

HaiGene SYBR Green miRNA定量解决方案

—miRNA提取、反转录、RealTime PCR

前言.....	1-3
第一步 miRNA的提取.....	4-6
组织样本miRNA提取	4
细胞样本miRNA提取	5
全血样本miRNA提取	6
第二步 通过加A法miRNA反转录试剂盒获得cDNA.....	7-8
第三步 通过HG SYBR Green miRNA荧光定量试剂盒检测miRNA.....	8-10
配制反应体系.....	8
进行Real-Time PCR反应.....	9-10
参考文献/英文材料与amp;方法.....	10-11

本方案适用于以下试剂

货号	名称	规格	价格（元）
B1802	快速组织细胞miRNA提取试剂盒	25T/100T	500/1600
B1803	快速全血miRNA提取试剂盒	25T/100T	500/1600
D1801	一步法miRNA反转录试剂盒	25T/100T	800/2600
APXXXXX	HG SYBR Green miRNA荧光定量PCR试剂盒	100T×20μl	500
S0105	RnaseFree TE Buffer	1ml×10	50



前言

对miRNA进行定量研究的经典方法是ABI公司的探针法，其采用特殊结构的茎环反转录引物对miRNA进行反转录，之后采用MGB探针进行RealTime PCR定量分析，这种方法具有特异性高、定量准确的优点，但是试验需要订购ABI公司的成套的引物试剂，成本很高。2008年Soroush首次报道了miR-Q技术【1】，该技术使用了含有tag的特异性反转录引物，这样可以很好的区分相似度很高的miRNA（原理如图1A）。2011年Peter对miR-Q技术进行了改良【2】，对miRNA进行加A后，采用含tag和oligo dT的引物进行反转录，之后采用含特异性序列的上下游引物进行RealTime PCR（原理如图1B），这样保证了miRNA的扩增特异性，其可以很好的区分单个碱基差异的miRNA【结果如图2所示】。实际的大规模应用中也表明该方法确实可以有效的对miRNA进行定量研究，其结果的可靠性可比拟探针法【结果如图3所示】，已经被大量研究者所采用【3~13】。

