Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array	Array of assays for a pathway, disease, or gene family for human, mouse, rat, dog, or rhesus macaque miRNAs; available in 96-well, 384-well, or Rotor-Disc 100 format	Varies
miScript miRNA HC PCR Array	High-content array of assays for a pathway, disease, or gene family miRNAs; available in 384-well format	Varies
miScript miRNA QC PCR Array	Array of quality control assays for human, mouse, rat, dog, or rhesus macaque miRNAs; available in 96-well, 384-well, or Rotor-Disc 100 format	Varies

* 有关这些产品的查询或订购信息，请访问 www.qiagen.com/GeneGlobe。

产品	规格	货号
RT ² PCR Array Loading Reservoir	12 x 5 ml capacity, irradiation-sterilized loading reservoirs	338162
384EZLoad Covers	Pack of 4 color-coded covers for loading 384-well plates	338125
相关产品		
miScript PreAMP PCR Kit (12)	For 12 preamplification reactions: 5x miScript PreAMP Buffer, HotStarTaq DNA Polymerase (2 U/μl), miScript PreAMP Universal Primer, 4 miScript Primer Assays, RNase-Free Water	331451
miScript PreAMP PCR Kit (60)	For 60 preamplification reactions: 5x miScript PreAMP Buffer, HotStarTaq DNA Polymerase (2 U/μl), miScript PreAMP Universal Primer, 4 miScript Primer Assays, RNase-Free Water	331452
miScript PreAMP Primer Mix	Primer mix for preamplification; for use with corresponding miScript miRNA PCR Array	Varies
miRNeasy Micro Kit (50)	For 50 total RNA preps: 50 RNeasy [®] MinElute [®] Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), QIAzol [®] Lysis Reagent, RNase-Free Reagents and Buffers	217084
miRNeasy Mini Kit (50)	For 50 preps: 50 RNeasy Mini Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), QIAzol Lysis Reagent, RNase-Free Reagents and Buffers	217004
miRNeasy 96 Kit (4)	For 4 x 96 preps: 4 RNeasy 96 plates, Collection Microtubes (racked), Elution Microtubes CL, Caps, S-Blocks, AirPore Tape Sheets, QIAzol Lysis Reagent, RNase-Free Reagents and Buffers	217061

产品	规格	货号
Serum/Plasma Kit (50)	For 50 total RNA preps: 50 RNeasy MinElute Spin Columns, Collection Tubes (1.5 ml and 2 ml), QIAzol Lysis Reagent, Ce_miR-39_1 miScript Primer Assay, RNase-free Reagents and Buffers	217184
miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control	10 pmol lyophilized <i>C. elegans</i> miR-39 miRNA mimic	219610
miRNeasy FFPE Kit (50)	50 RNeasy MinElute Spin Columns, Collection Tubes, Proteinase K, RNase-Free DNase I, DNase Booster Buffer, RNase-Free Buffers, RNase-Free Water	217504
PAXgene Tissue miRNA Kit (50)	For 50 RNA preps: PAXgene RNA MinElute Spin Columns, PAXgene Shredder Spin Columns, Processing Tubes, Microcentrifuge Tubes, Carrier RNA, RNase-Free DNase, and RNase-Free Buffers; to be used with PAXgene Tissue Containers	766134
PAXgene Tissue Containers (10)	For collection, fixation, and stabilization of 10 samples: 10 Prefilled Reagent Containers, containing PAXgene Tissue Fix and PAXgene Tissue Stabilizer	765112
PAXgene Blood miRNA Kit (50)	For 50 RNA preps: PAXgene Spin Columns, PAXgene Shredder Spin Columns, Processing Tubes, Microcentrifuge Tubes, RNase-Free DNase, RNase-Free Reagents and Buffers; to be used with PAXgene Blood RNA Tubes (available from BD, cat. no. 762165)	763134

有关最新的许可证信息和产品特定的免责声明，请浏览相应的 QIAGEN 试剂盒 手册。QIAGEN 试剂盒手册可在以下网站找到：www.qiagen.com，或可从 QIAGEN 技术支持部门或所在地区的分销商处索取。

