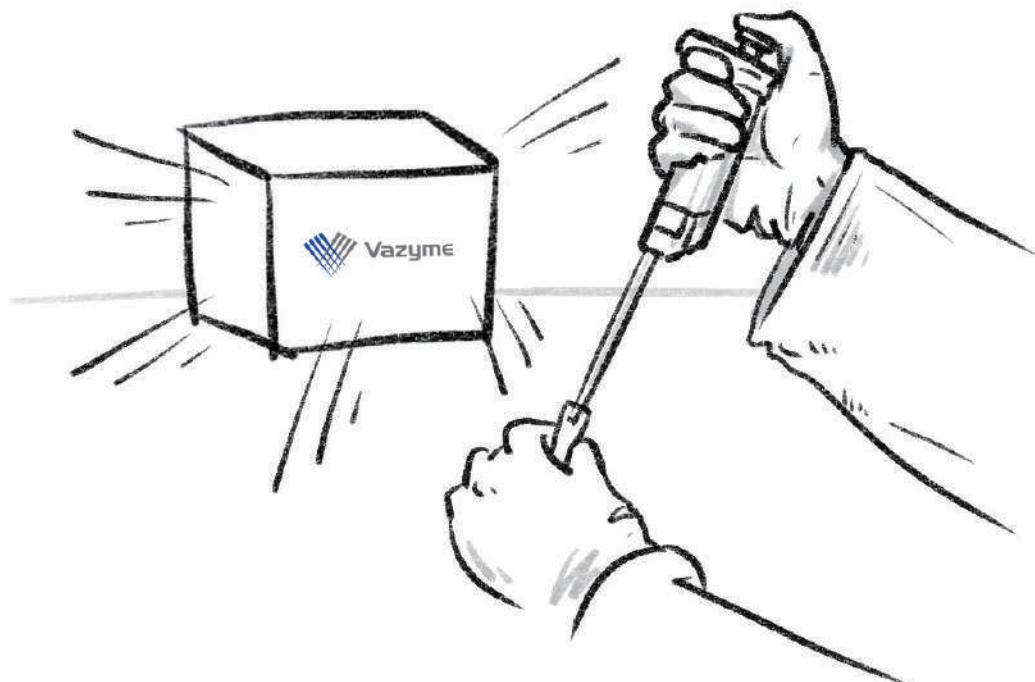




# miRNA 实验解决方案

– 操作手册 –

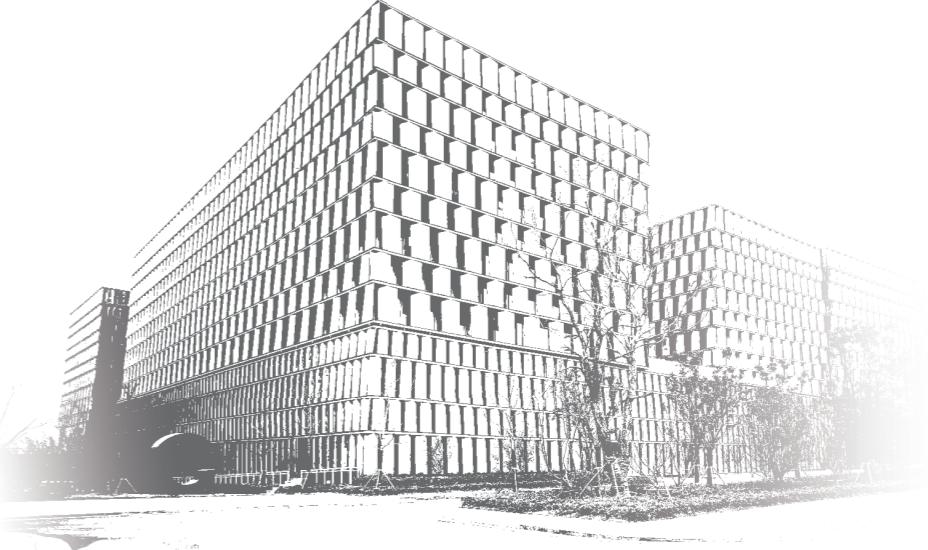


南京诺唯赞生物科技股份有限公司  
Nanjing Vazyme Biotech Co.,Ltd.



南京诺唯赞生物科技股份有限公司 (Vazyme Biotech Co.,Ltd) 致力于酶和抗体的研发和生产，产品涵盖体外诊断、高通量测序和生命科学研究等领域。公司坐落于六朝古都南京，背靠风景秀丽的栖霞山，依托国家级南京经济技术开发区的区域辐射力，以先进的研发能力和领先的技术力量，书写全新的民族生物科技格局。

## Inno**V**ation in Enzyme Technology



# 目 录

## miRNA 实验解决方案（操作手册）

### 第一章： miRNA 简介

一、 miRNA 的合成途径 .....	7
二、 miRNA 的特性 .....	8
三、 miRNA 序列查找 .....	8
四、 miRNA 产品选择指南 .....	9

### 第二章： miRNA 提取

一、 miRNA 提取的方法 .....	11
二、 miRNA 提取的操作流程 .....	11
三、 miRNA 提取的常见 FAQ .....	17

### 第三章： miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

一、 miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的概念 .....	19
二、 miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的原理 .....	19
三、 miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的操作流程 .....	22
四、 miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的常见 FAQ .....	31

### 第四章： Small RNA 建库

一、 Small RNA 的概念 .....	35
二、 Small RNA 建库的原理 .....	35
三、 Small RNA 建库的操作流程 .....	36
四、 Small RNA 建库的常见 FAQ .....	45

第一章：miRNA 简介

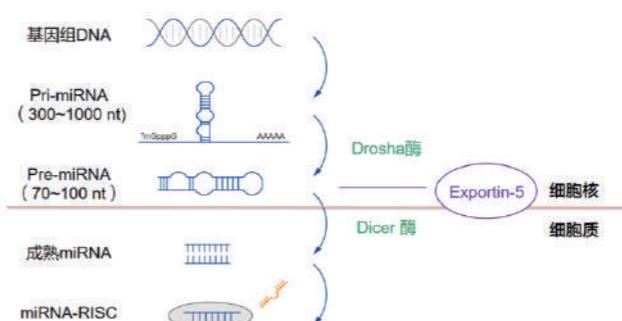
miRNA ( microRNA ) 是片段长度约在 21 ~ 23 nt 的内源性非编码小 RNA。miRNA 的功能主要是调控 RNA 的转录，miRNA 能够特异性地与目标 mRNA 结合，介导靶 mRNA 的翻译抑制或降解。其在生物体发育、细胞增殖与分化、激素分泌、肿瘤形成等生理生化过程中具有十分重要的调节作用，是当今分子生物学和表观遗传学研究的热门方向之一。

## ◆ 一、miRNA 的合成途径

动物和植物 miRNA 都是由 miRNA 基因的初级转录产物 Pri-miRNA ( Primary miRNA ) 加工而来。

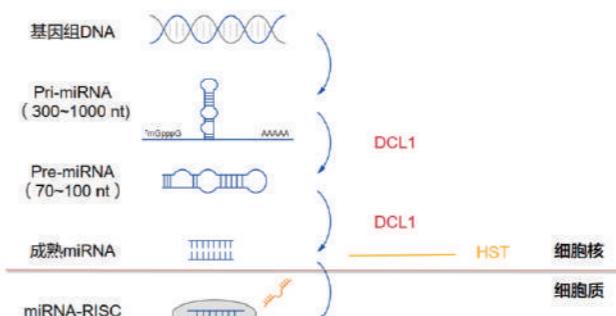
## ● 动物体

在动物细胞核中，miRNA 基因的初级转录产物 Pri-miRNA（长度大约为 300 ~ 1000 nt）被 RNase III——Drosha 酶切割成为发夹结构前体 miRNA（Pre-miRNA，长度大约为 70 ~ 100 nt）。经过初步剪切后，Pre-miRNA 在转运蛋白 Exportin-5 的作用下由细胞核内转运到细胞质中，然后由另一种 RNase III——Dicer 酶进一步切割产生成熟的 miRNA（长度大约为 21 ~ 23 nt）。成熟的 miRNA 与类似 RISC 的核糖体蛋白结合形成 miRNA-RISC 复合体，从而引起靶 mRNA 降解或者翻译抑制。miRNA 参与胚胎发育、细胞分化、细胞增殖、细胞凋亡、细胞死亡、免疫调节以及物质代谢等过程。



## ● 植物体

植物 miRNA 的形成过程全部是在细胞核中完成的，不存在 Pre-miRNA 从细胞核到细胞质转运过程。首先，细胞核中编码 miRNA 的基因在 RNA 聚合酶 II 的作用下转录形成 Pri-miRNA，然后在 Dicer 酶——DCL1 的作用下形成 Pre-miRNA，DCL1 继续作用于 Pre-miRNA 从而形成成熟的 miRNA，以上过程均在细胞核中完成。成熟的 miRNA 或者是在细胞核中与类似 RISC 的核糖体蛋白结合形成 miRNA-RISC 复合体，然后被核转运蛋白 HST 运送到细胞质中，或者是先被 HST 运送到细胞质中，再与核糖体蛋白结合形成 miRNA-RISC 复合体。miRNA 影响植物的生长发育、激素的调节、信号的转导、植物病害和应答环境胁迫。



## 第一章：miRNA 简介

备忘录

## ◆ 二、miRNA 的特性

miRNA 最经典的特性就是两点——保守性和特异性。

## ● 保守性

miRNA 的结构和序列在物种之间几乎保持不变。

结构的保守性：无论动物体还是植物体，miRNA 的生成途径都是由茎环结构的前体切割成为成熟体；

序列的保守性：miRNA 的序列在不同物种中的差距极小。

## ● 特异性

miRNA 的表达分布具有时间区别和空间区别。

时间的特异性：在个体不同的发育阶段，miRNA 的表达量不同；

空间的特异性：在个体的不同组织中，miRNA 的表达量不同。

## ◆ 三、miRNA 序列查找

常用的查找 miRNA 数据库——miRBase 和 TarBase。

● miRBase: <http://www.mirbase.org/>

该数据库提供已发表的 miRNA 序列，注释查询，定位，发卡序列以及命名服务等信息的全方位数据库。

● TarBase: <http://www.tarbase.com/>

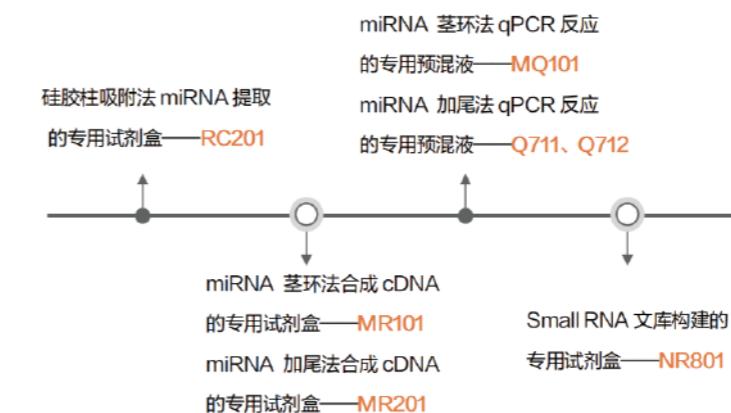
该数据库人工搜集了实验证过的 miRNA 的靶基因，包括在人、小鼠、果蝇、蠕虫和斑马鱼中的 miRNA 的靶基因。