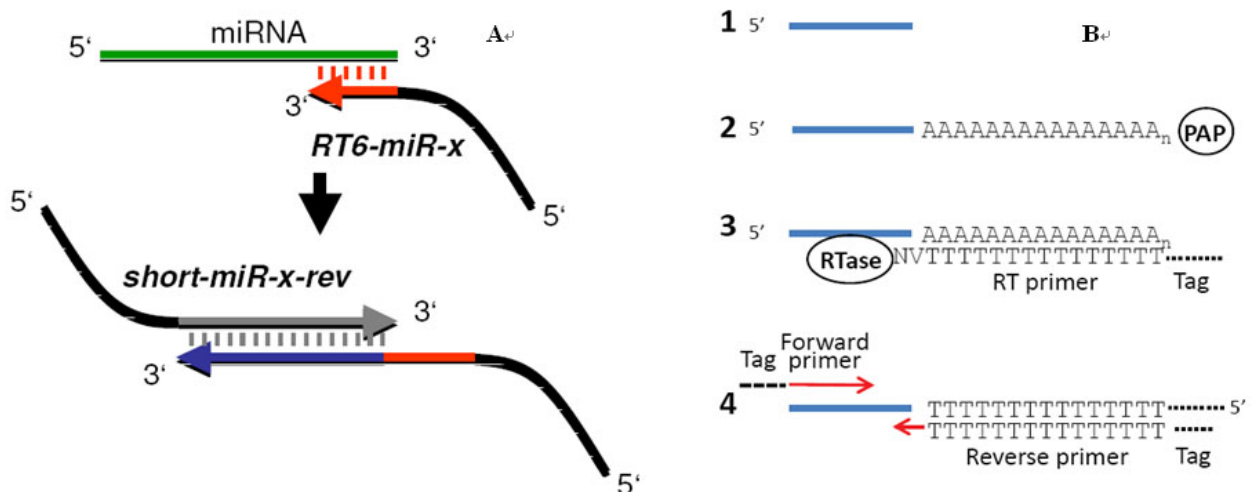


图1A miR-Q技术原理；图1B Peter改良的miR-Q技术原理

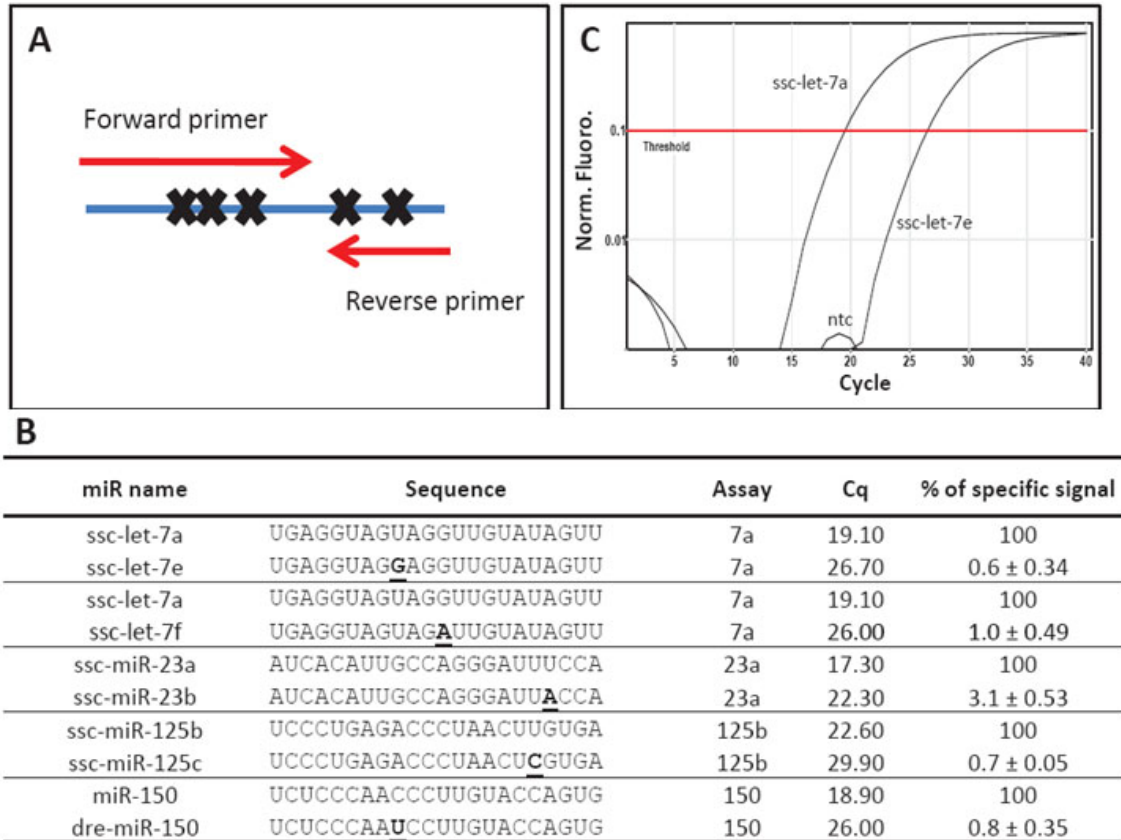


图2：能够有效的区分相似度很高的miRNAs

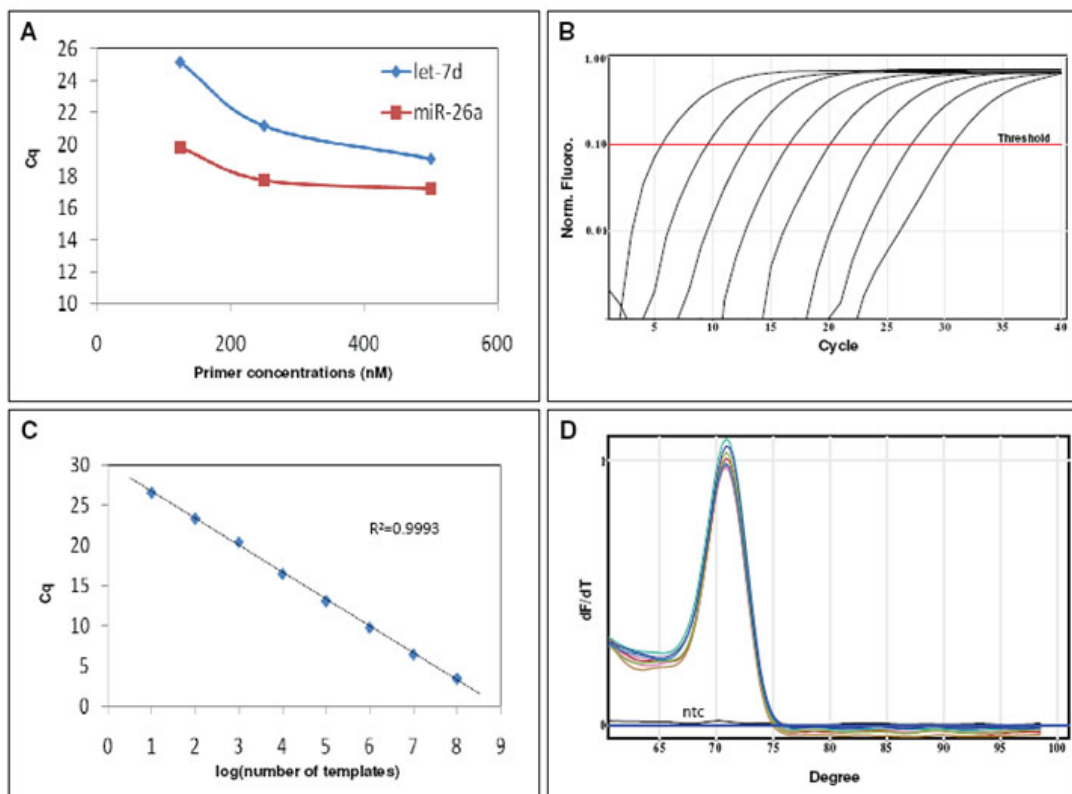


图3：高效的扩增miRNAs

HaiGene优化的miRNA定量方案是在Peter改良的技术方法基础上建立起来的，包括三部分：高效提取miRNA、通过加A法反转录获得miRNA的cDNA、应用SYBR Green染料法对获得的cDNA产物进行Real-Time PCR扩增。采用该实验方案进行miRNA表达研究结果可靠、操作简便、重复性高、耗时短、费用低，操作流程如图4所示。下面将该方案的使用特点和方法进行详细阐述。

