

# HaiGene TaqMan miRNA定量解决方案

## TaqMan miRNA qPCR Assay

—miRNA提取、反转录、RealTime PCR

第一步 miRNA的提取.....	1-4
组织样本miRNA提取 .....	2
细胞样本miRNA提取 .....	3
全血样本miRNA提取 .....	4
第二步 miRNA反转录(TaqMan miRNA反转录试剂盒).....	5-6
第三步 通过HG TaqMan miRNA定量PCR试剂盒检测microRNA.....	7-8
配制反应体系.....	7
进行Real-Time PCR反应.....	8
参考文献/英文材料与方法.....	9

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
D1802	HG TaqMan miRNA反转录试剂盒	25T/100T	800/2600
TAPxxxxx	HG TaqMan miRNA定量PCR试剂盒	100T×20μl	600



microRNA作为长度仅有20nt左右长度的小RNA，其在生物学过程中发挥重要的调控作用。现有研究表明其表达量的高低与疾病、生长发育等众多表型存在密切关系性。由于其长度短，采用传统mRNA检测的方法很难对其进行检测，因此选择一种结果可靠而操作又相对简单的检测方法非常必要。探针法做为microRNA定量研究的金标准，其高特异性、高灵敏度，是染料法（SYBR Green）不能比拟的。

HaiGene miRNA定量研究试验解决方案很大程度上解决了miRNA检测的各个环节的难点，采用本套miRNA定量研究方案可以像mRNA研究一样轻松，并获得绝佳的试验结果。HaiGene TaqMan miRNA定量研究试验解决方案包括三部分：快速microRNA提取试剂盒、TaqMan miRNA反转录试剂盒和TaqMan miRNA定量PCR试剂盒。

（1）**miRNA快速提取试剂盒**：独有的一步法miRNA提取技术，仅通过上柱、结合、洗脱即可获得高纯度的小RNA（<200nt），由该方法获得的小RNA尤其适合于miRNA的定量PCR试验。该试剂盒适用于动物、植物、细胞、全血等样本的小RNA提取。

（2）**TaqMan miRNA反转录试剂盒**：操作简单，仅需两步即可完成miRNA cDNA的合成。同时，采用加A法进行miRNA的反转录，其转录效率远高于茎环法，因此可极大的提高检测灵敏度。

（3）**TaqMan miRNA定量PCR试剂盒**：采用FAM标记TaqMan探针和特异性上游引物进行miRNA定量检测，有效的确保了扩增的高特异性和高灵敏度。

## 一、microRNA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快速microRNA提取试剂盒仅需要裂解、上柱、洗涤、洗脱步骤即可获得高纯度microRNA分子，提取的microRNA分子不含大RNA，操作过程中无需额外的去除大RNA的步骤。通常获得的microRNA分子在15~200nt（纯度>98%），可直接用于后续的反转录和定量试验。该试剂盒可用于动

植物组织、细胞、全血样品的microRNA提取，其中快速组织细胞miRNA提取试剂盒（货号：B1802）适用于动植物组织和细胞样品，快速全血miRNA提取试剂盒（货号：B1803）适用于全血样品。

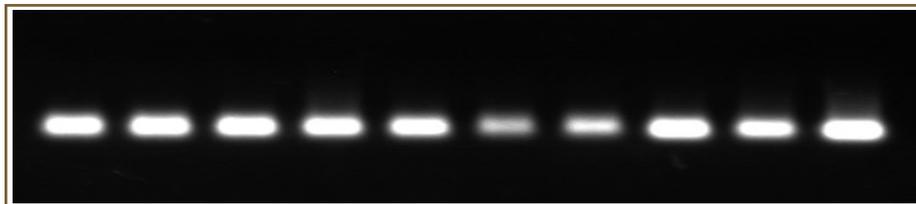


图1：应用快速组织细胞miRNA提取试剂盒（B1802）提取人胃组织的小RNA。琼脂糖凝胶电泳，每个泳道上样量为3 $\mu$ l。

## 1. 组织、细胞样品microRNA的提取（快速组织细胞miRNA提取试剂盒，Cat. No: B1802）

样本使用量及小RNA产量

样品类型	样品量	小RNA产量
动物组织（肝脏、脾脏、肾脏等）	5~20 mg	2~20 $\mu$ g
动物组织（骨骼肌、心肌）	10~30 mg	1~10 $\mu$ g
动物组织（脑、皮肤）	10~30 mg	1~5 $\mu$ g
植物组织（多糖多酚含量不高的）	10~30 mg	2~10 $\mu$ g
细胞	$0.5 \times 10^6 \sim 10^7$ 个	1~10 $\mu$ g