## 第一章：miRNA 简介

备忘录

## ◆ 四、miRNA 产品选择指南

Vazyme 为您提供 miRNA 专用的提取、逆转录、实时荧光定量 PCR 检测以及 Small RNA 建库系列产品，并搭配最适 miRNA 引物设计软件，可直接进行成熟 miRNA 的实时荧光定量 PCR 高效检测，及 Small RNA 的文库构建。



## ● miRNA 茎环法系列产品

miRNA 茎环法	产品名称	规格	货号
miRNA 提取	MiPure Cell / Tissue miRNA Kit	50 rxns	RC201
miRNA 逆转录	miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by stem-loop)	50 rxns/100 rxns	MR101
miRNA 定量	miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix	125 rxns/500 rxns	MQ101
Small RNA 建库	VAHTS Small RNA Library Prep Kit for Illumina	24 rxns/96 rxns	NR801

## ● miRNA 加尾法系列产品

miRNA 加尾法	产品名称	规格	货号
miRNA 提取	MiPure Cell / Tissue miRNA Kit	50 rxns	RC201
miRNA 逆转录	miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit (by tailing A)	20 rxns/50 rxns	MR201
miRNA 定量	ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	500 rxns/2500 rxns	Q711
	Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	500 rxns/2500 rxns	Q712
Small RNA 建库	VAHTS Small RNA Library Prep Kit for Illumina	24 rxns/96 rxns	NR801

## 第二章：miRNA 提取

Vazyme

备忘录

## ◆ 一、miRNA 提取的方法

miRNA 提取的难点在于其分子太小，不易被醇类沉淀，也不易被常规的硅胶吸附膜吸附。miRNA 的提取方法主要有两种形式，一种是提取样品中的总 RNA 后，通过 PAGE 电泳或 PEG，将总 RNA 中的小片段 RNA 分离出来，最后对小片段的 RNA 进行沉淀回收，从而获得 miRNA。另一种是硅胶柱吸附法，采用特殊硅基质吸附材料在添加适量乙醇的条件下，可特异吸附小片段 RNA（小于 200 nt），最终得到 miRNA。传统方法提取 miRNA 通常采用第一种，而 miRNA 提取试剂盒一般采用硅胶柱吸附法。前者的主要缺点在于实验步骤较为繁琐，影响因素较多，最终获得的 miRNA 纯度较差，不利于后续实验；而后者操作简便，获得的 miRNA 纯度良好。

## ◆ 二、miRNA 提取的操作流程

## ● miRNA 提取

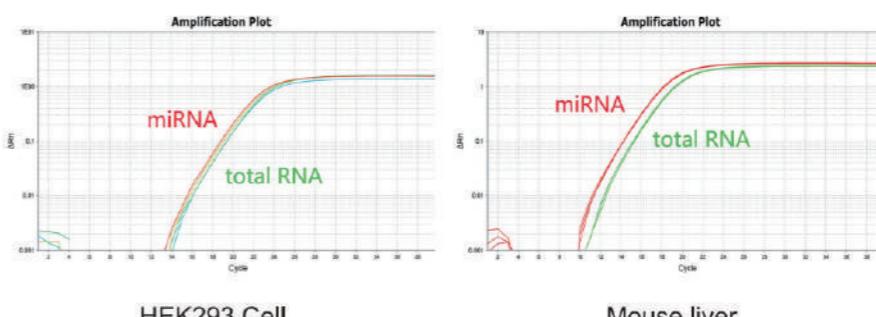
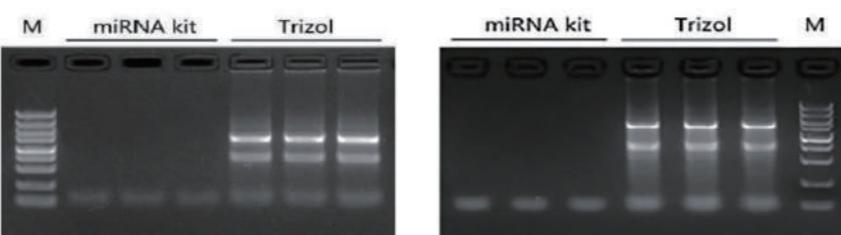
Vazyme 动物细胞和组织 miRNA 柱式提取试剂盒——MiPure Cell / Tissue miRNA Kit (Vazyme #RC201)。

## ● Vazyme #RC201 产品优势

- 高效的提取效率：有效分离长度 20 ~ 200 nt 的小片段 RNA。
- 简便的操作流程：结合高效的 RNA Isolater 抽提试剂和硅胶柱纯化技术，1h 内完成 miRNA 提取。
- 广泛的适用性：提取的 miRNA 纯度高，兼容常规 qPCR、Northern 杂交、芯片分析及 miRNA 文库构建。

## ● Vazyme #RC201 实验案例——极高的提取效率

使用 MiPure Cell / Tissue miRNA Kit (Vazyme #RC201) 与 total RNA 提取试剂 (Trizol) 分别从等量样本（细胞或小鼠肝脏组织）中提取 miRNA、total RNA，琼脂糖凝胶电泳检测等量产物，结果如下图所示：对于细胞或小鼠组织，Vazyme #RC201 提取得到的产物中不含有大分子 RNA，如 18S、28S rRNA。通过 qPCR 实验检测等量产物中 miR-16 基因，结果显示，Vazyme #RC201 对于 miRNA 的提取产量优于 Trizol 法。



## 第二章：miRNA 提取

- 一、miRNA 提取的方法
- 二、miRNA 提取的操作流程
- 三、miRNA 提取的常见 FAQ

## 第二章：miRNA 提取

## ● 产品组分

备忘录

	组分	RC201 (50 rxns)
Box 1	RNA Isolater	60 ml
	Buffer miRW1	30 ml
	Buffer miRW2	20 ml
	RNase-free ddH <sub>2</sub> O	30 ml
	MiPure RNAspin Column	50 个
	MiPure miRNA Column	50 个
	2 ml Collection Tube	100 个

## ● 自备材料

无水乙醇；三氯甲烷（氯仿）；使用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 新鲜配制 80% 乙醇（每个样品需要 500 μl）；1.5 ml 的 RNase-free 离心管；RNase-free 枪头；小型离心机；12,000 rpm (13,400 × g) 的低温离心机；合适的匀浆工具；首次使用时，按下表在 Buffer miRW1、Buffer miRW2 中加入无水乙醇，并于室温保存。

试剂名称	Buffer miRW1	Buffer miRW2
加入无水乙醇的量 (ml)	60	80

## 第二章：miRNA 提取

## ● 注意事项

- 本制品的裂解液 RNA Isolater 中含有苯酚，具有毒性和腐蚀性。如果吸入体内、接触皮肤、吞食等会导致中毒、灼伤以及其他身体伤害。使用本制品时应穿戴防护物品，如防护服装、手套、面罩等。
- 所有操作步骤，如果没有特别指出，均在常温条件下 (15 ~ 25°C) 进行。
- RNA 得率和质量与组织样本用量和洗脱体积有关，建议每 1 ml RNA Isolater 裂解 10 ~ 100 mg 组织，或不多于 5 × 10<sup>6</sup> 个细胞。洗脱体积应不少于 30 μl，否则会影响 RNA 的得率。
- 使用本试剂盒时，请穿戴实验服、一次性乳胶手套、一次性口罩等，最大程度的避免 RNase 污染。
- 样本的选择及保存会很大程度上影响 RNA 的产量以及质量。应尽可能的采用新鲜的动物组织或细胞进行 RNA 提取。如果采集的样本暂不提取 RNA，可以将新采集的样本立即置于液氮中速冻后于 -70°C 保存，并且避免反复冻融，或者将样本立即置于 RNA Isolater 裂解液中匀浆后，置于 -70°C 保存。为了避免 RNA 的降解，样本的采集与保存应尽可能迅速地进行。
- 样本破碎需彻底，完全破坏细胞膜及细胞器以释放 RNA，破碎不充分将影响 RNA 的产量，匀浆时尽量低温，防止因匀浆过程中产生的热量导致 RNA 降解。
- RNA 在 RNA Isolater 中不会被 RNase 污染，但裂解后处理过程应保证 RNase-free 环境。
- 本试剂盒可去除体系中基因组 DNA，纯化获得的 RNA 通常无需使用 DNase 处理即可用于下游实验操作。如果下游实验对痕量的 DNA 十分敏感，可以选用商业化 RNase-free DNase 彻底清除。

## ● 实验流程

## 1. 样品的处理

样品的均质化处理是所有 RNA 提取所必需的步骤。通过吹打或匀浆让细胞或组织块快速分散、细胞壁和细胞质膜破裂，从而使核酸释放到裂解液中。均质化不充分可能会导致 RNA 产量和纯度下降。下面列举了几种常见的样品均质化处理方法：

## 1.1 液氮处理

切取适量组织称重，置于预冷的研钵中，迅速加入液氮，将组织研磨成粉末，然后将粉末倒入预冷的离心管中（注意：预先冷却离心管，否则样品倒入时，液氮沸腾会造成样品损失）。待液氮完全挥发后，加入适量的 RNA Isolater 涡旋混匀。由于液氮研磨只能起到打散样品的作用，所以最好再用注射器吹打或机械匀浆器匀浆，以降低裂解液的粘稠度。

## 1.2 机械匀浆器匀浆

机械匀浆器能高效匀浆大部分组织和细胞，并同时起到打散和匀浆的作用。把样品置于合适的 1 ~ 5 ml 玻璃管或离心管中，加入 RNA Isolater，把转子插入 RNA Isolater 中，低温高速间断匀浆，每次为 10 ~ 30 sec，间隔相同时间直至样品完全匀浆。使用机械匀浆器时，一般组织都可以在一分钟内达到理想的匀浆效果。大部分的机械匀浆器都带有不同大小的转子，小体积的裂解液适合使用较小的转子。

