

**GenePharma**

# **Hairpin-it™ microRNA and U6 snRNA Normalization RT-PCR Quantitation Kit**

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

**Catalog No. E22001-E22010**

**User Manual**

B004-V004C-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-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。

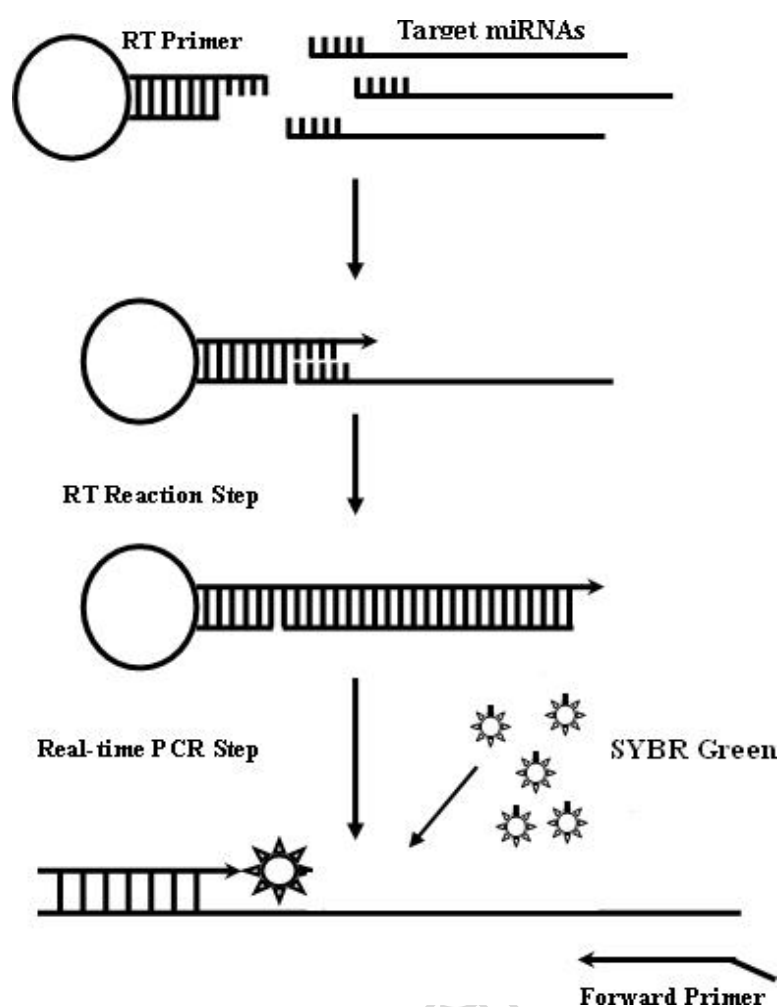


图1. Hairpin-it™ miRNAs实时定量检测原理

## 组分和保存

Hairpin-it™ miRNA定量和U6校准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 <sup>1</sup>     | 1 ml         | 2× 1 ml      | 4× 1 ml       | 10× 1 ml    | 4℃      |
| miRNA RT primer (10 µM)                      | 10 µl        | 20 µl        | 40 µl         | 100 µl      | 4℃      |
| miRNA specific primer Set (10 µM)            | 20 µl        | 40 µl        | 80 µl         | 200 µl      | 4℃      |
| miRNA specific probe (10 µM) <sup>2</sup>    | 20 µl        | 40 µl        | 80 µl         | 200 µl      | 4℃      |
| U6 snRNA specific 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℃      |
| U6 snRNA specific probe (10 µM) <sup>2</sup> | 20 µl        | 40 µl        | 80 µl         | 200 µl      | 4℃      |
| ROX reference dye (50×) <sup>3</sup>         | 40 µl/200 µl | 80 µl/400 µl | 160 µl/800 µl | 400 µl/2 ml | 4℃      |
| rTaq DNA polymerase (5 U/µl)                 | 20 µl        | 40 µl        | 80 µl         | 200 µl      | -20℃    |
| Synthetic miRNA Standard                     | 1 pmol       | 1 pmol       | 1 pmol        | 1 pmol      | -20℃    |
| RNase free H <sub>2</sub> O                  | 3× 1.5 ml    | 3× 1.5 ml    | 6× 1.5 ml     | 15× 1.5 ml  | 4℃      |
| 1× RNA Dilution buffer                       | 1 ml         | 1 ml         | 1 ml          | 1 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. 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× (0.4µl); 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

## 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  $\mu$ l 1 $\times$  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0.1 nM、10 pM、1 pM共4个梯度标准品。

