天净沙系列

CAT#:17-hsa0378s

低温运输，-20℃保存

人 hsa-miR-190a-5p 夹板连接探针法 qPCR 试剂盒（含内参）

Human hsa-miR-190a-5p Splint-Ligation Probe qPCR Kit

使用手册 V0.50

北京天净沙基因科技有限公司

网址：www.tjs.bio；电话：400-1078566；电邮：order@tjs.bio

产品及特点

人 miRNA hsa-miR-190a-5p 是一种在人体中广泛存在的 miRNA，它通过调控特定基因的表达，在多种生理和病理过程中扮演着关键角色。慢性肾脏病患者中的 miR-190a-5p 水平显著降低，故此 miRNA 有望成为早期诊断和预后判断的新型无创生物标志物，因此对其快速检测具有重要的意义。为此，本公司开发了 hsa-miR-190a-5p 夹板连接探针法 qPCR 检测试剂盒，它具有下列特点：

1. 即开即用，用户只需要提供样品 RNA 模板。
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏度高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 不受 miRNA 3-OH 末端修饰的影响，降低漏检此类 miRNA 的机率。
4. 整个反应不使用逆转录，故比基于逆转录的检测方法变异系数更低。
5. 提供扩增阳性对照和扩增阴性对照，便于排除扩增假阴性和假阳性结果。
6. 含识别内源性内参的引物和探针，便于排除 PCR 假阴性结果。
7. 特异性高，引物探针专门根据人 hsa-miR-190a-5p 设计，不会跟其他 miRNA 发生交叉反应，包括 hsa-miR-190b-5p。
8. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。定量检测时线性范围至少 5 个数量级。
9. 本产品足够 50 次 20 μL 体系的夹板连接探针法 qPCR 反应。
10. 本产品只能用于科研。

规格及成分

本产品采用十孔盒包装

成分	编号	规格	包装
10×夹板连接反应液	220761-3a	50 μL	0.5 mL 绿盖管
夹板连接酶	220761-3b	25 μL	0.5 mL 红盖管
hsa-miR-190a-5p 及内参夹板连接底物（冻干粉）	17-hsa0378s-a	50 T	0.5 mL 黄盖管
夹板连接探针法预处理液	17-hsa0378s-b	50 μL	0.5 mL 白盖管
2×Probe qPCR MasterMix	981201	0.5 mL	0.5 mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	180701	1 mL	1.5 mL 绿盖管
hsa-miR-190a-5p 及内参 qPCR 引物-探针（冻干粉）	yp17-hsa0378s	50 T	0.5 mL 棕色管
hsa-miR-190a-5p（冻干粉）	3-hsa-miR-190a-5p	50 T	0.5 mL 黄盖管
hsa-miR-190b-5p（冻干粉）	3-hsa-miR-190b-5p	50 T	0.5 mL 黄盖管
超纯水	210806	1 mL	1.5 mL 蓝盖管
使用手册	17-hsa0378s-sc	1 份	无

运输及保存

低温运输，-20℃保存，保存期限为 12 个月。

自备试剂	样品 RNA，超纯水，核酸纯化试剂盒。
使用方法	**一、首次使用本试剂盒时，需要制备下列溶液。** 1. 配制引物-探针混合液：将 55 μL 超纯水加入到装有人 hsa-miR-190a-5p 及内参引物-探针冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得。放冰上待用。没用完的需存-80℃。 2. 配制夹板连接底物：将 55 μL 超纯水加入到装有人 hsa-miR-190a-5p 及内参夹板连接底物冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得。放冰上待用。没用完的需存-80℃。 3. 配制反应阳性对照：将 55 μL 超纯水加入到装有人 hsa-miR-190a-5p 冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得，放冰上待用。没用完的需存-80℃。 4. 配制反应阴性对照：将 55 μL 超纯水加入到装有人 hsa-miR-190b-5p 冻干粉的管中，涡旋震荡混匀 30 秒即得，放冰上待用。没用完的需存-80℃。 **二、标准曲线制备（以 1E1-1E6 拷贝/μL 这 6 个 10 倍稀释的标准曲线样本为例）** 5. 标记 6 个离心管，分别为 6、5、4、3、2、1。 6. 用带芯枪头分别加入 45 μL 荧光 PCR 专用模板稀释液，最好用带芯枪头，下同）。 7. 在 6 号管中加入 5 μL 1E7 拷贝/μL 的反应阳性对照(来于第 3 步)，充分震荡 1 分钟，得 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 8. 换枪头，在 5 号管中加入 5 μL 1E6 拷贝/μL 的标准曲线样品(来于上步)，充分震荡 1 分钟，得 1E5 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 9. 换枪头，在 4 号管中加入 5 μL 1E5 拷贝/μL 标准曲线样品(来于上步)，充分震荡 1 分钟，得 1E4 拷贝/μL 的标准曲线样品。放冰上待用。 10. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。一次实验没用完的标准曲线样品需存-80℃。 **三、样品 RNA 的制备** 11. 如果有 N 个样品，最好设置 N+2 个提取，多出的两个分别是 PC（制备阳性对照），和 NC（制备阴性对照），分别用确认含靶分子和不含靶分子的样本作为其起始材料。 12. 用自选方法纯化样品的总 miRNA，本产品跟市场上大多数 miRNA 提取试剂盒兼容。 **四、夹板连接探针法 PCR 反应（20 μL 体系，在样品制备室进行）** 13. 对定量分析并且只做 1 次重复：标记 N+9 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于反应阴性对照，6 个用于标准曲线。按下表加入各成分：