## 1.3 玻璃匀浆器

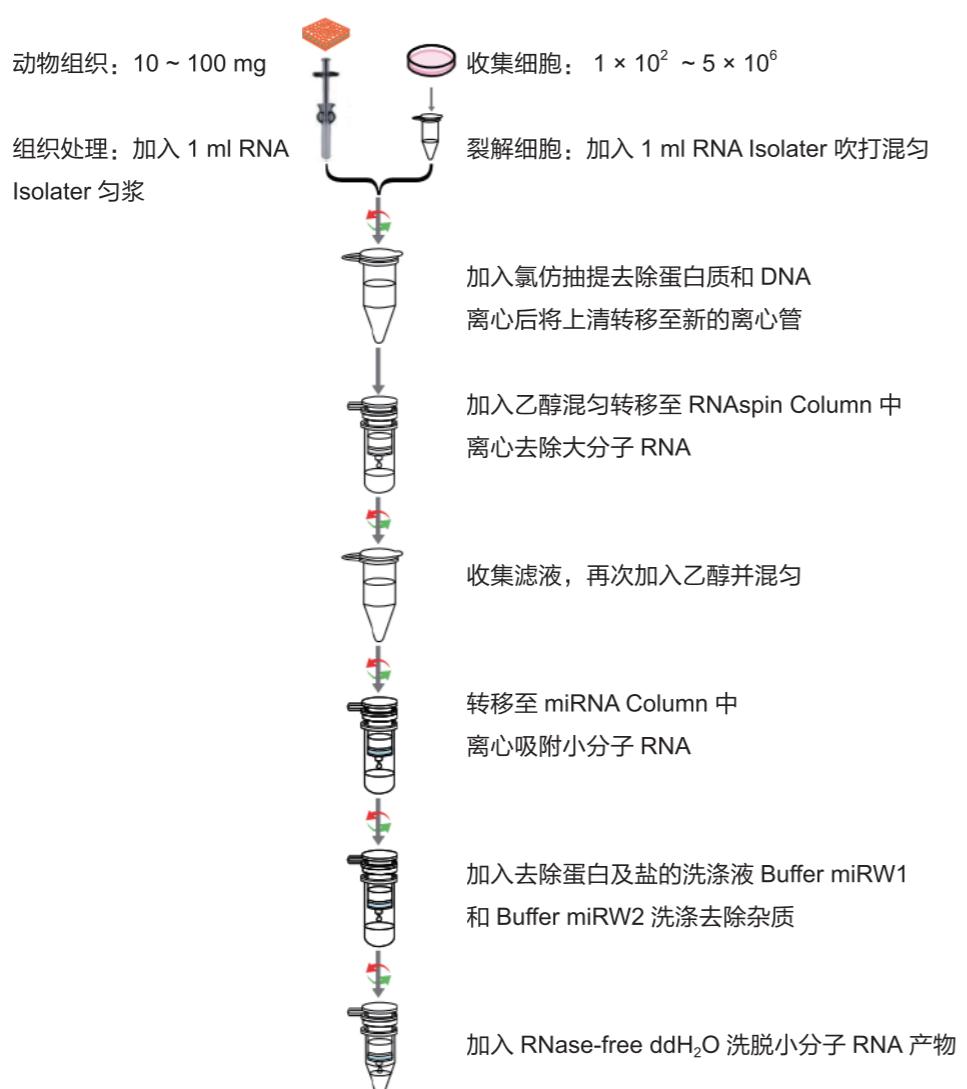
把样品和适量的裂解液转移至玻璃匀浆器中，上下推磨直至组织块被充分打散。

备忘录

## 第二章：miRNA 提取

## 2. RNA 的提取

小分子 RNA 的提取可分为细胞小分子 RNA 和动物组织小分子 RNA，不同小分子 RNA 的提取均可使用 Vazyme #RC201，提取原理及流程概要如下：



## 第二章：miRNA 提取

## 2.1 细胞小分子 RNA 的提取

该方案适合于从少于  $5 \times 10^6$  个培养细胞样品中富集小分子 RNA (<200 nt)。

## (1) 收集细胞。

a. 悬浮培养细胞: 计算细胞数量, 300 g 离心 5 min 收集细胞, 小心弃除培养液, 按 2.1 中的第 2 步进行操作。

b. 贴壁细胞: 贴壁细胞可在培养瓶 / 盘中直接裂解, 也可经胰酶消化后离心收集。

▲ 直接裂解: 计算细胞数量, 彻底弃除培养液, 按 2.1 中的第 2 步进行操作。

▲ 胰酶消化处理: 计算细胞数量, 弃除培养液, 加入适量 PBS 清洗细胞, 弃除 PBS, 再加入含 0.1 ~ 0.25% 胰酶 (Trypsin) 的 PBS 消化细胞。当细胞从壁上脱落, 加入含血清的培养液, 并转移至离心管, 300 g 离心 5 min。收集细胞, 按 2.1 中的第 2 步进行操作。

## (2) 加入 1 ml RNA Isolater 至细胞样品中, 涡旋或吸打处理细胞沉淀团。

▲ 离心收集的细胞: 先弹打使细胞松散, 再加入 1 ml RNA Isolater, 用移液枪吸打 10 ~ 15 次彻底打散细胞。贴壁细胞直接裂解: 彻底弃除培养液后, 向培养瓶或培养皿中加入 1 ml RNA Isolater。用枪吹打使细胞从壁上完全脱落, 收集裂解液, 并转移至离心管中。

## (3) 室温放置 2 ~ 3 min 让细胞充分裂解。

▲ 此时样品可在 2 ~ 8°C 保存一周, -20°C 至 -70°C 保存六个月以上。

## (4) 加入 200 μl 氯仿至裂解液中, 用手剧烈振荡 15 sec, 室温静置 3 min。

▲ 用涡旋取代振荡可能会带入基因组 DNA 污染。

(5) 4°C, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心 15 min。吸取 500 μl 的上清液至新的 1.5 ml 离心管中。

▲ 请小心吸取上清水相, 避免吸到中间层和下层有机相而影响后续提取结果。

(6) 加入 160 μl 的无水乙醇至上清液中, 涡旋混匀 10 sec。(以下离心均在室温下进行)

(7) 把 RNA 柱 (MiPure RNAspin Column) 置入 2 ml 收集管 (Collection Tube)。将上述混合液转移至 RNA 柱中 12,000 rpm (13,400 × g) 离心 30 sec。

(8) 加入 0.9 倍体积的无水乙醇至滤液中, 用移液枪吸打混匀 3 ~ 5 次。

▲ 举例: 若滤液体积为 640 μl, 则需加入 576 μl 无水乙醇。

(9) 把 miRNA 柱 (MiPure miRNA Column) 置入 2 ml 收集管中。转移一半体积的混合液至 miRNA 柱中 12,000 rpm (13,400 × g) 离心 30 sec。

(10) 弃滤液, 把 miRNA 柱置回收集管中。转移剩余混合液至 miRNA 柱中, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心 30 sec。

(11) 弃滤液, 把 miRNA 柱置回收集管中。加入 500 μl Buffer miRW1 (已加乙醇) 至 miRNA 柱中, 室温放置 1 min, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心 30 sec。

(12) 弃滤液, 把 miRNA 柱置回收集管中。加入 500 μl Buffer miRW2 (已加乙醇) 至 miRNA 柱中, 室温放置 1 min, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心 30 sec。

(13) 弃滤液, 把 miRNA 柱置回收集管中。加入 500 μl 80% 乙醇 (需用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 新鲜配制) 至 miRNA 柱中, 室温放置 1 min, 12,000 rpm (13,400 × g) 离心 30 sec。

(14) 弃滤液, 把 miRNA 柱置回收集管中。12,000 rpm (13,400 × g) 离心空柱 2 min, 甩干 miRNA 柱的基质。这一步可彻底去除 miRNA 柱中残留的乙醇。

(15) 将 miRNA 柱转移至新的 1.5 ml 离心管。室温晾干 2 ~ 5 min, 加入 30 ~ 50 μl

## 第二章： miRNA 提取

备忘录

RNase-free ddH<sub>2</sub>O 至 miRNA 柱的膜中央。室温静置 2 min。12,000 rpm ( 13,400 × g ) 离心 1 min 以收集滤液。

▲ MiPure miRNA Column 最小的洗脱体积是 30 μl，小于 30 μl 会致 RNA 的洗脱效率下降。

(6) 丢弃 miRNA 柱，收集的 miRNA 样品于 -70°C 保存。

## 2.2 动物组织小分子 RNA 的提取

该方案适合于从少于 100 mg 动物组织中富集小分子 RNA (<200 nt)。

(1) 组织用量：组织用量是 RNA 产量和纯度的关键因素。试剂盒的组织用量可低至 0.01 mg，但最大的组织用量取决于样品中 RNA、蛋白质和杂质的含量。

▲ 动物脑组织、脂肪组织，RNA 含量较低，组织最大用量可至 100 mg。

▲ 动物肝脏、脾脏、肾脏、胸腺等，含有丰富的 RNA，组织用量不要超过 20 mg。

▲ 心脏、肌肉、皮肤含有中丰度的 RNA，组织用量不要超过 50 mg。

\*MiPure miRNA Column 结合能力为 200 μg。过多的组织用量会造成 RNA 降解及大分子 RNA 的污染。如果处理的组织没有相关的信息，推荐第一次起始用量为 30 mg，根据获得的结果来提高或降低组织的用量。

(2) 组织的裂解和匀浆：按 10 ~ 100 mg 的组织量，加入 1 ml RNA Isolater。

(3) 室温放置 2 ~ 3 min 让组织充分裂解。

(4) (可选) 4°C, 12,000 rpm ( 13,400 × g ) 离心 10 min。小心吸取上清液至新的离心管中。

▲ 处理脂肪样品时，离心后溶液表面会飘浮一层油脂类，小心转移下层清液至新管。

(5) 加入 200 μl 氯仿至裂解液或上清液中。用手剧烈振荡 15 sec，室温静置 3 min。

▲ 用涡旋取代振荡可能会带入基因组 DNA 污染。

(6) 4°C, 12,000 rpm ( 13,400 × g ) 离心 15 min。吸取 500 μl 上清液至新的 1.5 ml 离心管中。

▲ 请小心吸取上清液，避免吸到中间层和下层有机相而影响后续提取结果。

按 2.1 的第 6 ~ 16 步进行操作富集小分子 RNA。

## 第二章： miRNA 提取

备忘录

## ◆ 三、 miRNA 提取的常见 FAQ

## ● 离心后分层不明显？

1. 没有加氯仿或氯仿不纯：确保加入氯仿，且氯仿不含有异戊醇或其它添加成分。
2. 加入氯仿后混匀效果不好：加入氯仿后，一定要剧烈振荡混匀 15 sec。颠倒或涡旋会导致分离不明显或引入 DNA 污染。如果离心后分离不明显，重复振荡和静置，然后再离心。
3. 样品中含有机溶剂：若样品含有有机溶剂如 DMSO、乙醇、强碱试剂会影响分层。

