GenePharma

Hairpin-it™ miRNAs RT-PCR Quantitation Kit

For the detection and quantification of miRNAs using real-time RT-PCR detection instruments.

User Manual

B004-V002A-20210719

介绍

产品简介

miRNA是由动物、植物和病毒基因组所编码的一种短小单链，是由19-23个核苷酸组成的RNA。成熟的miRNA会进入RNA诱导的沉默复合体（RISC）并且促使该复合体诱导mRNA的转录抑制或是特异靶mRNA的酶切降解。

miRNAs不仅在细胞生长和凋亡、血细胞分化、同源异形盒基因调节、神经元的极性、胰岛素分泌、大脑形态形成、心脏发育、胚胎后期发育等过程中发挥重要作用，而且在肿瘤发生过程中也起着至关重要的作用。

Hairpin-it™ miRNAs定量RT-PHSA-MIR-16CR试剂盒提供的是利用实时荧光定量PCR对总RNA中的miRNA检测与定量的一种方法，与一般的miRNA检测方法相比，该Hairpin-it™ miRNAs 定量PCR试剂盒具有更快速、更灵敏、更特异的特点：

□高度特异性

茎环结构的逆转录引物以及miRNA高特异的PCR正反向引物保证了该方法的高度特异性，不仅可以区分成熟体和前体，即使是高度同源的miRNA都能被准确区分。

□更宽广的动态变化范围和更高的灵敏度

比传统的miRNAs定量检测方法（如Northern-blot和micro-array）具有更宽广的动态变化范围（至少7次方的数量）和更高的灵敏度，保证了该方法能够准确定量ng级别总RNA中最低量至几个拷贝的目标miRNA。

□更少的样品需求

总RNA、细胞裂解物或是已纯化的miRNA分离物都可用于试剂盒反应所需的模板，甚至有基因组DNA的污染也不会干扰miRNA定量。

检测原理

Hairpin-it™ miRNA定量分析包括两个步骤，逆转录反应和实时荧光定量PCR：

miRNA逆转录引物是一种茎环结构的引物，“茎”部分的碱基的互补和堆积能增加RNA–DNA杂交复合物的热稳定性，茎环结构的空间约束力相比于传统的线性逆转录引物来说，更有助于提高反应的特异性，这样使逆转录的特异性和效率高于线性引物。miRNA逆转录引物与miRNA 3’端特异的结合后，在逆转录酶的作用下进行逆转录反应。

