

描述：由于 miRNAs 分子序列较小，仅 20nt 左右，没有真核生物特有的 Poly(A)尾巴结构，采用传统 Oligo dT 引物和随机引物很难获得从 miRNA 到 cDNA 的反转录产物。HaiGene 公司开发出一套全新的加 A 法 miRNA 反转录试剂盒，基于 Peter 改良的 miR-Q 技术【参考文献 1】，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 1 所示）。该方法使得 miRNA 反转录与 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 产物适用于 HG miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒进行定量检测，该方法已被大量文献所采用【参考文献 2~12】。

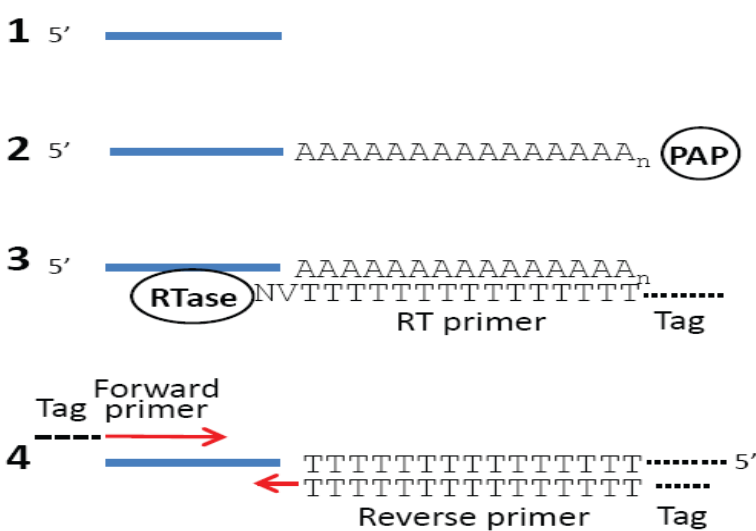


图 1：Peter 改良 miR-Q 检测原理图

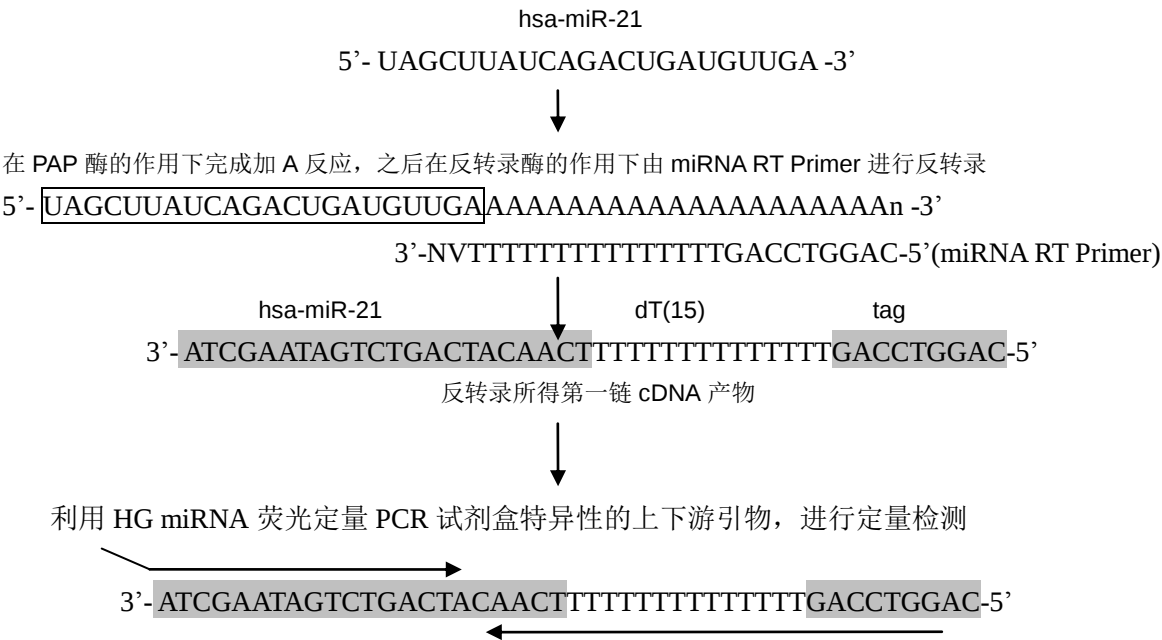


图 2：hsa-miR-21 实例设计原理

组分

名称	D1801A (25T×20 μl)	D1801B (100T×20 μl)
4×One step miRNA RT Solution	125 μl	500 μl
10×miRNA RT Primer	50 μl	200 μl
RNase Free H ₂ O	1 ml	1 ml × 2

注意：如 4×One step miRNA RT Solution 出现沉淀属正常现象，可用手捂化，混合均匀后使用不影响实验结果。

储存：请置于-20℃，可保存 2 年；避免反复冻融

操作方法

1. 按以下组分配制反转录反应液

miRNA (0.01-0.1 μg) or Total RNA	0.1-2 μg
4×One step miRNA RT Solution	5 μl
*10×miRNA RT Primer	2 μl
Rnase Free H ₂ O	Up to 20 μl