商标: QIAGEN®, QIAzol®, QIAgility®, HotStarTaq®, miScript®, QuantiTect®, RNeasy®, Rotor-Gene®, Rotor-Disc®, MinElute® (QIAGEN Group); PAXgene® (PreAnalytix GmbH); Roche®, LightCycler® (Roche Group); ABI PRISM®, Applied Biosystems®, StepOnePlus™, ViiA™, ROX™, SYBR® (Life Technologies Corporation); Eppendorf®, Mastercycler® (Eppendorf AG); Stratagene®, Mx3005P®, Mx3000P®, Mx4000® (Agilent Technologies); Bio-Rad®, iCycler®, Chromo4™, CFX96™, DNA Engine Opicon®, CFX384™, iQ™, MyiQ™ (Bio-Rad Laboratories, Inc.); Excel® (Microsoft, Inc.)。此文件中使用的注册名, 商标等, 即使没有明确标示等, 并不被认为不受法律的保护。

Use of this product (miScript SYBR Green PCR Kit) is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,994,056 and 6,171,785. The purchase of this product includes a limited, nontransferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

The purchase of this product (miScript SYBR Green PCR Kit) includes a limited, non-transferable license under U.S. Patent No. 5,871,908 and all continuations and divisionals, and corresponding claims in patents and patent applications outside the United States, owned by Roche Diagnostics GmbH, for internal research use or for non-in vitro diagnostics applications with authorized reagents with regard to Melting Curve Analysis. No right is conveyed, expressly, by implication or estoppel, under any other patent or patent claims owned by Roche Diagnostics GmbH, or by any other Party.

NOTICE TO PURCHASER: DISCLAIMER OF LICENSE

No license is conveyed with the purchase of this product (miScript Reverse Transcription Kit, miScript Primer Assay, miScript Precursor Assay) under any of US Patents Nos. 5,804,375, 5,994,056, 6,171,785, 5,538,848, 5,723,591, 5,876,930, 6,030,787, and 6,258,569, and corresponding patents outside the United States, or any other patents or patent applications, relating to the 5' Nuclease and dsDNA-Binding Dye Processes. For further information contact the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE.

The use of this product (miScript SYBR Green PCR Kit) is covered by at least one claim of U.S. Patent No. 7,687,247 owned by Life Technologies Corporation. The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product, (b) its components, or (c) materials made by the employment of this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made by the employment of this product or its components for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity for which a party receives or is due to receive consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in research. The buyer cannot use this product or its components or materials made using this product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes. Further information on purchasing licenses under the above patents may be obtained by contacting the Licensing Department, Life Technologies Corporation, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008. Email: outlicensing@lifetech.com.

NOTICE TO PURCHASER: LIMITED LICENSE

The purchase of this product (miScript SYBR Green PCR Kit) includes a limited, non-transferable right to use the purchased amount of the product to perform Applied Biosystems' patented Passive Reference Method for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. For information on obtaining additional rights, please contact outlicensing@lifetech.com or Out Licensing. Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008.

Limited License Agreement for the miScript PCR System

Use of this product signifies the agreement of any purchaser or user of the product to the following terms:

1. The product may be used solely in accordance with the protocols provided with the product and this handbook and for use with components contained in the kit only. QIAGEN grants no license under any of its intellectual property to use or incorporate the enclosed components of this kit with any components not included within this kit except as described in the protocols provided with the product, this handbook, and additional protocols available at www.qiagen.com. Some of these additional protocols have been provided by QIAGEN users for QIAGEN users. These protocols have not been thoroughly tested or optimized by QIAGEN. QIAGEN neither guarantees them nor warrants that they do not infringe the rights of third-parties.
2. Other than expressly stated licenses, QIAGEN makes no warranty that this kit and/or its use(s) do not infringe the rights of third-parties.
3. This kit and its components are licensed for one-time use and may not be reused, refurbished, or resold.
4. QIAGEN specifically disclaims any other licenses, expressed or implied other than those expressly stated.
5. The purchaser and user of the kit agree not to take or permit anyone else to take any steps that could lead to or facilitate any acts prohibited above. QIAGEN may enforce the prohibitions of this Limited License Agreement in any Court, and shall recover all its investigative and Court costs, including attorney fees, in any action to enforce this Limited License Agreement or any of its intellectual property rights relating to the kit and/or its components.

For updated license terms, see www.qiagen.com.

© 2011–2012 QIAGEN, all rights reserved.

凯杰企业管理（上海）有限公司

电话：021-3865 3865

技术支持热线：800-988-0325 400-880-0325

TechService-CN@qiagen.com

www.qiagen.com