流程图

优势

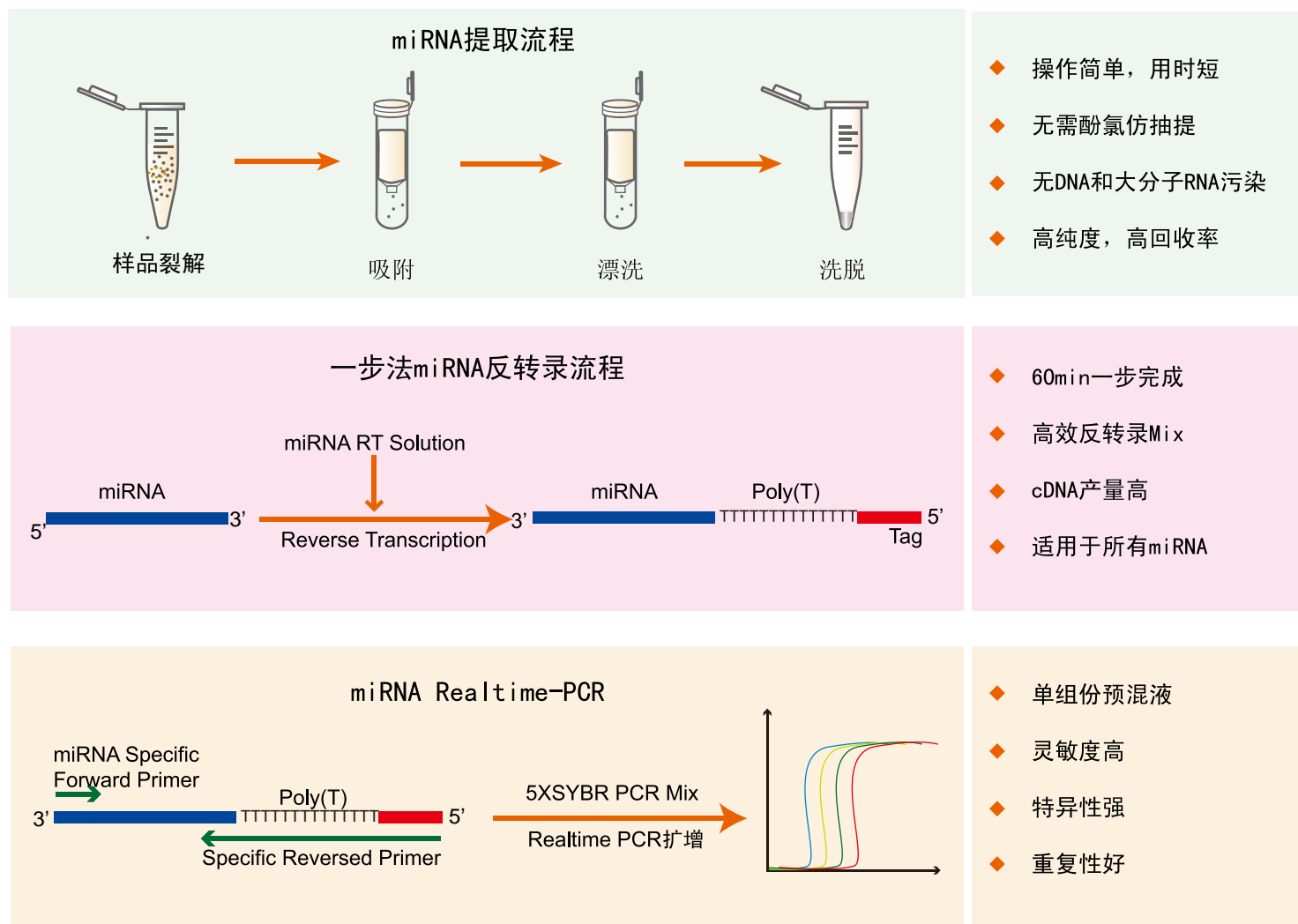


图4： HaiGene优化的miRNA qRealTime PCR定量方案

一、miRNA的提取

核酸的提取是研究过程中的第一步、是实验的基础。核酸提取的成功与否、提取质量的好坏对后续实验起着至关重要的作用。获得良好的实验材料，后续的实验将事半功倍，这一步马虎不得。使用TRizol试剂提取总RNA，对总RNA中包含的部分小RNA进行研究，该方法的缺点是总RNA中microRNA的比例较小，同时由于mRNA的干扰，会导致后续反转录和RealTime PCR实验效率很低，很难获得理想的实验结果，而且结果并不可靠。

HaiGene公司研发团队在探索miRNA分子功能的过程中，开发出一套全新的miRNA提取方案。可直接从细胞、组织、全血等材料中提取纯度高达97%的miRNA（15-200nt），并且其提取过程中可获得更多的小分子miRNA，少量的样品即可获得理想的实验结果。更为重要的是，采用该方法获得的miRNA丢失少，从而更能获得样本中miRNA的真实表达量。

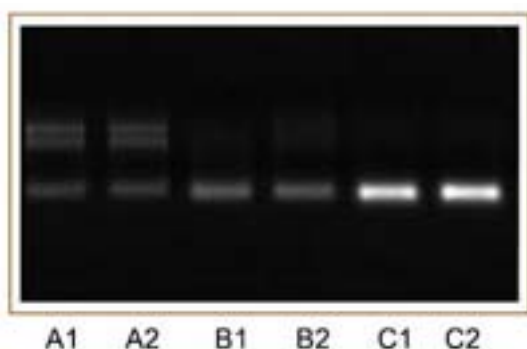


图5：分别用TRizol试剂、miRNA提取试剂盒和A公司的miRNA提取试剂提取小鼠肌肉组织的小RNA。A1-A2:TRizol试剂；B1-B2:A公司miRNA提取试剂盒；C1-C2:海基miRNA提取试剂盒（货号：B1802）。