*特别说明：10×miRNA RT Primer 引物为

5'-CAGGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'，定量扩增用特异性上下游引物进行扩增，图 2 是以 hsa-miR-21 为实例说明特异性上下游引物的设计方法（HaiGene 的 HG miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒提供所有 miRNA 检测，货号 APXXXXX，所有引物均经过设计优化，详细请于列表 [HG miRNA qPCR kit.xls](#) 中查询。如果您研究的 miRNA 分子不在列表中，请来信咨询，我们将及时给您优化设计）。

2. 在 PCR 仪上按以下条件进行反应：

37℃	60min
95℃	5min

3. 获得 cDNA 产物后使用 HG miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒进行 miRNA 定量检测。

使用该试剂盒反转录所得 cDNA 产物包含了样品中所有 miRNA 反转录产物，可用于多个基因的检测分析，可使用内参基因进行定量校正。内参基因可选择使用 RNU6B miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒(货号：AP01501)，适用于

来源于人和鼠等哺乳动物的样品；RNU44 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒(货号：AP01502)、RNU48 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒(货号：AP01503)，适用于来源于人的样品；SnoRNA135 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒(货号：AP01504)、SnoRNA202 miRNA 荧光定量 PCR 试剂盒(货号：AP01505)适用于来源于鼠的样品。HaiGene 提供的内参扩增引物浓度均为 10μM，每 20μl 反应体系中加入 0.4-0.8μl。

根据机型选择步骤 A 或 B，配制反应体系

A: 需要添加 ROX 染料进行反应孔间信号校正的 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 μl PCR 反应体系：

		终浓度
5×Golden HS SYBR Green qPCR Mix	4 μl	1×
50×ROX Reference Dye	0.4 μl	1×
*PCR Forward Primer(10μM)	0.4-0.8 μl	
*PCR Reverse Primer(10μM)	0.4-0.8 μl	
cDNA 模板	1~2.5 μl	
ddH ₂ O	Up to 20 μl	

*:引物初次使用请用 0.4 μl，视实验结果进行调整。

B:无需添加 ROX 染料进行反应孔间信号校正的 Real-Time PCR 仪，包括：LightCycler (Roche Diagnostics); MiniOpticon、Opticon2、MylQ 2、CFX96 Real-Time PCR(Bio-Rad & MJ); Line-Gene(Bioer, 杭州博日)等。按照如下组分配制 20μl PCR 反应体系：

		终浓度
5×Golden HS SYBR Green qPCR Mix	4 μl	1×
*PCR Forward Primer(10μM)	0.4-0.8 μl	
*PCR Reverse Primer(10μM)	0.4-0.8 μl	
cDNA 模板	1~2.5 μl	
ddH ₂ O	Up to 20 μl	

*:引物初次使用请用 0.4 μl，视实验结果进行调整。

4. 进行 Real-Time PCR 反应,

通常采用两步法, 程序如下:

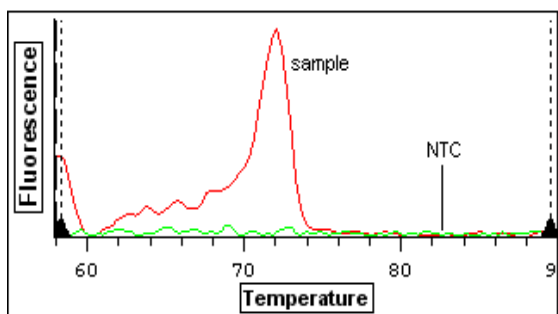
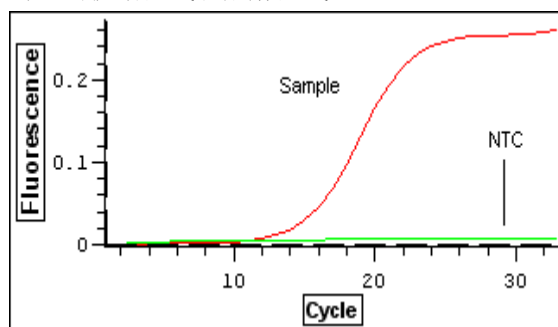
Stage 1:	95℃	15min
Stage 2:	95℃	5s
	60℃	30s 30cycles
Stage 3:	Dissociation analysis	

注意: 使用该方法通常可以准确检测到>0.01fM 的

microRNA 分子, 过多的循环数会造成精确性降低。推荐的循环数为 30 个, 在检测极低样品浓度时可将循环数调整到 35 个。

5. 扩增结果分析和数据处理

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] Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. BMC Biotechnol. 2011 Jun 25; 11: 70. PMC3135530.
- [2] Identification of circulating miRNA biomarkers based on global quantitative real-time PCR profiling. J Anim Sci Biotechnol. 2012 PMID:22958414.
- [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 transposon 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.