## ● RNA 产量低？

1. 样品匀浆不充分：处理培养细胞时，反复吹打裂解液进行裂解；处理动物组织时，推荐使用机械匀浆器匀浆。
2. 样品起始用量太多：根据说明书给出的参考用量及实际情况来决定样品用量。
3. RNA 的洗脱效率低：RNase-free ddH<sub>2</sub>O 没有加到膜上，或洗脱体积不够。可加入预热的 30 ~ 50 μl RNase-free ddH<sub>2</sub>O 到膜上，室温静置 2 min，然后离心洗脱 RNA。

## ● RNA 降解？

1. 组织 / 细胞用量太多：减少样品用量，正确的样品用量是获得理想结果的必要条件。
2. RNase 污染：操作过程避免 RNase 的污染。戴一次性干净手套；在单独洁净的区域操作；戴口罩并在操作过程中避免讲话；使用 RNase-free 的实验器具，包括枪头和离心管； RNA 实验所用器具与试剂都应专用，避免混用后造成交叉污染；RNase-free ddH<sub>2</sub>O 建议分装后保存。

## ● 下游实验结果不理想？

1. 盐分污染：加入 Buffer miRW2 或 80% 乙醇后，静置 2 min 再次离心。
2. 乙醇污染：空柱离心转速高于或等于 12,000 rpm ( 13,400 × g )，离心时间为 2 min。
3. 膜材料脱落：脱落到产物中的硅胶膜是不溶解的，可通过 12,000 rpm ( 13,400 × g ) 离心 2 min，仅分离含有小 RNA 的液体成分保存。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

Vazyme

备忘录

## ◆ 一、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的概念

## ● miRNA 逆转录的概念

成熟 miRNA 的长度只有 21 ~ 23nt, 对 miRNA 进行 qPCR 定量时, 无法直接对其进行正、反向引物的设计（通常正向引物就足以覆盖 miRNA 全长），但是可以通过增加逆转录产物长度来解决这一问题，miRNA 的逆转录方法有两种，分别是茎环法和加尾法。

## ● 实时荧光定量 PCR 的概念

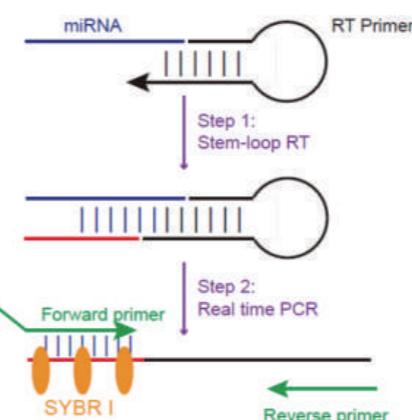
实时荧光定量 PCR 即 Real-time PCR, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过  $C_T$  值和标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

## ◆ 二、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的原理

## 1、miRNA 逆转录的原理

## ● 茎环法原理

茎环法 miRNA 逆转录最关键的一步就是设计茎环逆转录引物（由茎环结构和 miRNA 的 3' 末端六个反向互补的碱基组成），茎环逆转录引物首先与 miRNA 的 3' 末端结合，在逆转录酶的作用下进行反应，获得人为加长的 miRNA 第一链 cDNA。针对不同的 miRNA，需要设计不同的茎环逆转录引物、配制不同的逆转录体系，因此茎环法 miRNA 逆转录具有极高的特异性。



注：茎环逆转录引物中的茎环结构为固定已知序列，只需按照不同的 miRNA 序列 3' 末端的六个碱基，将其反向互补添加至茎环结构序列的 3' 端即可设计出特异性的茎环逆转录引物。

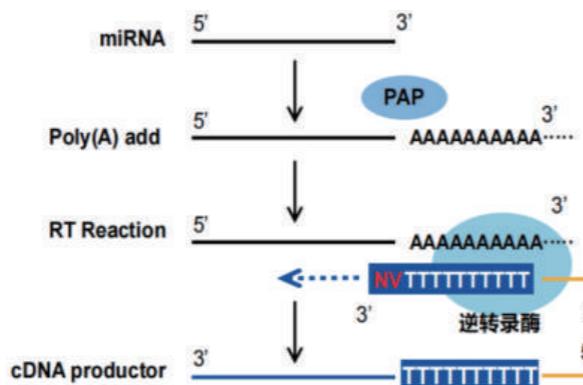
## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

- 一、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的概念
- 二、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的原理
- 三、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的操作流程
- 四、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的常见 FAQ

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

## ● 加尾法原理

增加 miRNA 逆转录产物长度最直接的方法就是增加 miRNA 的长度，加尾法首先通过 Poly(A) 聚合酶 (PAP) 向 miRNA 的 3' 末端添加 Poly(A) 尾，然后在逆转录酶的作用下，结合逆转录引物（由 3' 端带有锚定碱基的 Oligo dT 序列和一段通用序列组成），即可获得加长版的 cDNA。加尾法逆转录可以对提取纯化的所有 miRNA 进行无差别加尾，能够同时逆转录样本中多个 miRNA，一次逆转录即可完成对所有 qPCR 模板的制备。



注：锚定碱基 NV ( V 代表 A、G 或 C, N 代表 ATGC 中的任意一种 ) 能够特异性的结合到 Poly(A) 的 5' 端，以免逆转录出更多的 T 碱基，保证同一 miRNA 的逆转录产物大小相同；在 Oligo dT 序列的 5' 端存在一段可用于 qPCR 检测的反向通用引物与 cDNA 的结合。

## ● miRNA 茎环法 VS miRNA 加尾法

检测方法	miRNA 茎环法	miRNA 加尾法
检测灵敏度	++++	+++
检测特异性	++++	+++
实验成本	++++	++
检测通量	特异性反转录，一次反转录仅能检测一个 miRNA 或内参	高通量反转录，一次反转录即可检测多种 miRNA 及内参
检测准确性	miRNA 与内参分开，在两个体系分别反转录，容易产生误差	miRNA 与内参一起，在同一个反应体系反转录，准确性高
实验设计难度	需设计茎环反转录引物，上游、下游检测引物	仅需合成上游检测引物

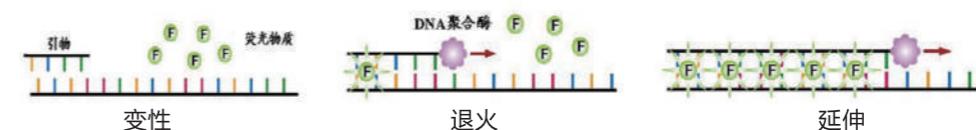
## 2、荧光定量 PCR 的化学原理

变产物 DNA 分子为荧光信号，通过测定荧光值即可反映产物 DNA 分子量，实时荧光定量 PCR 的化学方法有两种，分别是 SYBR®Green 染料法和 TaqMan®Probe 探针法。

## ● SYBR®Green 染料法原理

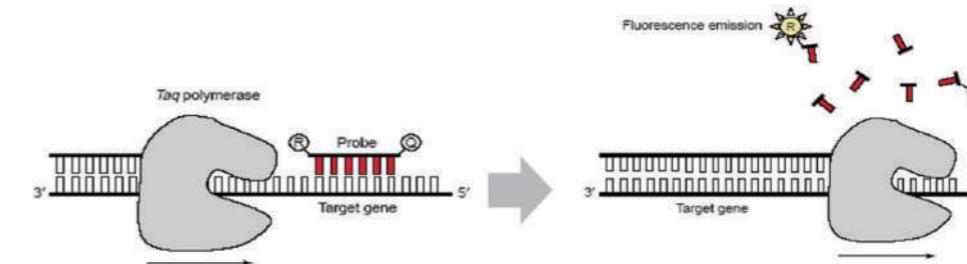
一种 DNA 小沟非饱和性结合染料，与 DNA 结合时发光，不结合（游离）时不发光，每形成一条 DNA 双链，就会有一定数量的染料结合上去，染料一结合，就会产生荧光信号，信号强度与 DNA 分子总数目成正比。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR



## ● TaqMan®Probe 探针法原理

一种水解探针 (5' Reporter, 3' Quencher)，完整时不发光，水解后发光，每形成一条 DNA 链，就会水解一条探针，每水解一条探针，就会产生一个单位信号，信号强度与结合过探针的 DNA 分子总数目成正比。



注：探针要先于引物结合在模板上，因此  $T_m$  (探针) 要比  $T_m$  (引物) 大 8 ~ 10℃。

## ● SYBR®Green 染料法 VS TaqMan®Probe 探针法

	SYBR®Green	TaqMan®Probe
优点	价格便宜	特异性高
	适用性广	支持多重荧光定量
	操作方便	
缺点	引物要求高	价格贵
	特异性稍差	只适合特定目标
不能进行多重定量		

SYBR®Green 染料法：表达量比较高时推荐使用；

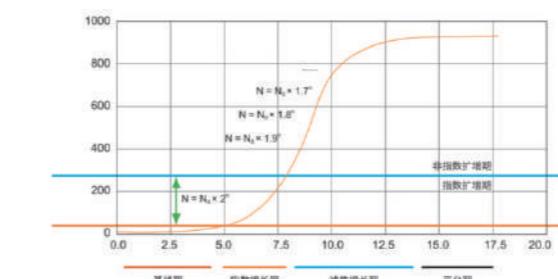
TaqMan®Probe 探针法：表达量比较低时推荐使用。

## 3、荧光定量 PCR 的数学原理：

通过循环数 “n” (  $C_T$  值) 来计算起始 DNA 量。

公式：  $N = N_0 \times (1 + e)^n$

注：N 产物分子数；  $N_0$  起始分子数； e 扩增效率； n 循环数。



## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

数学原理与化学原理结合：

$$R_n = R_B + X_0 (1 + e)^n R_s$$

第 n 次 PCR 循环时的荧光信号强度 ( $R_n$ ) 等于背景信号强度 ( $R_B$ ) 加上每个分子的荧光强度 (即单位荧光强度,  $R_s$ ) 与分子数目的乘积。

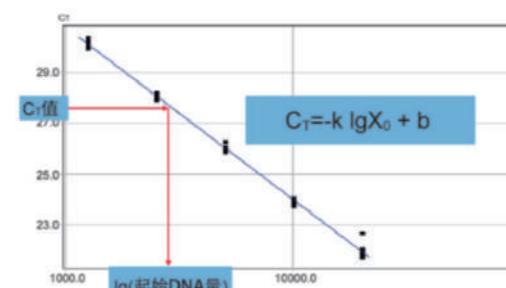
设  $n = C_T$ , 则:  $R_{CT} = R_B + X_0 (1 + e)^{CT} R_s$

$$\lg (R_{CT} - R_B) = \lg X_0 + C_T \lg (1 + e) + \lg R_s$$

$$C_T \lg (1 + e) = -\lg X_0 + \lg (R_{CT} - R_B) - \lg R_s$$

$$C_T = \frac{-\lg X_0}{\lg (1 + e)} + \frac{\lg (R_{CT} - R_B) - \lg R_s}{\lg (1 + e)}$$

