



GenePharma

Hairpin-itTM miRNAs RT-PCR Quantitation Kit

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

User Manual
Version 1406

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，约有19-23个核苷酸组成的RNA，成熟的miRNA参与组成“RNA诱导的沉默复合体”，并且指导该复合体进行转录、转录后翻译的抑制或是特异性的内切靶mRNA。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、心脏发生、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-PCR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，茎环结构的空问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 miRNA3'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。

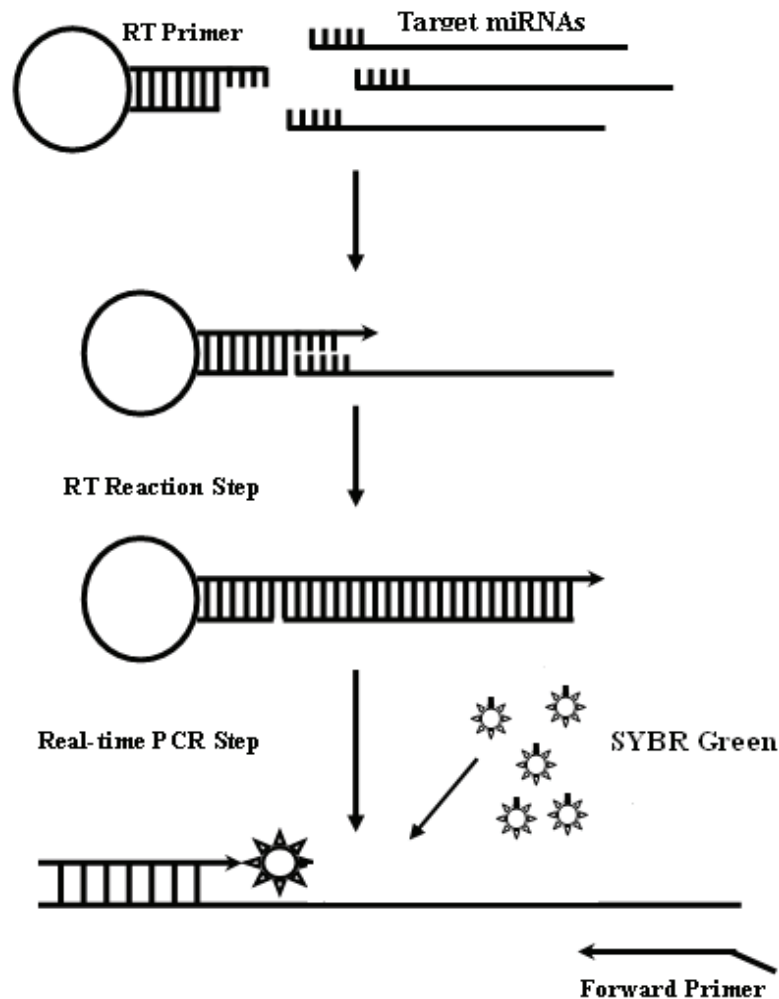


图1. Hairpin-it™ miRNAs 实时定量检测原理

组分和保存

Hairpin-it™ miRNA 定量检测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,如果需要将dNTP、探针等试剂分装成小份避免试剂反复冻融,如反复冻融扩增效果和保质期将会根据冻融次数缩短。

Reagent	Amount				Storage
	50rxns	100rxns	200rxns	500 rxns	
RT buffer (5×)	200μl	400μl	0.8mL	2×1 ml	4℃
dNTP (10mM)	40μl	80μl	160μl	400μl	-20℃
MMLV Reverse Transcriptase(200U//μl)	10μl	20μl	40μl	100μl	-20℃
Real-time PCR Master Mix (2×) ¹	0.5mL	1 ml	2×1 ml	5×1 ml	4℃
miRNA RT primer (10μM)	10μl	20μl	40μl	100μl	4℃
miRNA specific primer Set (10μM)	20μl	40μl	80μl	200μl	4℃
miRNA specific probe (10μM) ²	20μl	40μl	80μl	200μl	4℃
ROX reference dye(50×) ³	20μl/100uL	40μl/200uL	80μl/400uL	200μl/1mL	4℃
rTaq DNA polymerase (5U/μl)	10μl	20μl	40μl	100μl	-20℃
Synthetic miRNA Standard	1pmol	1pmol	1pmol	1pmol	-20℃
RNase free H ₂ O	1.5 ml	1.5 ml	2×1.5 ml	5×1.5 ml	4℃
Sterilized H ₂ O	1.0 ml	1.0 ml	2×1.0m l	5×1.0ml	4℃
1X RNA Dilution buffer	1.0 m	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 Master Mix不含荧光染料,所以不需要避光保存;
- 2 miRNA specific probe (10μM) 为探针法试剂盒专用的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, 需要使用高浓度ROX Reference Dye 校正的仪器有Applied Biosystems Step OnePlus Real-Time PCR System,其他品牌仪器不需要ROX校准, ROX Reference Dye需要避光保存。