然后正反向引物和荧光染料共同参与的定量PCR反应体系，对上述逆转录产物进行定量检测。

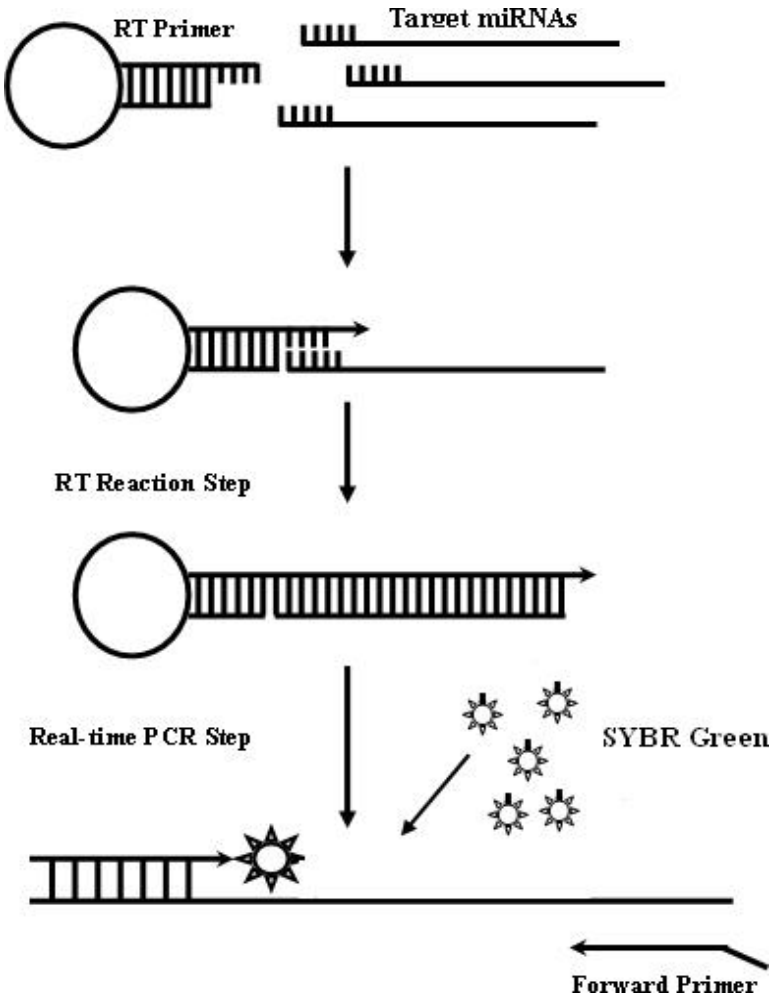


图1．Hairpin-it™ miRNAs 实时定量检测原理

组分和保存

Hairpin-it™ miRNA定量试剂盒包括以下组分，按照所述条件短期贮存，长期贮存请全部置于–20℃，保质期3个月，如需要，可将dNTP、探针等试剂分装成小份，避免试剂反复冻融，若反复冻融可导致扩增效果不佳和保质期缩短等后果。

Reagent	Amount				Storage
	50 rxns	100 rxns	200 rxns	500 rxns	
5× RT buffer	200 µl	400 µl	0.8 mL	2× 1 ml	4℃
dNTP（10mM）	40 µl	80 µl	160 µl	400 µl	-20℃
MMLV Reverse Transcriptase（200U/µl）	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	-20℃
2× Real-time PCR Master Mix[1]	0.5 ml	1 ml	2× 1 ml	5× 1 ml	4℃
miRNA RT primer（10µM）	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	4℃
miRNA specific primer Set（10µM）	20 µl	40 µl	80 µl	200 µl	4℃
miRNA specific probe（10µM）[2]	20 µl	40 µl	80 µl	200 µl	4℃
ROX reference dye（50×）[3]	20 µl/100 µl	40 µl/200 µl	80 µl/400 µl	200 µl/1 ml	4℃
rTaq DNA polymerase （5U/µl）	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	-20℃
Synthetic miRNA Standard	1 pmol	1 pmol	1 pmol	1 pmol	-20℃
RNase free H_2O	2× 1.5 ml	2× 1.5 ml	4× 1.5 ml	10× 1.5 ml	4℃
1× RNA Dilution buffer	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	1.0 ml	4℃

NOTE

1. 吉玛的专用的荧光定量PCR缓冲混合液，预混了反应所需的试剂，其中染料法试剂盒的Master Mix含有SYBRGreen I 荧光染料，**需要避光保存**，而探针法试剂盒的MasterMix不含荧光染料，所以不需要避光保存；
2. Gene specific probe（10µM）为探针法试剂盒专有的TaqMan探针，5’标记FAM荧光基团，3’标记BHQ1荧光基团，其原理是利用Taq酶的3’→ 5’ 外切酶活性，在PCR过程中水解探针，从而产生和目的片段同步增长的荧光信号，**请务必将探针避光保存**；
3. ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差,需要使用低浓度 ROX Reference Dye 校正的仪器有Applied Biosystems 7000/7300/7500/7500 Fast/7900 Real-Time PCR System，配套ROX 终浓度1×（0.4 µl）；需要使用高浓度ROX Reference Dye 校正的仪器有Applied Biosys-tems Step One Plus Real-Time PCR System 和QuantStudio系列，配套ROX 终浓度为5×（2 µl）。其他品牌仪器不需要ROX校准，ROX Reference Dye需要避光保存。

用户需要自备的材料

RNA酶抑制剂 (RNase inhibitor)	RNA酶抑制剂是从人胎盘中提取的一种广谱的核糖核酸酶抑制剂，分子量约50KDa，在cDNA合成过程中可保护RNA不被RNA酶降解，提高cDNA质量。
良好光学PCR板或PCR管	为了消除在荧光检测的步骤中由于 PCR 管或是 PCR96 孔板所带来的误差，我们推荐您使用与ABI PRISM 7000/7300/7500/7900, MX3000p/4000p 等仪器配套的PCR管及96孔板。