即  $C_T = -k \lg X_0 + b$  (线性方程)



### ◆ 三、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的操作流程

#### 1、茎环法 miRNA 逆转录反应

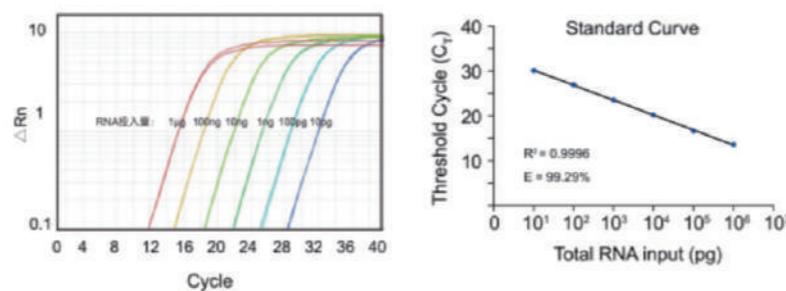
Vazyme 茎环法 miRNA cDNA 一链合成的专用试剂盒 ——miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit ( by stem-loop ) ( Vazyme #MR101 )。

#### ● Vazyme #MR101 产品优势

- 优秀的线性关系: 在宽广的模板区间内具有良好的线性关系, 可检出低至 pg 级 RNA 模板。
- 优越的反应体系: 最适的 Buffer 组分及浓度, 更适用于 miRNA 的逆转录。
- 简便的引物设计: 提供配套的引物设计软件, 使得引物设计更加简便。

#### ● Vazyme #MR101 实验案例——优秀的线性关系

以小鼠肝脏组织 Total RNA 的 10 倍稀释梯度 ( 10 pg ~ 1 μg ) 为模板, 使用 miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit ( by stem-loop ) ( Vazyme #MR101 ) 进行逆转录, 得到的 cDNA 使用 miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix ( Vazyme #MQ101 ) 扩增 mmu-miR-16 基因。结果显示, 在宽广的模板区间内, 该配套产品具有优异的线性关系。



## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

#### ● Vazyme #MR101 实验案例——简便的引物设计

Vazyme 为您提供专属茎环逆转录引物设计软件, 只需按以下步骤即可得到特异性茎环逆转录引物:



注意:

软件无法识别T碱基, 输入miRNA序列时如有T碱基, 需要将T更换为U

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

## ● 产品组分

组分	MR101-01 (50 rxns)	MR101-02 (100 rxns)
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml
5 × gDNA Wiper Mix	100 μl	200 μl
10 × RT Mix <sup>a</sup>	100 μl	200 μl
HiScript II Enzyme Mix <sup>b</sup>	100 μl	200 μl

a. 包含 dNTP。

b. 包含 RNase inhibitor。

## ● 注意事项

- 防止 RNase 污染：保持实验区域洁净；操作时需穿戴干净的手套、口罩；实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证 RNase-free。
- 5 × gDNA Wiper Mix 的使用：5 × gDNA Wiper Mix 含有高浓度的甘油，使用前请短暂离心收集到反应管底部，并用移液器轻轻吹打混匀。不应使枪头插入液面过深，否则会因枪头壁的粘附造成酶量的损失。
- 反应液的配制请在冰上操作完成。

## ● 实验流程

## 1. 基因组 DNA 去除

a. 在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：

RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 10 μl
5 × gDNA Wiper Mix	2 μl
Total RNA	10 pg ~ 1 μg

用移液器轻轻吹打混匀。

b. 按下列条件进行基因组 DNA 去除反应：42°C 2 min。

## 2. 第一链 cDNA 合成

a. 在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：

RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 20 μl
上一步的混合液	10 μl
Stem-loop primer(2 μM)*	1 μl
10 × RT Mix	2 μl
HiScript II Enzyme Mix	2 μl

\* 茎环引物推荐使用本公司 miRNA Design 软件进行设计，此时，cDNA 产物后续定量产品--miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix(Vazyme #MQ101) 中配套的逆向 qPCR 引物可直接使用，无需另外设计合成。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

用移液器轻轻吹打混匀。

b. 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应：

25°C	5 min
50°C *	15 min
85°C	5 min

\* 如果模板具有复杂二级结构或高 GC 区域，可将反应温度提高至 55°C，有助于提高产量。

▲ 产物可立即用于 qPCR 反应，短期保存建议存放 -20°C；长期保存建议存放 -70°C；cDNA 应避免反复冻融。

## 2、加尾法 miRNA 逆转录反应

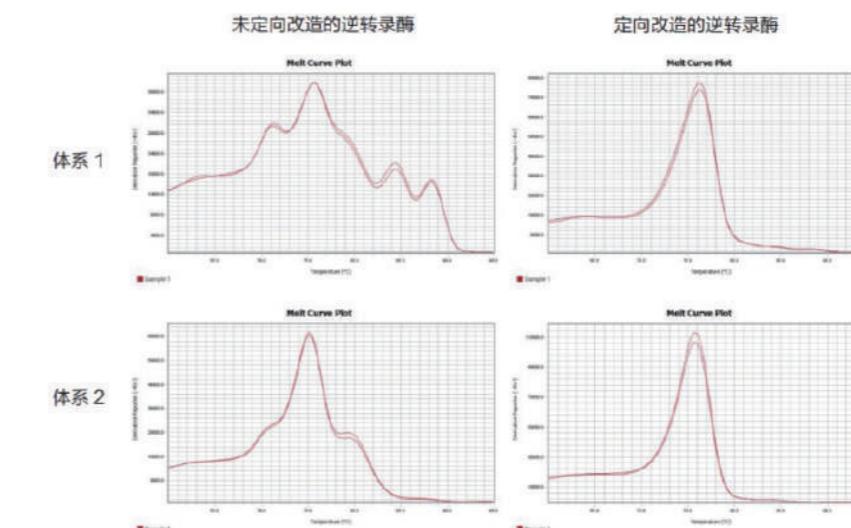
Vazyme 加尾法 miRNA 逆转录是无法使用普通的逆转录试剂盒进行逆转录的，因为其缺少 Poly (A) 聚合酶，无法添加 Poly (A) 尾。Vazyme 为您提供加尾法 miRNA 合成 cDNA 的专用试剂盒——miRNA 1st Strand cDNA Synthesis Kit ( by tailing A ) ( Vazyme #MR201 )。

## ● Vazyme #MR201 产品优势

- 卓越的逆转录性能：逆转录效率高且熔解曲线单峰。
- 超高的逆转录特异性：专为 miRNA 逆转录定向改造的逆转录酶，搭配优化的缓冲体系，在保证高灵敏度的同时，最大限度降低 miRNA 前体的逆转录。
- 简便快捷的操作：加尾反应与逆转录反应一管进行，使得操作更加方便。

## ● Vazyme #MR201 实验案例——超高的逆转录特异性

以 HeLa miRNA 为模板 (100 ng/μl)，分别使用专为 miRNA 逆转录定向改造的逆转录酶 ( Vazyme #MR201 ) 和未定向改造的逆转录酶（其余组分与 Vazyme #MR201 一致）进行逆转录反应，在相同条件下对逆转录反应得到的 cDNA 进行 qPCR 检测 2 个体系。可以看到，使用 Vazyme #MR201 逆转录 miRNA 后 qPCR 检测得到的熔解曲线单峰且峰形优异，特异性更高。



## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

## ● 产品组分

组分	MR201-01 (20 rxns)	MR201-02 (50 rxns)
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	1 ml	1 ml
2 × miRNA RT Mix <sup>a</sup>	200 μl	500 μl
HiScript miRNA Enzyme Mix <sup>b</sup>	40 μl	100 μl
Universal reverse Q primer <sup>c</sup> (10 μM)	500 μl	1.25 ml

a. 包含 dNTP、逆转录引物等。

b. 包含 RNase inhibitor。

c. 用于后续 qPCR 定量的反向通用引物。

## ● 注意事项

- 防止 RNase 污染：保持实验区域洁净；操作时需穿戴干净的手套、口罩；实验所用的离心管、枪头等耗材均需保证 RNase-free。
- 反应液的配制请在冰上操作完成。

## ● 实验流程

1. 在 RNase-free 离心管中配制如下混合液：

组分	体积
2 × miRNA RT Mix	10 μl
HiScript miRNA Enzyme Mix	2 μl
Total RNA/miRNA*	100 ng ~ 2 μg
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	to 20 μl

\* 反应中使用的 Total RNA 必须含有 miRNA。

用移液器轻轻吹打混匀。

2. 按下列条件进行第一链 cDNA 合成反应：

温度	时间
37°C	60 min
85°C	5 min

▲ 反应得到的 cDNA 可立即或稀释后用于荧光定量，对于高丰度表达的 miRNA，可根据具体的 C<sub>T</sub> 值，稀释 10 ~ 1,000 倍。

▲ cDNA 应避免反复冻融，短期保存建议存放 -20°C；长期保存建议存放 -70°C。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

## 3、茎环法 miRNA 实时荧光定量 PCR

Vazyme 提供 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 miRNA 定量反应的专用预混液——miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix ( Vazyme #MQ101 )，茎环法 miRNA cDNA 一链合成的专用试剂盒 Vazyme #MR101 后续定量时，需搭配使用 Vazyme #MQ101。

## ● Vazyme #MQ101 产品优势

- 广泛的平台适用性：兼容不同平台 qPCR 仪器，而无需进行 ROX 浓度调整。
- 超高的扩增特异性：可以区分单个碱基的差异，对于序列保守性很高的 miRNA 家族序列可以进行很好的区分。
- 配套 miRNA 茎环引物设计软件及配套软件的定量下游通用引物。

## ● Vazyme #MQ101 实验案例——超高的扩增特异性

miRNA 序列短，同一家族不同成员序列极其相似，有些仅有单个碱基差别，因此特异性对 miRNA 定量至关重要。Vazyme #MQ101 以化学法热启动 AceTaq® DNA Polymerase 为核心酶，配以优化的 Buffer，能够较大限度区分 miRNA 同一家族不同成员间单个碱基的差异，实现高特异性定量。

模板名称	序列信息
let-7b	UGAGGUAGUAGGUUGU <b>G</b> GGUU
let-7c	UGAGGUAGUAGGUUGUAU <b>G</b> GUU
let-7d	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU
let-7e	UGAGGUAG <b>G</b> AGGUUGUAUAGUU