成分	样品管 N+2 个	反应 阴性对照	标准曲线样品管 (1-6 管)
10×夹板连接反应液	各 0.8 μL	0.8 μL	各 0.8 μL
夹板连接底物（第 2 步）	各 1 μL	1 μL	各 1 μL

N+2 个待测样本（第 11 步）	各 5.7 μL	不加	不加
反应阴性对照（第 4 步）	不加	5.7 μL	不加
6 个标准曲线样品（第 10 步）	不加	不加	各 5.7 μL（2 号样到 2 号管，3 号样到 3 号管…）
夹板连接酶	各 0.5 μL	0.5 μL	各 0.5 μL
25℃保温 1 小时			
夹板连接探针法预处理液	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
在 PCR 仪上 37℃保温 1 小时，95℃ 10 分钟。			
2×Probe qPCR MasterMix	各 10 μL	10 μL	各 10 μL
引物-探针混合液（第 1 步）	各 1 μL	1 μL	各 1 μL
上机进行 PCR。PCR 参数是 95℃ 3 分钟，50 个循环（95℃ 15 秒，60℃ 60 秒，在 60℃时同时采集 FAM 和 Cy5 通道的荧光信号，淬灭基团均为 MGB）。			

14. 对定性分析并且只做 1 次重复：标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个待测样品，另 2 个分别用于反应阴性对照和反应阳性对照（用第 9 步所得标准曲线样品做模板），不做 6 个标曲样品，其余操作相同。

五、数据处理

15. 实验有效性判断：如果制备阳性对照或反应阳性对照（或任何一个标曲样本）FAM 结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据。需要重复实验或跟厂家联系。如果制备阴性对照或反应阴性对照的 FAM 结果为阳性，说明环境或试剂污染，整个实验无效，不需要分析数据，需要查找原因或跟厂家联系。如果 4 个对照的 FAM 结果均正常（阳性对照结果为阳性，阴性对照结果为阴性），则实验有效，可进入下步分析。
16. 对定量检测样本的判断：以 6 个标曲样本浓度的 log 值为横轴，以 FAM 通道的 Ct 值为纵轴（标曲样中没有 U6 RNA，故其 Cy5 通道将没有信号），绘制标准曲线，得到线性回归方程式。再将待测样品 FAM 通道的 Ct 值代入到此方程式中，计算出样品靶分子浓度的 log 值，再将 log 值换成浓度（拷贝/μL）即为样本中靶分子浓度。
17. 对定性检测样本的判断：如果某样本 FAM 通道 Ct 没有读数，或者其读数大于或等于 40，同时 Cy5 通道 Ct 小于 40，则此样本判为阴性。如果 Cy5 通道 Ct 也没有或有数值但大于 40，则此样本判为无效。需要从样本制备开始重复。如果某样本 FAM 通道 Ct 读数小于 40，荧光信号呈典型的对数增长（倒 S 型），则无论其对应的 Cy5 Ct 数值如何，此样本判为阳性。

关联产品	hsa-miR-190b-5p 夹板连接法试剂盒