1.采用HaiGene快速组织细胞miRNA提取试剂盒提取组织样本小RNA【HaiGene, Cat.No.:B1802】

- (1) 向1.5ml EP管中加入300 μ l miRNA Reagent A。植物组织则再加入10 μ l β -巯基乙醇，混合均匀。
- (2) 在液氮条件下充分将组织研磨粉碎，将一定的样品量研磨成粉状的组织加入到上述300 μ l miRNA Reagent A中，立即手腕用力震荡至组织粉末彻底溶解于裂解液中。室温静置5min以充分裂解细胞。
- (3) 向上述裂解完毕的裂解液中加入350 μ l miRNA Reagent B，上下颠倒混合均匀。13,000rpm离心5min，吸取550 μ l上清液，转移到新的1.5ml EP管中。
- (4) 向上述溶液中加入200 μ l无水乙醇，手腕用力震荡数次，室温放置5min。
- (5) 13,000rpm离心10min，转移700 μ l上清液到新的1.5ml EP管中。
- (6) 向上述溶液中加入300 μ l异丙醇，手腕用力上下颠倒数次。
- (7) 分两次将上述溶液倒入到miRNA吸附柱中，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (8) 向吸附柱中加入700 μ l 75%异丙醇洗涤一次，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (9) 向吸附柱中加入500 μ l 无水乙醇洗涤一次，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (10) 吸附柱13,000rpm空离心2min，去掉残留的乙醇。
- (11) 将吸附柱放入到新1.5ml EP管中，室温放置2min，使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入30 μ l RnaseFree TE Buffer，室温静置2min，13,000rpm离心2min，洗脱产物即为提取的miRNA。（通常取1~2 μ l该产物，即可使用海基一步法miRNA反转录试剂盒进行反转录反应，货号：D1801）。

2.采用HaiGene快速组织细胞miRNA提取试剂盒提取细胞样本小RNA【HaiGene, Cat.No.:B1802】

- (1) 贴壁细胞：胰酶消化细胞后，离心收集细胞沉淀。用100 μ l 1 \times PBS重悬细胞后，加入300 μ l miRNA Reagent A颠倒混合均匀，室温放置5min。
- (2) 悬浮细胞：直接离心后，收集细胞沉淀。用100 μ l 1 \times PBS重悬细胞后，加入300 μ l miRNA Reagent A颠倒混合均匀，室温放置5min。
- (3) 向上述裂解完毕的裂解液中加入250 μ l miRNA Reagent B，上下颠倒混合均匀。13,000rpm离心5min，吸取550 μ l上清液，转移到新的1.5ml EP管中。

注意：加入细胞体积数与miRNA Reagent B总体积数为350 μ l。如加入50 μ l细胞，则miRNA Reagent B使用300 μ l。

- (4) 向上述550 μ l上清溶液中加入200 μ l无水乙醇，手腕用力震荡数次，室温放置5min。
- (5) 13,000rpm离心10min，转移700 μ l上清液到新的1.5ml EP管中。
- (6) 向上述溶液中加入300 μ l异丙醇，手腕用力上下颠倒数次。
- (7) 分两次将上述溶液倒入到miRNA吸附柱中，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (8) 向吸附柱中加入700 μ l 75%异丙醇洗涤一次，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (9) 向吸附柱中加入500 μ l 无水乙醇洗涤一次，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (10) 吸附柱13,000rpm空离心2min，去掉残留的乙醇。
- (11) 将吸附柱放入到新1.5ml EP管中，室温放置2min，使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入30 μ l RnaseFree TE Buffer，室温静置2min，13,000rpm离心2min，洗脱产物即为提取的miRNA。（通常取1~2 μ l该产物，即可使用海基一步法miRNA反转录试剂盒进行反转录反应，货号：D1801）。

3. 采用HaiGene快速全血miRNA提取试剂盒提取血液样本小RNA【HaiGene, Cat.No.:B1803】

- (1) 向1.5ml EP管中加入300 μ l miRNA Reagent A。将150 μ l抗凝全血加入到上述300 μ l miRNA Reagent A中，立即手腕用力震荡混合均匀。室温静置5min以充分裂解细胞。
- (2) 向上述裂解完毕的裂解液中加入250 μ l miRNA Reagent B，上下颠倒混合均匀。13,000rpm离心5min，吸取550 μ l上清液，转移到新的1.5ml EP管中。
- (3) 向上述溶液中加入200 μ l无水乙醇，手腕用力震荡数次，室温放置5min。
- (5) 13,000rpm离心10min，转移700 μ l上清液到新的1.5ml EP管中。
- (6) 向上述溶液中加入300 μ l异丙醇，手腕用力上下颠倒数次。
- (7) 分两次将上述溶液倒入到miRNA吸附柱中，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (8) 向吸附柱中加入700 μ l 75%异丙醇洗涤一次，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (9) 向吸附柱中加入500 μ l 无水乙醇洗涤一次，13,000rpm离心1min，倒掉过滤液。
- (10) 吸附柱13,000rpm空离心2min，去掉残留的乙醇。
- (11) 将吸附柱放入到新1.5ml EP管中，室温放置2min，使残留乙醇挥发。在吸附柱滤芯上加入30 μ l RnaseFree TE Buffer，室温静置2min，13,000rpm离心2min，洗脱产物即为提取的miRNA。（通常取3~5 μ l该产物，即可使用海基一步法miRNA反转录试剂盒进行反转录反应，货号：D1801）。