Synthetic target DNA	Primer			
	let-7b	let-7c	let-7d	let-7e
let-7b	100%	9%	0%	0%
let-7c	8%	100%	0%	0%
let-7d	0%	0%	100%	0%
let-7e	0%	0%	0%	100%

## ● 产品组分

组分	MQ101-01 (125 rxns)	MQ101-02 (500 rxns)
2 × miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix <sup>a</sup>	1.25 ml	4 × 1.25 ml
mQ Primer R (10 μM) <sup>b</sup>	70 μl	250 μl

a. 包含 dNTP, Mg<sup>2+</sup>, AceTaq DNA Polymerase, SYBR Green I, Specific ROX Reference Dye 等。

b. 序列为 AGTGCAGGGTCCGAGGTATT。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

## ● 定量引物设计

- 正向引物：建议将 miRNA 序列除去 3' 末端 6 个碱基的剩余部分作为 miRNA 正向特异性引物，并将其中的 U 替换为 T。
- 反向引物：茎环法的 qPCR 反向通用引物为茎环逆转录引物中茎环结构序列的一部分。

## ● 实验流程

- 在 qPCR 管中配制如下混合液：

组分	体积
2 × miRNA Universal SYBR qPCR Master Mix	10.0 $\mu$ l
Specific Primer (10 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
mQ Primer R (10 $\mu$ M)*	0.4 $\mu$ l
Template DNA/cDNA	x $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	to 20.0 $\mu$ l

\* mQ Primer R 与本公司 miRNA Design 软件设计的逆转录引物配套，所用茎环序列为 GTCGTATCCAGT GCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGAC；当使用不同的茎环序列时，需自行设计合成 qPCR 逆向引物。

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整：

- 一般说来反应体系中引物终浓度为 0.2  $\mu$ M 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时，可以在终浓度 0.1 ~ 1.0  $\mu$ M 范围内调整引物浓度。
- qPCR 灵敏度极高，建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中，这样可以有效提高实验的重复性。
- 如模板类型为未稀释 cDNA 原液，使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

- 按下列条件进行 qPCR 反应：

Stage 1	预变性	Reps: 1	95°C	5 min
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95°C	10 sec

▲ 仪器类型不同，熔解曲线采集程序不尽相同，使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

## 4、加尾法 miRNA 实时荧光定量 PCR

Vazyme 提供 SYBR Green I 嵌合荧光法进行 qPCR 反应的专用预混液——ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix ( Vazyme #Q711 )。miRNA 加尾法合成 cDNA 的专用试剂盒 Vazyme #MR201 后续定量时，需搭配使用 Vazyme #Q711。

## ● Vazyme #Q711 产品优势

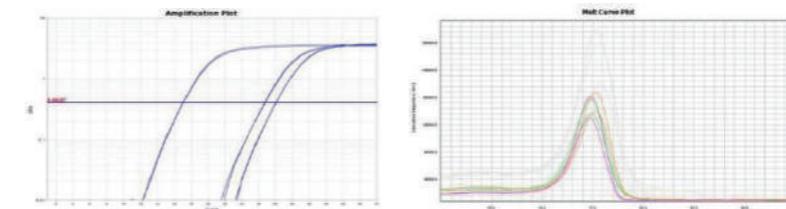
- 广泛的平台适用性：兼容不同平台 qPCR 仪器，而无需进行 ROX 浓度调整。
- 超高的扩增特异性：可以有效避免引物二聚体和非特异性扩增的产生。
- 卓越的扩增灵敏度：预混液在宽广的模板区间具有优秀的线性关系，同时可检测出具有个位数拷贝的待测模板。
- 优秀的程序兼容性：预混液可用标准程序和快速程序定量，完美解决程序的兼容性。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

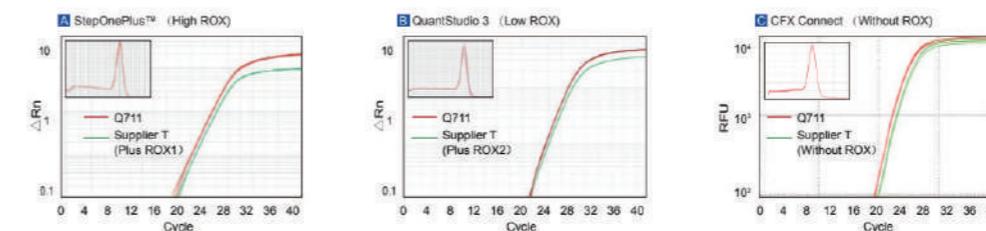
## ● Vazyme #Q711 实验案例——超高的扩增特异性

以 HeLa miRNA 为模板 ( 100 ng/ $\mu$ l )，使用专为 miRNA 逆转录定向改造的逆转录酶 ( Vazyme #MR201 ) 进行逆转录反应，将得到的 cDNA 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix ( Vazyme #Q711 ) 进行定量检测，结果显示 Q711 预混液具有超高的扩增特异性，适配 Vazyme #MR201 。



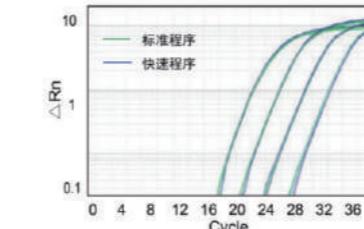
## ● Vazyme #Q711 实验案例——广泛的平台适用性

使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix ( Vazyme #Q711 ) 在不同类型的 qPCR 仪 ( 机型：StepOnePlus™、QuantStudio 3、CFX Connect ) 上扩增 GAPDH 基因，定量结果优异。说明 Vazyme #Q711 预混液仪器适用性广，无需针对不同仪器调整 ROX 浓度。



## ● Vazyme #Q711 实验案例——优秀的程序兼容性

使用 Vazyme #Q711 预混液检测 HeLa 细胞 cDNA 样本 ( 进行 4 个 10 倍梯度的稀释 ) 中 TBP 基因 ( 扩增子长度：227 bp ) 的表达，分别选择标准程序和快速程序上机 ( 机型：StepOnePlus™ ) 。结果显示，Vazyme #Q711 预混液能够完美兼容标准与快速程序的定量检测。



	预变性	变性	退火与延伸	总时间
标准程序	95 °C 30 s	95 °C 10 s	60 °C 30 s	90 min
快速程序	95 °C 30 s	95 °C 3 s	60 °C 10 s	40 min

▲ 标准程序和快速程序均采用 40 个循环。

## ● 产品组分

组分	Q711-02 (500 rxns)	Q711-03 (2500 rxns)
2 × ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix*	4 × 1.25 ml	5 × Q711-02

\* 包含 dNTP, Mg<sup>2+</sup>, Champagne Taq DNA Polymerase, SYBR Green I, Specific ROX Reference Dye 等。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

## ● 注意事项

- 若发现 Master Mix 解冻后有些许白色沉淀,请室温下放置片刻并上下颠倒,沉淀溶解后使用。
- 本品尽量避免反复冻融,以免造成酶活下降。如每次使用量较少,推荐小份分装使用。
- 使用前请上下颠倒以混匀 Master Mix,请勿 vortex 避免产生气泡,影响定量结果。Master Mix 经混匀短暂离心后即可使用。加样过程中吹打要轻,如果操作不慎 Master Mix 起泡,需再次离心方可使用。
- 由于本品中含有荧光染料 SYBR Green I,因此需避光保存,配制反应体系时应尽量避免强光照射。
- 由于本品检测灵敏度极高,易被空气中气溶胶污染。因此反应体系配制时请于超净工作台内进行,配制过程中请使用灭菌枪头、反应管,条件容许的实验室推荐使用专用的移液枪和带滤芯的枪头。

## ● 定量引物设计

- 正向引物:**
  - 建议根据完整 miRNA 序列设计 miRNA 正向特异性引物,并将其中的 U 替换为 T。
  - 若根据 miRNA 序列设计的正向特异性引物退火温度过低,建议在引物 5' 端增加几个碱基(以 G 和 C 为主),增加碱基需验证引物特异性,以免造成非特异性扩增;若引物退火温度过高,建议删去 5' 端几个碱基。
  - 对于 miRNA 前体等长片段非特异性扩增,建议在正向特异性引物 3' 端增加 1 ~ 3 个 A 碱基。
  - 对于序列相似的 miRNA,建议正向特异性引物 3' 端终止于差异碱基,若由于引物长度过短而导致退火温度过低,可在引物 5' 端增加几个碱基,使上下游引物 Tm 值匹配。
- 反向引物:** MR201 提供用于 qPCR 检测的反向通用引物 Universal reverse Q primer,退火温度约为 60 ~ 66 °C。

## ● 实验流程

- 在 qPCR 管中配制如下混合液:

组分	体积
2 × ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10.0 μl
Primer1 (10 μM)	0.4 μl
Primer2 (10 μM)	0.4 μl
Template DNA/cDNA	x μl
ddH <sub>2</sub> O	to 20.0 μl

反应体系中各成分的量可根据以下原则自行调整:

- ▲ 一般来说反应体系中引物终浓度为 0.2 μM 即可得到较好的扩增效果。当反应性能比较差时,可以在终浓度 0.1 ~ 1.0 μM 范围内调整引物浓度。
- ▲ qPCR 灵敏度极高,建立反应体系时加入模板量的准确程度对最终定量结果会有很大的影响。推荐将模板稀释后加入反应体系中,这样可以有效提高实验的重复性。
- ▲ 如模板类型为未稀释 cDNA 原液,使用体积不应超过 qPCR 反应总体积的 1/10。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

## 2. 按下列条件进行 qPCR 反应:

Stage 1	预变性 <sup>a</sup>	Reps: 1	95°C	30 sec
Stage 2	循环反应	Reps: 40	95°C	3 ~ 10 sec <sup>b</sup>
			60°C	10 ~ 30 sec <sup>c</sup>

a. 该预变性条件适合绝大多数扩增反应,如模板结构复杂,可将预变性时间延长至 3 min 以提高预变性效果。

b. 标准程序选择 10 sec; 快速程序最短可选 3 sec。

c. 标准程序选择 30 sec; 快速程序: 对于 200 bp 以内的扩增子,延伸时间最短可设为 10 sec; 超过 200 bp 时,推荐延伸时间为 30 sec。

▲ 仪器类型不同,熔解曲线采集程序不尽相同,使用仪器默认熔解曲线采集程序即可。

备忘录

## ◆ 四、miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR 的常见 FAQ

## 1、miRNA 逆转录的常见 FAQ

## ● 茎环法 Vazyme # MR101 能否用于加 Poly (A) 尾法逆转录?

不能。MR101 是通过茎环法逆转 miRNA,利用茎环引物在逆转录酶的作用下获得 cDNA。而加 Poly (A) 尾法体系中含有两个酶的作用,首先是 Poly (A) 聚合酶在单链 RNA 的 3' 端加上一串 Poly (A) 尾,然后利用体系中的 Oligo dT 通用型引物在逆转录酶的作用下进行逆转录反应。MR101 中没有 Poly (A) 聚合酶,故不能用于 Poly (A) 尾法逆转录。