方法

一、建立miRNA标准曲线

miRNAs标准品既可以用于质量控制，又可以确定RNA样品中miRNA的绝对数量。吉玛提供的miRNA标准品是1 pmol干粉的贮存形式，操作该标准品的时候请参照以下的指导：

稀释：把装有RNA标准品的管子于10000 g离心1分钟。小心打开管盖，加入100 μl 1× RNA Dilution buffer（由试剂盒提供）将标准品稀释至10 nM，然后标准品母液十倍梯度稀释至1 nM、0.1 nM、10 pM、1 pM共4个梯度标准品。

绝对定量时各取2 μl标准品溶液至逆转录体系（20 μl）中，4个梯度分别代表每个逆转录完成后每微升cDNA中含有PCR反应6×10^7、6×10^6、6×10^5、6×10^4个拷贝；0.1 nM标准品也可以作为质控品与质检报告中给的对应Ct值比较，对试剂盒的运输过程和实际操作进行质量控制。

IMPORTANT

1. 贮藏：
   将标准品溶液存放在–20℃是非常重要的，如能置于–80℃ 中，则保存时间会更长。
2. 无RNA酶环境：
   所有的操作都推荐使用无RNA酶并高压灭菌过的EP管及吸头。

二、逆转录实验

1. miRNAs 逆转录引物和U6 snRNA逆转录引物的稀释

试剂盒中提供的逆转录引物是10 μM的贮存液，针对本试盒，使用时稀释10倍成1 μM逆转录引物工作液。在一次标准的逆转录中，逆转录引物的终浓度为60 nM。此用量针对本试剂盒提供的MMLV酶，<u>如果逆转录酶为客户自购，以说明书为准。</u>

NOTE

1. 如果您需要以U6 snRNA为内参做相对定量，为了节省逆转录试剂和获得更稳定的结果，我们建议可以将U6逆转录引物（eg. 10 μM 10 μl）和目标miRNA逆转录引物（eg. 10 μM 10 μl）混合，一起稀释10倍成1 μM逆转录引物工作液（eg. 加80 μl Rnase free H_2O），一次逆转录反应同时得到miRNA和U6 snRNA定量PCR cDNA模板，获得和分开逆转录同样的效果。
2. 经试验测试，对于同一样品，U6 snRNA定量RT-PCR无批间差异，结果稳定。
3. 考虑到miRNAs逆转录引物的茎环结构，我们不建议将不同的miRNAs逆转录引物混合进行逆转录反应。

2. 逆转录反应体系的制备

下列表格提供了20μl 逆转录反应加样量体系

Component	Final Con.	Vol/1 rxns
5×RT buffer	1×	4.00 μl
dNTP（10 mM）	0.375 mM	0.75 μl
U6 snRNA/ miRNA RT primers（1 μM）[1]	60 nM	1.20 μl
RNase inhibitor（40 U/μl）[2]	0.5 U/μl	0.25 μl
MMLV Reverse Transcriptase（200 U/μl）[3]	40 U	0.20 μl
RNA Sample[3]	1-3 μg	X μl
RNase Free H_2O		To 20 μl [4]

[1] 可单独或混合逆转录miRNAs和U6；
[2] RNase inhibitor 为非必需试剂，请客户自备；
[3] RNA 模板量可以根据实验的需要从1 μg到3 μg或者更多。
[4] 除了在42℃反应比较稳定之外，对于逆转录反应及逆转录酶并没有特殊的要求，我们推荐您用20μl 逆转录体系。

NOTE

1. 请把所有的试剂，反应的混合液和样品至于冰上；
2. 在逆转录反应之前须将除了逆转录酶外的各种试剂混匀，可用手指轻弹装试剂的管壁，逆转录mix可用移液器吸打几次，**请勿使用振荡器**。