### 1.1 组织样本microRNA的提取

(1) 向1.5ml EP管中加入300 $\mu$ l miRNA Reagent A。植物组织则再加入10 $\mu$ l  $\beta$ -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（见样本使用量表）研磨成粉状的组织加入到上述300 $\mu$ 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。

注意：将组织加入到miRNA Reagent A后要迅速将组织震散，否则易引起组织成团状，不容易裂解。如发生成团状，务必用移液器将团状组织吹打松散。

(3) 向上述裂解完毕的裂解液中加入350 $\mu$ l miRNA Reagent B，上下颠倒混合均匀。13,000rpm离心5min，吸取550 $\mu$ l上清液，转移到新的1.5ml EP管中。

- (4) 向上述溶液中加入200 $\mu$ 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 $\mu$ l上清液到新的1.5ml EP管中。
- (6) 向上述溶液中加入300 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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30~60 $\mu$ 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 $\mu$ l该产物，即可使用海基TaqMan miRNA反转录试剂盒进行反转录反应，货号：D1802）。

## 1.2 细胞样本提取

- (1) 贴壁细胞：胰酶消化细胞后，离心收集细胞沉淀。用100 $\mu$ l 1 $\times$ PBS重悬细胞后，加入300 $\mu$ 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 $\mu$ l 1 $\times$ PBS重悬细胞后，加入300 $\mu$ 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 $\mu$ l miRNA Reagent B，上下颠倒混合均匀。13,000rpm离心5min，吸取550 $\mu$ 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 $\mu$ l。如加入50 $\mu$ l细胞，则miRNA Reagent B使用300 $\mu$ l。

- (4) 向上述550 $\mu$ l上清溶液中加入200 $\mu$ 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 $\mu$ l上清液到新的1.5ml EP管中。
- (6) 向上述溶液中加入300 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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30~60  $\mu$ 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 $\mu$ l该产物, 即可使用海基TaqMan miRNA反转录试剂盒进行反转录反应, 货号: D1802)。

## 2. 全血样本的microRNA提取 (快速全血miRNA提取试剂盒, Cat. No: B1803)

- (1) 向1.5ml EP管中加入300 $\mu$ l miRNA Reagent A。将150 $\mu$ l抗凝全血加入到上述300 $\mu$ 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 $\mu$ l miRNA Reagent B, 上下颠倒混合均匀。13,000rpm离心5min, 吸取550 $\mu$ l上清液, 转移到新的1.5ml EP管中。
- (3) 向上述溶液中加入200 $\mu$ 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 $\mu$ l上清液到新的1.5ml EP管中。
- (6) 向上述溶液中加入300 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ 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 $\mu$ l该产物, 即可使用海基TaqMan miRNA反转录试剂盒进行反转录反应, 货号: D1802)。

## 3. microRNA提取常见问题汇总:

- (1) 本方法提取的小RNA, 95%以上为小RNA (<200nt), 有时会残留一些>200nt的RNA, 通常残留的>200nt RNA不影响后续试验操作。使用本试剂盒提取的microRNA不能用于mRNA的检测。
- (2) 本试剂盒提取的小RNA由于不含mRNA等大分子量的RNA, 因此更适合做后续反转录试验, 从而进行定量试验。
- (3) 使用本试剂盒提取的miRNA浓度通常在10ng/ $\mu$ l左右, 取5~10 $\mu$ l即可用于电泳检测。

## 二、microRNA反转录（TaqMan miRNA反转录试剂盒，Cat. No: D1802）

HaiGene的TaqMan miRNA反转录试剂盒专用于miRNAs分子的反转录试验，转录获得的cDNA产物用于TaqMan定量PCR方法检测miRNAs分子（仅适用HaiGene TaqMan miRNA定量PCR试剂盒，货号：TAPxxxxx）。

HaiGene TaqMan miRNA反转录试剂盒采用加A法进行反转录，加A法的反转录效率远高于茎环法，因此，采用该方法可极大的提高检测灵敏度（原理见下图）。该试剂盒操作简单，仅需要两步即可轻松完成miRNA的cDNA合成，合成的cDNA可用于所有miRNA的后续定量检测。反转录完毕后采用特异性的上游引物和接头引物进行PCR扩增，FAM标记特异性TaqMan探针作为荧光报告基团进行定量检测（原理见图1）。综上所述，HaiGene TaqMan miRNA解决方案综合了加A法反转录的高效性和探针法定量的高特异性，是miRNA定量研究的绝佳选择。