## ● miRNA 采用茎环法进行逆转录时,可以在一管中同时添加多个逆转录引物吗?

不可以。茎环法逆转 miRNA,一管反应中只能逆转内参或者一个 miRNA,不同引物需要分管逆转。在一管中同时投入多个茎环引物进行多个 miRNA 逆转时,不同特异性茎环引物茎环结构之间会产生相互干扰和影响。

## ● 为什么茎环法 Vazyme # MR101 带基因组清除组分,而加尾法 Vazyme # MR201 不带基因组清除组分?

因为 MR201 中的 Poly (A) 聚合酶 (PAP) 不能对基因组 DNA 进行加尾,逆转录引物无法识别基因组 DNA,所以 MR201 中不带专门基因组清除的组分。

## 2、实时荧光定量 PCR 的常见 FAQ

## ● miRNA 推荐使用的内参:

small nucleolar RNA ( snoRNA ) 长度约为 60 ~ 300 nt 左右,在多种组织细胞中高表达,不涉及 miRNA 的调节途径,所以 snoRNA 是很好的内参选择。研究证实常用的 snoRNA assays 包括:

Human: U6、RNU48、RNU44、U47;

Mouse: U6、snoRNA-202、snoRNA-234、snoRNA-420;

还有一类是在不同实验条件下变化差异很小的 miRNA:

Human/mouse tissues: miR-152、-186、-25、-92、-26b、-16;

Human/mouse cell lines: miR-374、-16、-93、-186、-26b;

还有一类是传统沿用的 18S rRNA or U6。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

## ● 茎环法 miRNA 做逆转、定量时，内参的逆转录引物和 qPCR 引物如何设计？

以常用的 U6 内参为例，U6 的序列足够长，因此不需要设计茎环引物（当内参产物长度在 80 bp 以上时就不需要设计茎环引物），U6 在逆转录的时候投入 qPCR 下游引物即可，U6 在逆转录时投入的 qPCR 下游引物是当做逆转录的特异性引物去逆转的，后续 qPCR 定量的时候还是要正常投入上下游引物。

## 常规 qPCR 引物设计原则：

产物长度 80 ~ 200 bp、3' 端应尽量避免高 GC 或高 AT 含量区域、正反向引物的 Tm 值最好相差不要超过 1 °C、GC 含量 (40 % ~ 60 %)。

适用于小鼠和人的样本的 U6 内参 qPCR 引物为：

Forward primer: CTCGCTTCGGCAGCACA

Reverse primer: AACGCTTCACGAATTCGCGT

## ● 加尾法 miRNA 做逆转、定量时，内参的逆转录引物和 qPCR 引物如何设计？

加尾法逆转录可以对提取纯化的所有 mRNA 和 miRNA 进行无差别加尾，因此不需要对内参做单独处理。

适用于小鼠和人的样本的 U6 内参 qPCR 引物为：

Forward primer: CTCGCTTCGGCAGCACA

Reverse primer: Vazyme #MR201 中提供 qPCR 下游引物 Universal reverse Q primer

## ● 扩增曲线形状异常？

- 扩增曲线不光滑：信号太弱，经系统矫正后产生，提高模板浓度重复实验。
- 扩增曲线断裂或下滑：模板浓度较高，基线的终点值大于  $C_T$  值。减小基线终点 ( $C_T$  值 -4)，重新分析数据。
- 个别扩增曲线突然骤降：反应管内留有气泡，处理样本时要注意离心，进行扩增反应之前要仔细检查反应管内是否有气泡残留。

## ● 反应结束无扩增曲线出现？

- 反应循环数不够：一般设置循环数为 40，但需要注意的是过多的循环会增加过多的背景信号，降低数据可信度。
- 确认程序中是否设置了信号采集步骤：两步法扩增程序一般将信号采集设置在退火延伸阶段；三步法扩增程序应当将信号采集设置在 72 °C 延伸阶段。
- 确认引物是否降解：长时间未用的引物应先通过 PAGE 电泳检测完整性，以排除其降解的可能。
- 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解：重新制备模板，重复实验。

●  $C_T$  值出现太晚？

- 扩增效率极低：优化反应条件，尝试三步法扩增程序，或者重新设计合成引物。
- 模板浓度太低：减少稀释度重复实验，一般未知浓度的样品先从最高浓度做起。
- 模板降解：重新制备模板，重复实验。
- 体系中存在 PCR 抑制剂：一般为模板带入，加大模板稀释倍数或者重新制备模板重复实验。

## 第三章：miRNA 逆转录及实时荧光定量 PCR

备忘录

## ● 阴性对照出现明显扩增？

- 反应体系污染：更换新的 Mix、水、引物重复实验。反应体系在超净工作台内配制，减少气溶胶污染。
- 引物二聚体的出现：配合熔解曲线进行分析。

## ● 绝对定量时标准曲线线性关系不佳？

- 加样误差：提高模板稀释倍数，提高加样体积。
- 标准品降解：重新制备标准品，重复实验。
- 模板浓度太高：提高模板稀释倍数。

## ● 熔解曲线出现多峰？

- 引物设计不优：根据设计原则设计合成新的引物。
- 引物浓度太高：适当降低引物浓度。
- cDNA 模板带有基因组污染：重新制备 cDNA 模板。

## ● 实验重复性差？

- 加样体积失准：使用性能较好的移液枪；将模板做高倍稀释，以大体积加入反应体系中。
- 定量 PCR 仪不同位置温度控制不一致：定期校准仪器。
- 模板浓度太低：模板浓度越低，重复性越差，减少模板稀释度或提高加样体积。

## 第四章：Small RNA 建库

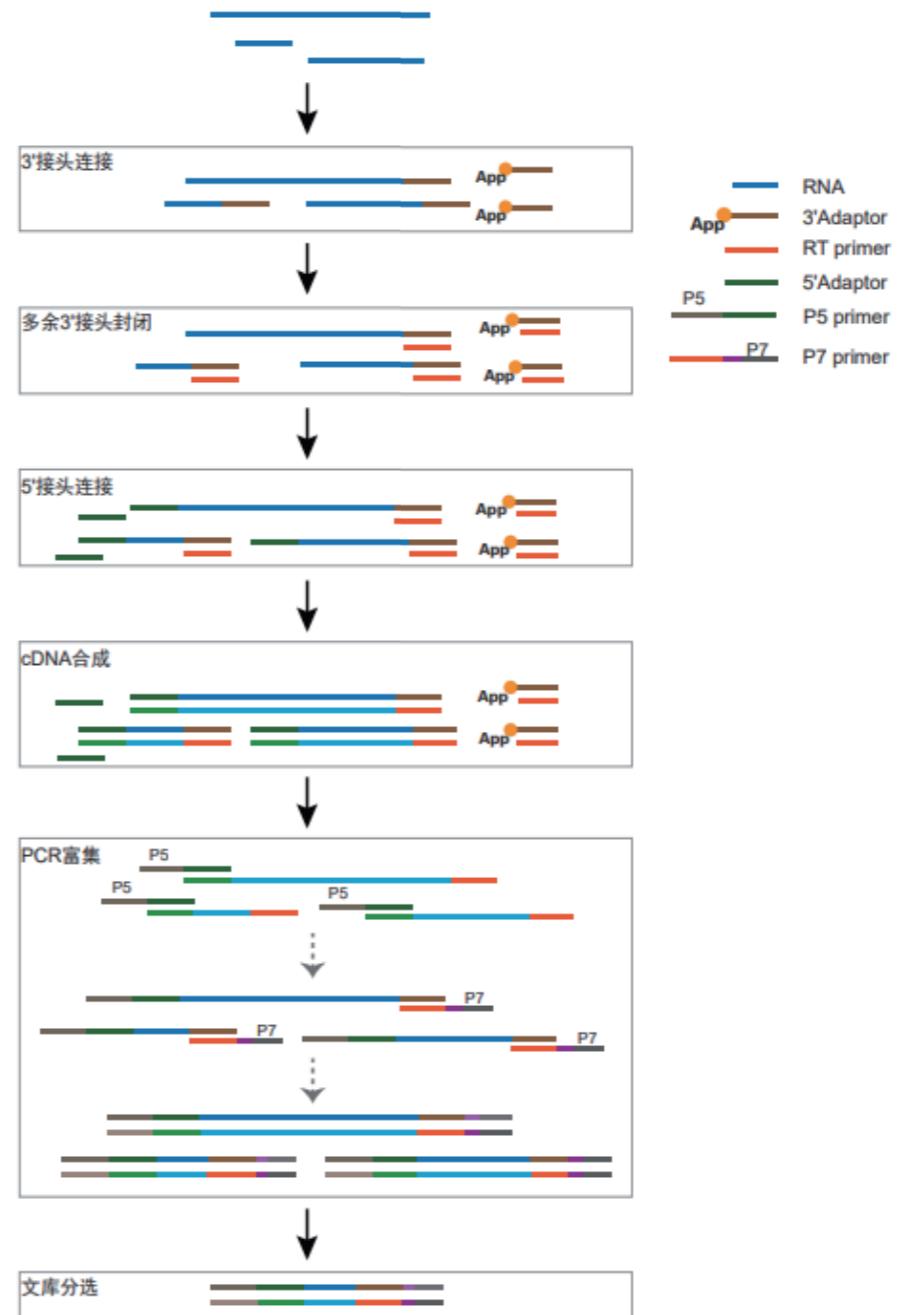
Vazyme

备忘录

## ◆ 一、Small RNA 的概念

Small RNA 是长度小于 200 nt 的一类非编码 RNA，承担着关键性的调控功能，主要包括三类，分别是 miRNA、piRNA 以及 siRNA，其中以 miRNA 研究最为广泛。Small RNA 的 5' 和 3' 末端分别有自由的磷酸基和羟基，正是基于这一结构特点，Small RNA 测序采用 5'、3' 两端连接接头法进行 Small RNA 文库构建。

## ◆ 二、Small RNA 建库的原理



## 第四章：Small RNA 建库

- 一、Small RNA 的概念
- 二、Small RNA 建库的原理
- 三、Small RNA 建库的操作流程
- 四、Small RNA 建库的常见 FAQ