用户需要提供的材料

良好光学性能的**PCR管**及**96孔板**

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。

RNA 酶抑制剂(RNasin)

方法

1. 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1pmol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 转/分钟离心1分钟。小心打开管盖，加入1ml RNA dilution buffer（由试剂盒提供）将此 RNA 标准品干粉稀释至 1nM标准品，然后将该标准品十倍梯度稀释成0.1nM、10pM、1pM共4个梯度标准品。

绝对定量时各取2 μ l标准品溶液至逆转录体系中，4个梯度分别代表每个PCR反应 6×10^8 、 6×10^7 、 6×10^6 、 6×10^5 个拷贝；0.1nM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°C 是非常重要的，如能置于 -80°C 中，则保存时间会更长。
- 2.无 RNA 酶环境：
 - a.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
 - b.操作试剂时请戴上手套。

2. miRNAs 逆转录引物的稀释

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



NOTE

如果您需要以U6 snRNA为内参做相对定量分析，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miRNA 逆转录引物(eg. 12 μ l)和U6 逆转录引物(eg. 12 μ l)混合，一起稀释10倍成 $1\mu\text{M}$ 逆转录引物工作液(eg. 加96 μ l 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。

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。

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。

3. 逆转录反应体系的制备

下列表格提供了20 μ l 逆转录反应加样量体系

Component	Final Con.	Vol/1 rxns
5 \times MMLV RT Buffer	1 \times	4 μ l
dNTP (10mM)	0.375 mM	0.75 μ l
miRNA-RT primers (1 μ M)	60 nM	1.20 μ l
RNasin (40U/ μ l) ¹	0.5U/ μ l	0.25 μ l
MMLV Reverse Transcriptase (200U/ μ l)	40 U	0.2 μ l
RNA Sample ²	1-3 μ g	X μ l
RNase Free H2O		To 20 μ l

¹ RNasin为非必需试剂，请客户自备；

² RNA 模板量可以根据实验的需要从1 μ g 到3 μ g 或者更多。



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子，逆转录 mix 可用移液器吸打几次，**千万不要用振荡器**。

4. miRNA逆转录程序

标准的逆转录反应程序：

25 $^{\circ}$ C 30 分钟，42 $^{\circ}$ C 30 分钟，85 $^{\circ}$ C 5 分钟，4 $^{\circ}$ C 保存。



NOTE

逆转录反应 85 $^{\circ}$ C 5 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。

5. miRNA 逆转录产物的操作

为了用于Hairpin-itTM miRNAs实时定量分析，混匀cDNA并且从中吸取2 μ l (20 μ l 体系) 或者4 μ l (40 μ l 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 $^{\circ}$ C，三天内可保持稳定，长期保存请冻存于-80 $^{\circ}$ C。

6. 定量 PCR 反应 mix 制备

1. 确保2×Master Mix(如果保存在-20℃)、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，建议客户在使用前混匀并低速离心。
2. 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 20μl反应加样量体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2×Real-time PCR Master Mix (SYBR)	1×	10μl
miRNA specific Primer set(10μM) ¹	0.2μM	0.4μl
ROX reference dye(50×) ³	1× or 5×	0.4μl or 2μl
Taq DNA polymerase (5U/μl)	1 U	0.2μl
miRNA RT product		2μl
Sterilized H ₂ O		To 20μl