3. miRNAs 逆转录程序

标准的逆转录反应程序：
26℃ 40 分钟，42℃ 40 分钟，85℃ 10 分钟，4℃保存。
（如客户自行提供逆转录试剂，反应条件须参考试剂供货说明书）

NOTE

逆转录反应 85℃ 10分钟结束后立即将cDNA产物取出，快速置冰上冷却，后续所有步骤都在冰上进行，不要将cDNA产物随便从冰上移走。

4. 逆转录产物的保存

混匀cDNA并且从中吸取2 μl（20 μl体系）当作定量PCR的模板。如果逆转录引物工作液是U6 snRNA和miRNA的引物混合物，cDNA产物可作为U6 snRNA和miRNA荧光定量PCR反应的共同模板。逆转录cDNA暂时不用，可将其存放于-20℃，三天内可保持稳定，长期保存请冻存于-80℃。

三、荧光定量PCR(qPCR)实验

1. 定量PCR反应mix制备

a. 按照下表分别配置miRNA和U6 snRNA 两个独立的荧光定量反应体系；
b. 建议客户在使用前混匀并低速离心，确保2× Real-time PCR Master Mix、50× ROX Reference Dye、引物、模板完全溶解，所有的试剂都在管底或板孔底部。
c. 建议置于冰上进行Real Time PCR反应液的配制：

表一、 染料法定量 PCR 20 μl反应加样量体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2× Real-time PCR Master Mix（SYBR）	1×	10 μl
miRNA/U6 snRNA specific Primer set（10μM）[1]	0.2 μM	0.4 μl
ROX reference dye（50×）	1× / 5×	0.4 μl / 2 μl
rTaq DNA polymerase（5 U/μl）	1 U	0.2 μl
cDNA		2 μl
RNase free H_2O		Up to 20 μl

表二、 探针法定量 PCR 20 μl反应加样量体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2× Real-time PCR Master Mix（FAM）	1×	10 μl
miRNA/U6 snRNA specific Primer set（10 μM）[1]	0.2 μM	0.4 μl
miRNA/U6 snRNA specific Probe（10 μM）[2]	0.1 μM-0.2 μM	0.2 μl-0.4 μl
ROX reference dye（50×）	1× / 5×	0.4 μl / 2 μl
rTaq DNA polymerase（5 U/μl）	1 U	0.2 μl
cDNA		2 μl
RNase free H_2O		Up to 20 μl

NOTE

[1] 引物终浓度为0.2 μM可以在大多数体系中获得良好的扩增结果。可以在0.1-0.5μM 范围内调整：扩增效率不高时，可增加PCR反应体系中的引物浓度；发生非特异扩增时，可适当减少PCR反应体系中的引物浓度；

[2] 探针体系会因序列不同浓度有所调整，表中给出的是通用的范围，**每个试剂盒都经过吉玛公司精心的验证，具体条件可以质检报告所述条件为参考；**

2. 实时定量 PCR 反应程序

A：（推荐）

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
预变性	1×	95℃	3 min	
PCR反应	40×	95℃	12 sec	
		62℃	40 sec	采集

B：（可选）

阶段	循环	温度	时间	荧光信号采集
预变性	1×	95℃	3 min	
PCR反应	40×	95℃	12 sec	
		62℃	30 sec	
		72℃	30 sec	采集

NOTE

1. 染料法荧光基团选择SYBR，探针法荧光基团选择FAM，淬灭基团选择NONE；需要ROX校准的仪器选择ROX作为校准染料。
2. 用户可根据具体需求选择扩增反应程序，操作步骤参考本公司荧光定量检测试剂盒。