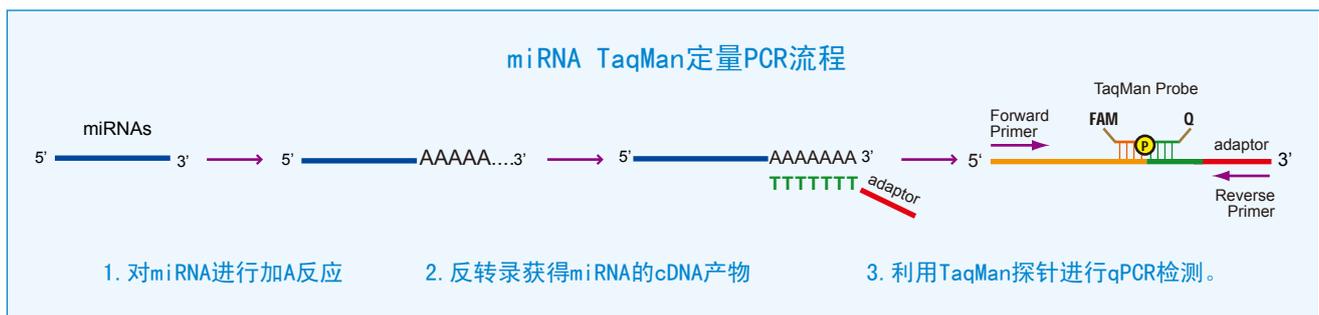


图2: miRNA TaqMan定量检测原理

### 操作方法和步骤

(1) 按以下组分在0.2ml EP管中配制应液

miRNA (5~100 ng/μl)	4 μl
5×TaqMan miRNA RT Solution A	1 μl

注意：不建议使用Total RNA，Total RNA试验结果通常差于miRNA。

(2) 在PCR仪上按以下条件进行加A反应:

37°C	30min
85°C	5min

(3) 反应完毕后，在上述5 $\mu$ l反应体系中加入如下试剂，并混合均匀。

10 $\times$ TaqMan miRNA RT Primer	2 $\mu$ l
10 $\times$ TaqMan miRNA RT Solution B	2 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	11 $\mu$ l

(4) 在PCR仪上按以下条件进行反转录反应:

30°C      5min

55°C      60min

95°C      5min

获得的cDNA产物可用于多个目标miRNA的检测。反转录完毕后获得的miRNA cDNA，可加入80 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O稀释5倍，通常取2 $\mu$ l即可用于HG TaqMan miRNA定量PCR试剂盒检测(货号：TAPXXXXX，该试剂盒多达一万余种)。

注意：内参基因可选择使用HG TaqMan RNU6B miRNA定量PCR试剂盒(货号：TAP01501)，适用于来源于人和鼠等哺乳动物的样品；HG TaqMan hsa-miR16 miRNA定量PCR试剂盒(货号：TAP01511)适用于来源于人全血样品。

### 三、通过HG TaqMan miRNA定量PCR试剂盒检测miRNA (HaiGene, Cat. No. : TAPxxxxx)

HaiGene的HG TaqMan miRNA定量PCR试剂盒，采用特异性的正向miRNA引物和接头引物进行PCR扩增，检测荧光基团采用FAM标记的特异性miRNA TaqMan探针（原理见图1）。使用该试剂盒可以高特异性、高灵敏度的检测低至100个细胞的miRNA分子。HaiGene TaqMan miRNA定量PCR试剂盒多达一万余种，试剂盒编号为TAPXXXXX，每一个miRNA分子对应一个检测试剂盒（包含特异性的TaqMan探针、正向引物、反向引物、定量试剂），可于HG TaqMan miRNA qPCR kit.xls中查询。如果您研究的microRNA分子不在我们的列表中，请来信咨询，我们将及时为您优化设计。