绝对定量时各取2  $\mu$ l标准品溶液至逆转录体系（20  $\mu$ l）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 $6\times 10^7$ 、 $6\times 10^6$ 、 $6\times 10^5$ 、 $6\times 10^4$ 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  $\mu$ M的贮存液，针对本试盒，使用时稀释10倍成1  $\mu$ M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  $\mu$ M 10  $\mu$ l）和目标 miRNA 逆转录引物（eg. 10  $\mu$ M 10  $\mu$ l）混合，一起稀释10倍成1  $\mu$ M逆转录引物工作液（eg. 加80  $\mu$ l Rnase free H<sub>2</sub>O），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20 $\mu$ l 逆转录反应加样量体系

| Component                                                | Final Con.     | Vol/1 rxns                 |
|----------------------------------------------------------|----------------|----------------------------|
| 5 $\times$ RT buffer                                     | 1 $\times$     | 4.00 $\mu$ l               |
| dNTP (10 mM)                                             | 0.375 mM       | 0.75 $\mu$ l               |
| U6 snRNA/ miRNA RT primers (1 $\mu$ M) <sup>1</sup>      | 60 nM          | 1.20 $\mu$ l               |
| RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ l) <sup>2</sup>             | 0.5 U/ $\mu$ l | 0.25 $\mu$ l               |
| MMLV Reverse Transcriptase (200 U/ $\mu$ l) <sup>3</sup> | 40 U           | 0.20 $\mu$ l               |
| RNA Sample <sup>3</sup>                                  | 1-3 $\mu$ g    | X $\mu$ l                  |
| RNase Free H <sub>2</sub> O                              |                | To 20 $\mu$ l <sup>4</sup> |

<sup>1</sup> 可单独或混合逆转录miRNA和U6;

<sup>2</sup> RNase inhibitor 为非必需试剂, 请客户自备;

<sup>3</sup> RNA 模板量可以根据实验的需要从1 $\mu$ g 到3  $\mu$ g 或者更多;

<sup>4</sup> 除了在 42 $^{\circ}$ 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 $\mu$ l 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. U6 snRNA 和 miRNAs共用逆转录程序

标准的逆转录反应程序:

26 $^{\circ}$ C 40 分钟, 42 $^{\circ}$ C 40 分钟, 85 $^{\circ}$ C 10 分钟, 4 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C 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 $\mu$ l (20 $\mu$ l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 $^{\circ}$ C, 三天内可保持稳定, 长期保存请冻存于-80 $^{\circ}$ C。

### 三、荧光定量PCR(qPCR)实验

#### 1. 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                                               | Final Con. | Vol/1 rxns    |
|---------------------------------------------------------|------------|---------------|
| 2×Real-time PCR Master Mix (SYBR)                       | 1×         | 10 µl         |
| miRNA/U6 snRNA specific Primer set (10 µM) <sup>1</sup> | 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 <sub>2</sub> O                             |            | 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 (10µM) <sup>1</sup> | 0.2 µM        | 0.4 µl        |
| miRNA/U6 snRNA specific Probe (10µM) <sup>2</sup>      | 0.1 µM-0.2 µM | 0.2 µl-0.4 µl |
| ROX reference dye (50×)                                | 1× / 5×       | 0.4 µl / 2µl  |
| rTaq DNA polymerase (5 U/µl)                           | 1 U           | 0.2 µl        |
| cDNA                                                   |               | 2 µl          |
| RNase free H <sub>2</sub> O                            |               | Up to 20 µl   |



#### NOTE

<sup>1</sup>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；

<sup>2</sup>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；

## 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。

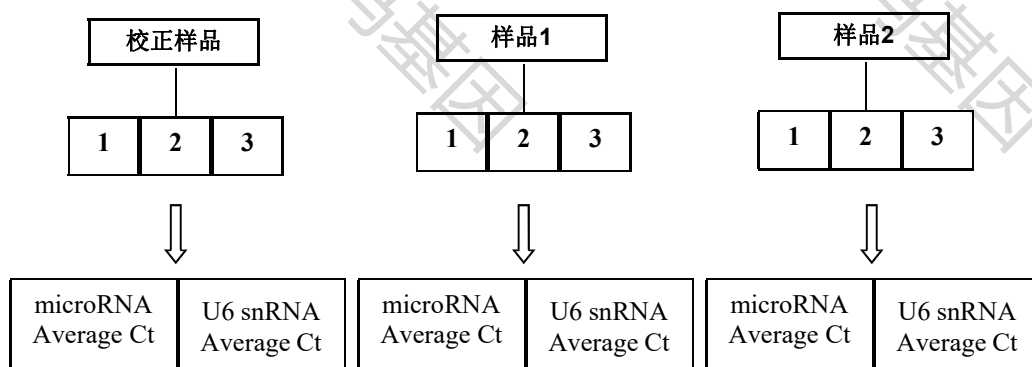
## 2. 用U6 snRNA作为标准化内参

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 $\Delta Ct$ 。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      |

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

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  $\Delta\text{Ct}$  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      |
| $\Delta\text{Ct}$ | -        | 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  $\Delta\text{Ct}$  值减去校  
正样品的  $\Delta\text{Ct}$  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      |
| $\Delta\text{Ct}$       | -        | 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      |
| $\Delta\text{Ct}$            | -        | 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：86-21-51320195

E-mail: [service@genepharma.com](mailto:service@genepharma.com)

网址: [www.genepharma.com](http://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](mailto:szservice@genepharma.com)

网址: [www.genepharma.com](http://www.genepharma.com)

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