表二、探针法定量 PCR 20μl反应加样量体系

Component	Final Con.	Vol /1 rxns
2×Real-time PCR Master Mix (FAM)	1×	10μl
miRNA specific Primer set (10μM) ¹	0.2μM	0.4μl
miRNA specific Probe (10μM) ²	0.10μM-0.20μM	0.2 μl-0.40ul
ROX reference dye(50×) ³	1× or 5×	0.4μl or 2μl
Taq DNA polymerase (5U/μl)	1 U	0.2μl
miRNA RT product		2μl
Sterilized H ₂ O		To 20μl



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；

³ ROX Reference Dye 是用以校正孔与孔之间产生的荧光信号误差，Applied Biosystems 7000/7300/ 7500/7500 Fast/7900 Real-Time PCR System 配套ROX 终浓度1× (0.4μl)，Applied Biosystems Step OnePlus Real-Time PCR System 配套ROX 终浓度为5× (2μl)，其他品牌仪器不需要ROX校准。

7. miRNAs 实时定量 PCR 反应程序

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 seconds	
		62℃	40 seconds	采集



NOTE

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

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。

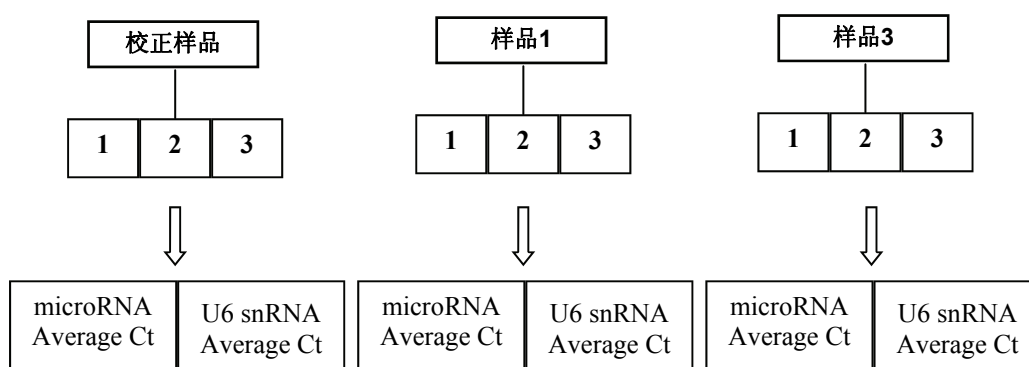
2. 用U6 snRNA作为标准化内参

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 ΔCt 。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	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16
Ct 1	24.60	26.21	23.63	30.40	22.66	24.21
Ct 2	24.31	26.15	23.40	30.35	22.56	24.60
Ct 3	24.72	26.35	23.52	30.41	22.48	24.66



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	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	22.49	22.56

$$\text{Sample 1 } \Delta\text{Ct} = \text{Ct}(\text{miR-16}) - \text{Ct}(\text{U6snRNA}) = 30.39 - 23.51 = 6.88$$

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	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
ΔCt	-	1.70	-	6.88	-	1.93

$$\Delta\Delta\text{Ct}(\text{sample1}) = \Delta\text{Ct}(\text{sample1}) - \Delta\text{Ct}(\text{calibrator1}) = 6.88 - 1.70 = 5.18$$

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 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 值

	校正样品		样品 1		样品2	
	U6 snRNA	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
ΔCt	-	1.70	-	6.88	-	1.93
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	5.18	-	0.23

$$\text{Relative Expression Ratio}(\text{sample1}) = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}(\text{sample1}) = 2^{-5.18} = 0.027$$

第六步
计算相对表达比率

	校正样品		样品 1		样品2	
	U6 snRNA	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16	U6 snRNA	Has-mir-16
Average Ct	24.54	26.24	23.51	30.39	24.49	22.56
ΔCt	-	1.70	-	6.88	-	1.93
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	5.18	-	0.23
$2^{\Delta\Delta\text{Ct}}$	-	1.00	-	0.027	-	0.85

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来联系我们

上海吉玛制药技术有限公司

地址：上海张江高科技园区哈雷路1011号

电话：86-21-51320195

传真：86-21-51320295

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

©2005 - 2006 Genepharma Corporation. All rights reserved. For research use only. Not intended for or human therapeutic or diagnostic use.