内参miRNA定量试剂盒可选择使用

(1) TaqMan RNU6B miRNA定量PCR 试剂盒(货号：TAP01501)人、鼠等哺乳动物；

(2) TaqMan hsa-miR16 miRNA定量PCR试剂盒(货号：TAP01511)适用于来源于人、鼠全血样品。

## 操作方法和步骤

### 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 7000/7300/7500/7900等。按照如下组分配制20 $\mu$ l PCR反应体系：

5×Golden HS TaqMan qPCR Mix	4 $\mu$ l
50×ROX Reference Dye	0.4 $\mu$ l
20×miRNA TaqMan Assay	1 $\mu$ l
*cDNA模板	1~2.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu$ l

注意：cDNA模板来自于第二步所得TaqMan miRNA反转录产物。

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

5×Golden HS TaqMan qPCR Mix	4 $\mu$ l
20×miRNA TaqMan Assay	1 $\mu$ l
*cDNA模板	1~2.5 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	Up to 20 $\mu$ l

注意：cDNA模板来自于第二步所得TaqMan miRNA反转录产物。

## 2 进行Real-Time PCR反应

通常采用两步法，程序如下：

Stage 1: 95°C 15min

Stage 2: 95°C 10s  
60°C 60s 40 cycles

(收集信号采用FAM染料通道)

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。

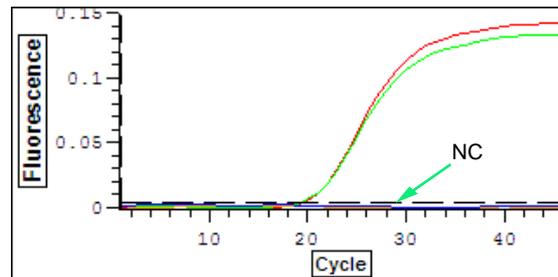
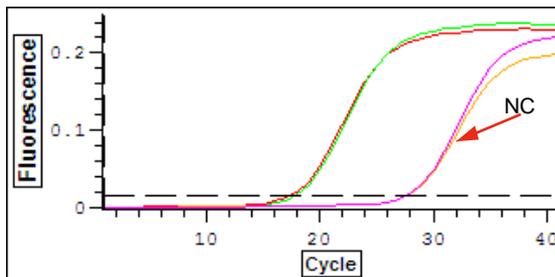
## 3.实例

microRNA因其序列特别短，只有20-25nt，引物设计空间有限，无论是茎环法还是加尾法反转录，如后续定量PCR用染料法和反向通用引物检测，都不可避免的会出现非特异性扩增（通过做水阴性对照即可验证），这就使得数据的可信度大大降低。海基自主研发的TaqMan microRNA Assay采用FAM标记TaqMan探针和特异性上游引物进行miRNA定量检测，有效的确保了扩增的高特异性和高灵敏度，拒绝非特异性扩增，完全可与ABI探针法相媲美！

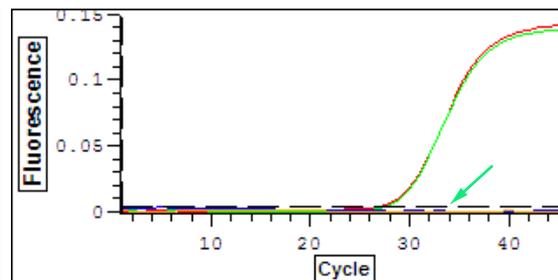
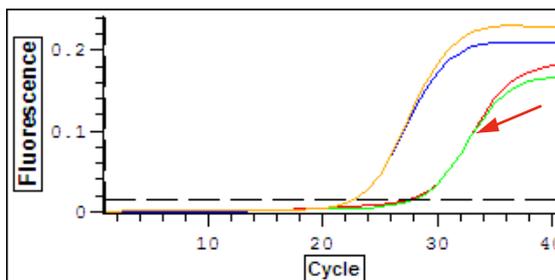
普通SYBR Green (T公司)

Taqman microRNA Assay (HaiGene)