二、通过加A法microRNA反转录试剂盒获得cDNA【HaiGene, Cat.No.: D1801】

HaiGene公司开发出一套全新的一步法miRNA反转录试剂盒，基于Peter改良的miR-Q技术，可以对成熟的miRNA同时完成加A反应和反转录反应，直接获得含有特异性tag和15(T)的cDNA产物（如图5所示）。该方法使得miRNA反转录和mRNA的反转录一样轻松。直接将提取的miRNA与反应缓冲液混合物，混合并置于PCR仪上1小时即可获得高浓度的、包含所有miRNAs分子的cDNA产物。获得的cDNA产物可以直接使用HaiGene优化的HG miRNA荧光定量PCR试剂盒进行定量检测，原理如下图。



图6: miRNA反转录试剂盒原理图例

miRNA反转录至第一链cDNA操作步骤:

按以下组分配制反转录反应液

*miRNA	0.01~0.1 µg (通常1~4 µl)
4×One step miRNA RT Solution	5 µl
10×miRNA RT Primer	2 µl
Rnase Free H ₂ O	Up to 20 µl

*注意: 使用总RNA作为反转录模板时, 可使用0.1~2 µg。通常总RNA反转录效果要差于使用纯度较高的miRNA, 不建议使用总RNA作为反转录模板。

在PCR仪上按以下条件进行反转录反应:

37°C	60min
95°C	5min

三、通过HG SYBR Green miRNA荧光定量PCR试剂盒进行定量检测 【HaiGene, Cat.No.: APXXXXX】

HaiGene的HG SYBR Green miRNA荧光定量PCR试剂盒, 包含SYBR Green定量试剂和特异性的上下游引物检测对, 每一对引物都是经过人工优化, 确保扩增效率和特异性。HaiGene的HG SYBR Green miRNA荧光定量PCR试剂盒共有一万余种, 试剂盒编号为PXXXXX, 每一个miRNA分子对应一个检测试剂盒, 可于[HG SYBR Green miRNA qPCR kit.xls](#)中查询。如果您研究的miRNA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。内参基因可选择使用内参基因荧光定量PCR试剂盒, 按下表进行选择。

常用内参HG miRNA荧光定量PCR试剂盒

内参名称	试剂盒货号	适用物种
RNU6B	AP01501	组织和细胞
miR-16	AP01511	全血

注: (1) 其它miRNA荧光定量检测试剂盒请于[HG SYBR Green miRNA qPCR kit.xls](#)中查询。

(2) HaiGene miRNA荧光定量PCR试剂盒提供的扩增引物均为10µM, 每20µl反应体系中加入0.4-0.8µl。

1. 配制反应体系

根据机型选择步骤A或B

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 PRISM7000/7700/7900HT，7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems); Mx3000P (Stratagene)等。

按照如下组分配制20 μ l PCR反应体系：

		终浓度
5 \times Golden HS SYBR Green qPCR Mix	4 μ l	1 \times
50 \times ROX Reference Dye	0.4 μ l	1 \times
PCR Forward Primer(10 μ M)	0.4-0.8 μ l	
PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.4-0.8 μ l	
cDNA模板	1~2.5 μ l	
ddH ₂ O	Up to 20 μ l	

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、MyiQ 2、CFX96 Real-Time PCR(Bio-Rad & MJ); Line-Gene(Bioer, 杭州博日)等。按照如下组分配制20 μ l PCR反应体系：