（如客户自行提供反应试剂，反应条件须参考试剂供货说明书）

数据分析

1. 设置一个校正样品

在做microRNA相对定量之前，首先必须确定校正样品，通常校正样品可以是正常的或是没经过实验处理的样品。

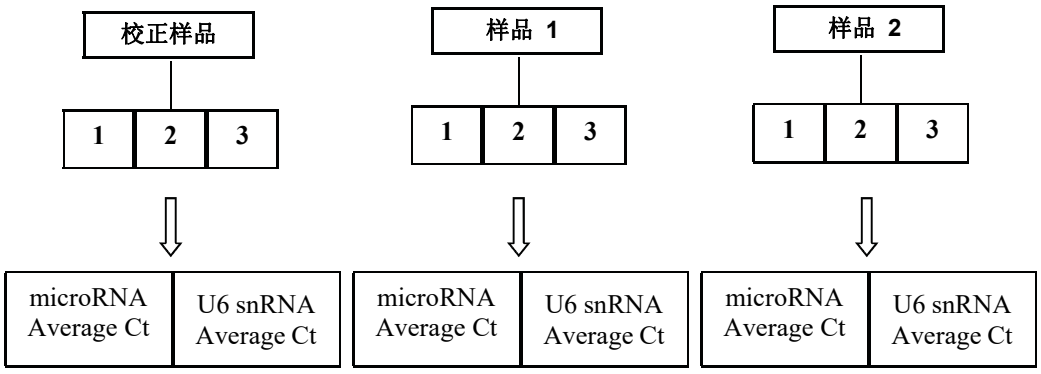
2. 用**U6 snRNA**作为标准化内参

microRNA相对Ct法定量，标准化基因通常为管家基因或者一些经过表达谱分析验证过的miRNA。可以用microRNA的Ct值减去标准化基因的Ct值得到校正样品和其他样品的△Ct。我们推荐任何一个样品的标准化基因的Ct值不能大于或等于30，如果该基因的Ct值确实稳定在30或以上，您可以考虑增加用于逆转录的初始总RNA的量。

计算 microRNA 相对于U6 snRNA 的表达比率

每个样品对应每个基因至少要做 2-3 个复孔

第一步
设计microRNA相对定量实验



第二步
进行荧光定量PCR反应来得到每个反应的microRNA 和U6的Ct值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	U6 snRNA	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**
Ct 1	17.02	25.55	17.09	25.03	16.82	26.00
Ct 2	16.93	25.25	16.96	24.97	16.88	25.67
Ct 3	17.04	25.47	16.98	24.86	16.84	25.82

IMPORTANT

注意复孔间的Ct值差异不要大于0.5，否则我们推荐重复实验

第三步
计算样品和校正样品三复孔的平均值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	U6 snRNA	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**
Average Ct	17.00	25.42	17.01	24.95	16.85	25.83

Sample 1 ΔCt= Ct (miR-16) - Ct (U6 snRNA)

第四步
miRNA的平均Ct值减去U6 snRNA的Ct平均值，计算各个样品的ΔCt值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	U6 snRNA	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**
Average Ct	17.00	25.42	17.01	24.95	16.85	25.83
ΔCt	-	8.43	-	7.94	-	8.98

ΔΔCt (sample1) = ΔCt (sample1) –ΔCt (calibrator1)

第五步
样品的ΔCt值减去校正样品的ΔCT 值，计算得到各个样品的ΔΔCT值

	校正样品		样品 1		样品 2	
	U6 snRNA	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**
Average Ct	17.00	25.42	17.01	24.95	16.85	25.83
ΔCt	-	8.43	-	7.94	-	8.98
ΔΔCt	-	0.00	-	- 0.49	-	0.55

Relative Expression Ratio (sample1) = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (sample1)

第六步
计算相对表达比率

	校正样品		样品 1		样品 2	
	U6 snRNA	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**	**U6 snRNA**	**hsa-miR-16**
Average Ct	17.00	25.42	17.01	24.95	16.85	25.83
ΔCt	-	8.43	-	7.94	-	8.98
ΔΔCt	-	0.00	-	- 0.49	-	0.55
$2^{-\Delta\Delta Ct}$	-	1.00	-	1.40	-	0.68

附录

万维网　　您可以通过浏览器访问吉玛网站，获取我们的网络资源：

☐下载PDF格式的手册
☐搜索我们的产品目录号和完整的彩色图解说明
☐能够获得我们热销的新产品和特有产品的信息
☐获得吉玛公司产品的引证
☐索要产品目录以及相关产品宣传资料

联系我们　　如果您需要更多的信息或者技术上的帮助，请打电话或者电子邮件联系我们

上海吉玛制药技术有限公司
地址：上海浦东新区张江路368号2号楼
邮编：201203
电话：86-21-51320195
传真：86-21-51320195
E-mail: service@genepharma.com
网址：www.genepharma.com

苏州吉玛基因股份有限公司
地址：苏州工业园区生物纳米科技园东平街199号
邮编：215125
电话：0512-86668828
传真：0512-86665900
E-mail: szservice@genepharma.com
网址：www.genepharma.com

©2018－2019 Genepharma Corporation. All rights reserved.For research use only. Not in-tended for any animal or human.