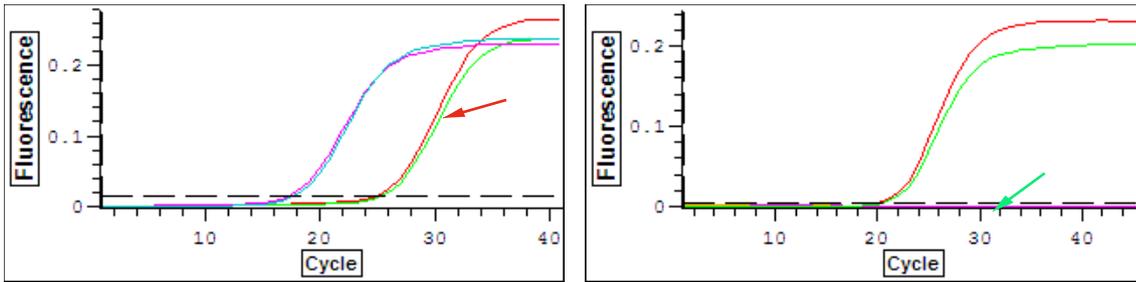
### A: hsa-let-7b



### B: hsa-miR-122



## C: hsa-miR-30b



## D: hsa-miR-7

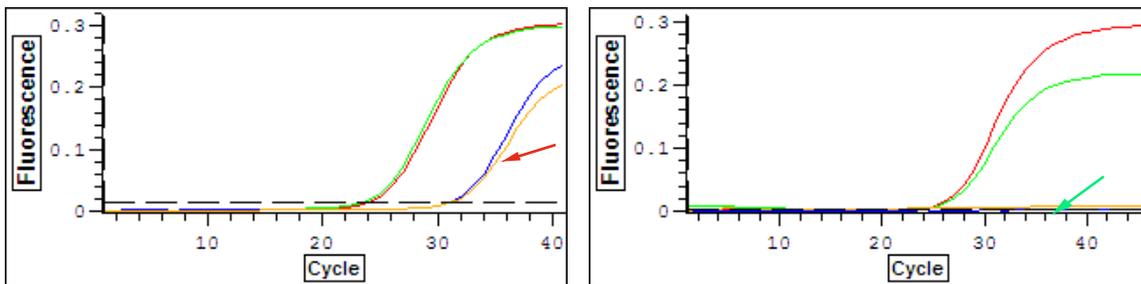


图3: 应用快速组织细胞microRNA提取试剂盒 (HaiGene, B1802) 提取人胃癌组织的小RNA, 通过加尾法反转录试剂盒 (T公司) 和TaqMan microRNA反转录试剂盒 (HaiGene, D1802) 进行反转录获得cDNA, 然后稀释5倍取2ul分别采用SYBR Green 染料法 (T公司) 和TaqMan microRNA Assay (HaiGene, TAPXXXXX) 进行定量检测hsa-let-7、hsa-miR-122、hsa-miR-135和hsa-miR-7, 分别做实验组和水阴性对照组(NC)2个复孔。结果表明: TaqMan microRNA Assay可有效确保数据的可信度, 扩增结果完全为特异性扩增。

## 参考文献

- (1)Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis.
- (2)Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs.
- (3)MicroRNA detection in prostate tumors by quantitative real-time PCR (qPCR).
- (4)Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma
- (5)Novel real-time PCR assay of microRNAs using S-Poly(T), a specific oligo(dT) reverse transcription primer with excellent sensitivity and specificity.

## Material and Methods

The miRNA was extracted from the tissue or cell samples using Tissue&Cell microRNA 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 TaqMan miRNA cDNA Synthesis Kit (HaiGene, Harbin, China). Briefly, the reaction mix consisting of 100 ng of miRNA, 1  $\mu$ l of 5 $\times$ TaqMan miRNA RT Solution A, was performed to add the polyA tail at 37  $^{\circ}$ C for 30min, 85 $^{\circ}$ C for 5min. Followed with adding 2  $\mu$ l of 10 $\times$ TaqMan miRNA RT Solution B, 2  $\mu$ l of 10 $\times$ TaqMan miRNA RT Primer, and 11  $\mu$ l of ddH<sub>2</sub>O, which incubated at 35  $^{\circ}$ C 5min, 55 $^{\circ}$ C 60min followed by enzyme inactivation at 95  $^{\circ}$ C for 5 minutes. Quantification of miRNA was performed by HG TaqMan miRNA PCR Kit(HaiGene, Harbin, China) . RealTime PCR was performed in 20  $\mu$ l with 2  $\mu$ l of cDNA product, 1  $\mu$ l of miRNA TaqMan Assay, and 4  $\mu$ l of 5 $\times$ Golden HS TaqMan qPCR Mix under the following conditions:95 $^{\circ}$ C for 15min, 40 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 10s, and 60 $^{\circ}$ C for 60s in LightCycler 480 (Roche). MiR-21 levels were normalized to U6B RNA levels using the 2 $^{-\Delta\text{Ct}}$  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.