		终浓度
5 \times Golden HS SYBR Green qPCR Mix	4 μ l	1 \times
PCR Forward Primer(10 μ M)	0.4-0.8 μ l	
PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.4-0.8 μ l	
cDNA模板	1~2.5 μ l	
ddH ₂ O	Up to 20 μ l	

2. 进行Real-Time PCR反应

通常采用两步法，程序如下：

Stage 1: 95 $^{\circ}$ C 15min

Stage 2: 95 $^{\circ}$ C 5s

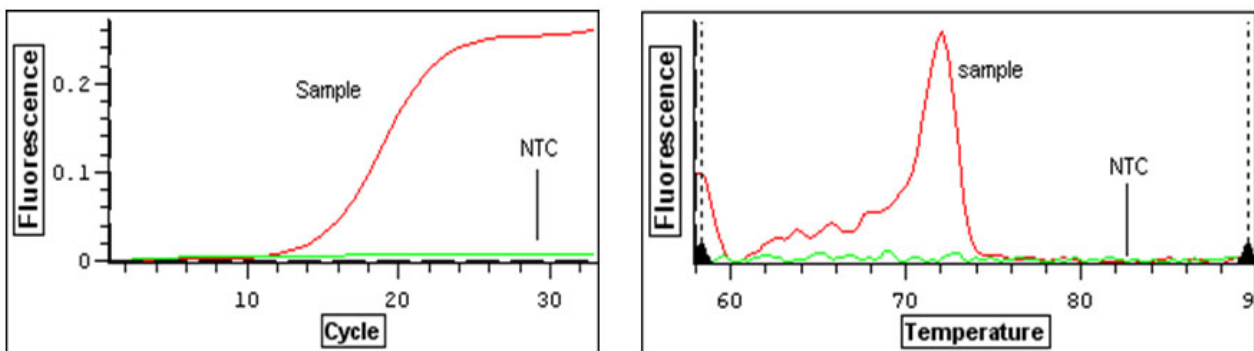
60 $^{\circ}$ C 30s 30~40 cycles

Stage 3: Dissociation analysis

如采用两步法扩增效率较低可改用三步法进行反应，程序如下：

- Stage 1: 95°C 15min
- Stage 2: 95°C 5s
 55°C 5s
 70°C 30s 30~40 cycles
- Stage 3: Dissociation analysis

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。



参考文献

- [1] miR-Q: a novel quantitative RT-PCR approach for the expression profiling of small RNA molecules such as miRNAs in a complex sample. *BMC Mol Biol.* 2008. PMC2374797.
- [2] Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol.* 2011. PMC3135530.
- [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.
- [12] Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. *J Anim Sci Biotechnol*. 2012 PMID:22958414.

Material and Methods for miRNA extraction and qPCR

The miRNA was extracted from the tissue or cell samples using miRNA Extraction Kit (HaiGene, Harbin, China) according to manufacturer's protocol. To investigate the miR-21 expression level in tissue samples, cDNA synthesis was carried out according to the protocol of One Step miRNA cDNA Synthesis Kit(HaiGene, Harbin, China), in which poly(A) tailing of the miRNAs is followed by reverse transcription with a tagged poly(T) primer described by Balcells et al [2]. Briefly, the reaction mix (20 μ l) consisting of 100 ng of miRNA, 5 μ l of 4 \times One step miRNA RT Solution and 2 μ l of 10 \times miRNA RT Primer was incubated at 37 $^{\circ}$ C for 1 hour followed by enzyme inactivation at 95 $^{\circ}$ C for 5 minutes. Quantification of miRNA was performed by HG miRNA SYBR Green PCR Kit(HaiGene, Harbin, China) . RealTime PCR was performed in 20 μ l with 1 μ l of cDNA, 1 of each primer, and 4 μ l of Golden HS SYBR Green qPCR Mix under the following conditions:95 $^{\circ}$ C for 15min, 35 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 5s, and 60 $^{\circ}$ C for 30s in LightCycler 480 (Roche). MiR-21 levels were normalized to U6B RNA levels using the $2^{-\Delta Ct}$ model. Real-time PCR assays were performed in duplicate for each sample, and the mean value was used for the calculation of miRNA expression levels. The statistical analyses were done using Microsoft Excel (Microsoft) both to calculate the SD and to test for statistically significant differences between the samples using a T test. A value $P < 0.05$ was considered statistically significant.