

GenePharma

U6 snRNA Real-time RT-PCR Normalization Kit

**For the normalization and profiling of miRNAs
expression using real-time PCR method.**

User Manual

B004-V003B-20210719

介绍

产品简介

miRNA是动植物、病毒编码的由19-23个碱基组成的单链小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。

U6 snRNA在剪接体的装配以及催化mRNA剪接的过程中会经历主要的构象变化，它会结合特异蛋白Prp24p和一套7个LSm2p-8p蛋白来形成U6小核糖核蛋白复合体。而该剪接复合体在真核细胞中参与mRNA前体的剪接。

U6 snRNA荧光定量校正试剂盒是一种灵敏特异的方法，能够校正及对总RNA样品中各个miRNA做整体的表达分析。用户可以使用U6 snRNA荧光定量校正试剂盒在不同的样品间将特定的microRNA相对于U6 snRNA的表达比率标准化。

用本试剂盒进行荧光定量相对校正实验包括两步，U6 snRNA逆转录反应和实时定量PCR反应。

相对定量的计算基础

microRNA表达的相对定量是由实验中得到的阈值循环数（Ct）计算而来。阈值循环数是指在这一个循环时， ΔRn 出现具有统计学意义的增长并且第一次被检测到。这样，在PCR反应时，含有更高初始模板浓度的样品就会比低模板浓度的样品更早到达检测阈值，并得到一个更小的阈值循环数。

一次理想的microRNA定量实验中，PCR反应的每个循环中，产物都会成倍增长。因此阈值循环数每相差1个单位就等于2倍的初始模板浓度的差距。例如，如果Ct值增加了1个单位，那么初始模板浓度就减少一倍；如果Ct值减少一个单位，那么就说明初始模板浓度增加了一倍。因此这种属性被应用于计算目标基因和内参基因之间表达的相对定量值。更多信息请参照手册中数据分析部分。

组分和保存

U6 snRNA 荧光定量校正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 (10 mM)	40 µl	80 µl	160 µl	400 µl	-20℃
MMLV Reverse Transcriptase (200 U/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℃
U6 snRNA RT primer (10 µM)	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	4℃
U6 snRNA specific primer Set (10 µM)	20 µl	40 µl	80 µl	200 µl	4℃
miRNA specific probe (10 µM) 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 (5 U/µl)	10 µl	20 µl	40 µl	100 µl	-20℃
RNase free H ₂ O	2× 1.5 ml	2× 1.5 ml	4× 1.5 ml	10× 1.5 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SYBR Green 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. U6 snRNA specific probe (10µM) 为探针法试剂盒专有的TaqMan探针。 **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× (0.4µl); 需要使用高浓度ROX Reference Dye 校正的仪器有 Applied Biosystems Step One Plus Real-Time PCR System 和 QuantStudio 系列, 配套 ROX 终浓度为5× (2µl)。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

1. 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，针对本试剂盒，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，如果逆转录酶为客户自购，以说明书为准。



NOTE

1. 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。

2. 配制 U6 snRNA 逆转录反应体系

下表提供的20 μl 逆转录反应体系混合其他试剂

Component	Final Con.	Vol/1 rxn
5 $\times$ RT buffer	1 $\times$	4 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)	40 U	0.2 μl
RNA Sample ³	1 μg	X μl
RNase Free H_2O		To 20 μl ⁴

¹ 可单独或混合逆转录miRNA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 $^{\circ}\text{C}$ 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20 μl 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和逆转录 mix 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，请勿使用振荡器。

3. U6 snRNA和miRNA共用逆转录程序

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. U6 snRNA和 miRNA 逆转录产物的操作

混匀cDNA并且从中吸取2 μl（20 μl体系）作为定量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，此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℃。

5. 定量 PCR 反应 mix 制备

- 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；
- 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；
- 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 ¹	Final Con.	Vol/1 rxn
2× Real-time PCR Master Mix (SYBR)	1×	10 μl
U6 snRNA specific Primer set (10 μM) ¹	0.2 μM	0.4 μl
Rox Reference Dye (50×)	1× or 5×	0.4 μl / 2 μl
cDNA		2 μl
rTaq DNA polymerase (5 U/μl)	1 U	0.2 μl
RNase free H ₂ O		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 rxn
2×Real-time PCR Master Mix	1×	10 μl
U6 snRNA specific Primer set (10 μM) ¹	0.2 μM	0.4 μl
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 / 2μl
cDNA		2 μl
rTaq DNA polymerase (5 U/μl)	1 U	0.2 μl
RNase free H ₂ O		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0.1-0.5 μM 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的精心验证，具体条件可以质检报告所述条件为参考。

6. U6 snRNA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。

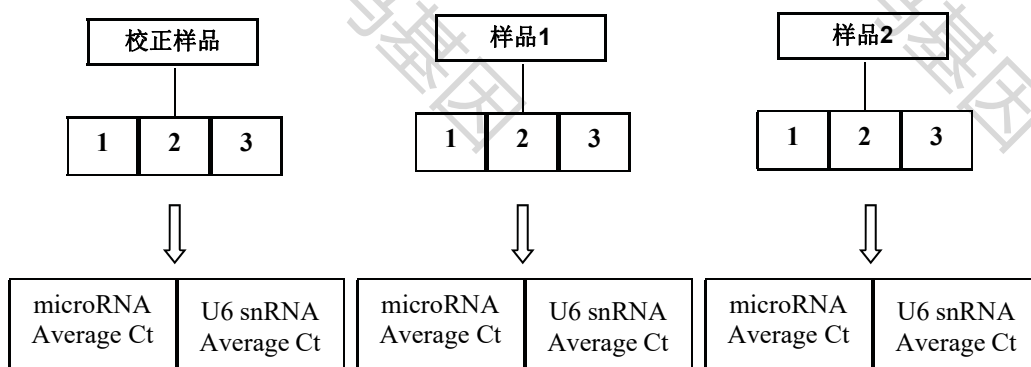
2. 用U6 snRNA作为标准化内参

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 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	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

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

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

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

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
 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 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
Average Ct	17.00	25.42	17.01	24.95	16.85	25.83
ΔCt	-	8.43	-	7.94	-	8.98
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	- 0.49	-	0.55

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

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
$\Delta\Delta\text{Ct}$	-	0.00	-	- 0.49	-	0.55
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$	-	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：86-21-51320295

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 in-tended for any animal or human.