## 第四章：Small RNA 建库

## 备忘录

## 1. 3' 接头连接

将 RNA 和 3' 接头置于 70°C 条件下进行变性，打开 RNA 及 3' 接头可能存在的二级结构。

利用酶将 Small RNA 的 3' 羟基和 3' 通用接头进行连接。

## 2. 多余 3' 接头封闭

为了防止多余的 3' 接头与 5' 接头连接产生接头二聚体，在 5' 接头连接之前，需要将多余的 3' 接头进行封闭。封闭是通过加入 RT Primer 与多余的 3' 接头反向互补形成双链结构，从而有效阻止其与 5' 接头连接，达到减少接头二聚体的目的。

## 3. 5' 接头连接

5' 接头连接是基于 Small RNA 的 5' 端含有磷酸基团，利用酶将 5' 接头与 Small RNA 进行连接。如需要测试的 Small RNA 5' 端不含磷酸基团，则连接不上 5' 接头。5' 接头为 RNA 接头，自身可能形成二级结构，使用前需要将 5' 接头的二级结构打开。

## 4. cDNA 合成

利用 3' 接头封闭时加入的 RT Primer 作为引物进行逆转录合成 cDNA。

## 5. PCR 富集

使用带有 P5、P7 的引物进行文库富集。

## 6. 文库分选

扩增后的文库会有扩增引物残留及 rRNA 污染。纯化后的文库推荐使用 PAGE 胶进行分选，可直观获得目的条带。也可以使用双轮磁珠分选，但分选范围较广，得到的 Small RNA 文库纯度较低。分选后的文库 miRNA 在 147 bp 处左右。

## ◆ 三、Small RNA 建库的操作流程

## ● Small RNA 建库

Vazyme 针对 Illumina 高通量测序平台定向开发的 Small RNA 文库构建专用试剂盒——VAHTS Small RNA Library Prep Kit for Illumina ( Vazyme #NR801 )。

## ● Vazyme #NR801 产品优势

1. 文库丰度高：接头污染少，有效文库比例高，miRNA 比例高、覆盖种类多，文库数据质量可靠。
2. 样本兼容范围广：动、植物细胞 / 组织总 RNA，分离纯化的 Small RNA，以及其他类型总 RNA（如外泌体总 RNA）均可作为起始模板；起始模板投入低至 100 ng 总 RNA。
3. 多种纯化方式可选：NR801 中包含文库构建所需的所有组分，提供磁珠分选和 PAGE 胶分离两种文库纯化方式，可根据起始文库质量任意选择。

## ● Vazyme #NR801 实验案例——文库丰度高

以 HeLa 细胞总 RNA 为起始模板，投入量分别为 1 μg 和 100 ng；其中 V1、V2 为使用 VAHTS Small RNA Library Prep Kit for Illumina ( Vazyme #NR801 ) 构建的两个平行重复的 Small RNA 文库，N 代表使用 N 公司的 Small RNA 文库构建试剂盒构建的文库，I 代表使用 I 公司的 Small RNA 文库构建试剂盒构建的文库。基本数据指标显示 Vazyme #NR801 构建的 Small RNA 文库接头污染率低、有效文库比例高，数据比对显示 miRNA 比例高，miRNA 及 piRNA 种类多。

## 第四章：Small RNA 建库

## 备忘录

Sample_name	High_quality	3'adapter_null or insert_null	5'adapter_contaminants	Smaller_tags (less than 18nt)	Clean_reads_rate	mapping_rate	已知miRNA种数	新miRNA种数	piRNA种数	miRNA rate
V1-1 μg	99.73%	1.57%	0.13%	7.87%	90.42%	88.20%	795	40	424	75.68%
V2-1 μg	99.72%	2.55%	0.10%	6.56%	90.81%	88.92%	818	52	423	75.99%
N-1 μg	99.83%	4.09%	0.14%	9.25%	86.47%	70.22%	760	27	376	56.50%
I-1 μg	99.74%	3.29%	0.41%	15.96%	80.26%	84.90%	829	70	388	68.21%
V1-100 ng	99.72%	6.53%	0.24%	8.72%	84.52%	86.67%	792	69	358	70.08%
V2-100 ng	99.75%	7.01%	0.27%	10.47%	82.23%	88.07%	729	74	375	70.27%
N-100 ng	99.77%	8.33%	0.23%	8.17%	83.15%	72.33%	723	59	385	51.12%
I-100 ng	99.71%	13.13%	2.04%	17.39%	67.29%	84.75%	764	50	320	67.69%

## ● 产品组分

组分	NR801-01(24 rxns)	NR801-02(96 rxns)
RL3 Adaptor	24 μl	96 μl
RL3 Buffer	240 μl	960 μl
RL3 Enzyme mix	72 μl	288 μl
RT Primer	24 μl	96 μl
RL5 Adaptor	24 μl	96 μl
RL5 Buffer	24 μl	96 μl
RL5 Enzyme mix	60 μl	240 μl
RT Buffer	192 μl	768 μl
RT Enzyme mix	48 μl	192 μl
Amplification mix 3	1.2 ml	4 × 1.2 ml
pBR322/MspI digest DNA Marker	120 μl	480 μl
6 × Loading Buffer	500 μl	2 × 1 ml
Co-precipitator	120 μl	480 μl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	500 μl	2 × 1 ml
GE Buffer	6 ml	24 ml
Filtration Column	24 个	96 个

## 第四章：Small RNA 建库

备忘录

## ● 自备材料

## 1. Small RNA Index Primer

VAHTS Small RNA Index Primer Kit for Illumina ( Vazyme #N813-816 )。

## 2. RNA 质控

Agilent RNA 6000 Pico Kit ( Agilent #5067-1513 )。

## 3. 文库质控

Agilent DNA 1000 kit ( Agilent #5067-1504 )、Agilent High Sensitive Kit ( Agilent #5067-4626 )。

## 4. 文库纯化

VAHTS DNA Clean Beads ( Vazyme #N411 )。

## 5. 文库分选

## 5.1 PAGE 胶分选

6% Novex TBE PAGE gel 1.0 mM 10-well ( Life Technologies #EC6265BOX )、5 × TBE、Ultra GelRed Nucleic Acid Stain ( Vazyme #GR501 ) 或 SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain ( Life Technologies #S11494 )、3 M 醋酸钠 ( pH 5.2 )、无水乙醇、新鲜配制的 80% 乙醇。

## 5.2 磁珠分选

VAHTS DNA Clean Beads ( Vazyme #N411 )、新鲜配制的 80% 乙醇。

## 6. 其他必备材料

Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O、RNase-free PCR 管、低吸附 EP 管 ( Eppendorf #022431021 )；Agilent 2100 Bioanalyzer 或其他等效产品、PCR 仪、磁力架、-80℃ 冰箱、水浴锅、离心机。

## ● 注意事项

## 1. 试剂盒各组分应于标注条件下保存：

1.1 接头 RL5 Adaptor 为 RNA 接头，请置于 -85 ~ -65℃ 保存。

1.2 试剂盒中的各酶类组分，请置于 -20℃ 保存。使用前混匀并进行短暂离心，避免粘附于管壁及管盖，造成损失；使用时应置于冰上，使用后及时按条件保存，否则会导致酶活降低。

1.3 RL3 Buffer 比较粘稠，解冻混匀后请短暂离心收集至管底，避免液体粘附于管盖和管壁，导致试剂损失。

## 2. RNA 样品质控：

为保证建库质量，实验开始前请对 RNA 样品进行质控，RNA 样品总量、纯度和完整性应满足以下条件：

2.1 以总 RNA 为起始模板，请使用 Small RNA 专用提取试剂盒提取 RNA 样品，确保所使用的提取方法不会损失 Small RNA。

2.2 总 RNA 模板的起始投入量应 ≥100 ng，若起始投入量过低，不能确保文库构建成功。

2.3 OD<sub>260/280</sub> 比值介于 1.8 ~ 2.2 之间，使用 Bioanalyzer 进行 RNA 完整性检测，RIN 值 ≥7；使用琼脂糖凝胶电泳检测，则 28S:18S≥1.5，且无蛋白质和基因组污染。

## 3. 操作过程注意事项：

3.1 实验过程中请使用 RNase-free 的枪头、EP 管、PCR 管，吸取不同样品时请更换枪头。

3.2 请佩戴手套、口罩操作，接触 RNase-free 空间外设备或其他工作区间后，请更换手套。

3.3 所有的试剂使用后请立即盖上管盖，避免污染。

## 第四章：Small RNA 建库

备忘录

3.4 实验过程中如需暂停，请严格按照使用方法中注明的可停放点将样品置于合适的温度下保存，不正确的停放可能会降低建库成功率。

## ● 实验流程

## 1. 3' 接头连接

将 RL3 Adaptor、RL3 Buffer、RL3 Enzyme mix 取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

## 1.1 模板与接头变性

将 RNA 底物自身以及 RNA 底物之间可能存在的二级结构打开。在 RNase-free 的 PCR 管中配制反应体系，如起始模板投入大于 100 ng，则按照下表配制反应体系；如起始模板投入为 100 ng，需使用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 将 3' 接头 RL3 Adaptor 进行 1:1 稀释，再按照下表配制反应体系：

组分	体积
RNA	1 ~ 6 μl
RL3 Adaptor*	1 μl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	x μl
Total	7 μl

\* 请根据起始模板投入量稀释接头，如接头使用量过多可能导致最终文库中接头二聚体增加。

1.2 将 PCR 管置于提前预热至 70℃ 的 PCR 仪中反应 2 min，反应结束后立即取出置于冰上 2 min。

1.3 向 1.2 的反应管中依次加入如下组分：

组分	体积
1.2 产物	7 μl
RL3 Buffer	10 μl
RL3 Enzyme mix	3 μl
Total	20 μl

1.4 使用移液器吹打 10 ~ 15 次充分混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于热盖的 PCR 仪中运行如下程序：

温度	时间
25℃	1 h
4℃	hold

▲ RL3 Buffer 和 RL3 Enzyme mix 均比较粘稠，吸取时请尽量缓慢，以保证吸取体积准确。

▲ 该步骤的反应混合液比较粘稠，请使用移液器进行吹打混匀。

## 第四章：Small RNA 建库

## 2. 多余 3' 接头封闭

将 RT Primer 取出后解冻并混匀，短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

2.1 如起始模板投入量大于 100 ng，则按照下表配制反应体系；如起始模板投入量为 100 ng，需使用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 将 RT Primer 进行 1:1 稀释，再按照下表配制反应体系：

组分	体积
1.4 产物	20 μl
RT Primer	1 μl
RNase-free ddH <sub>2</sub> O	4.5 μl
Total	25.5 μl

2.2 使用移液器吹打 10 ~ 15 次混匀，短暂离心收集至管底。置于热盖的 PCR 仪中运行如下程序：

温度	时间
75°C	5 min
37°C	15 min
25°C	15 min
4°C	hold

## 3. 5' 接头连接

将 5' 接头 RL5 Adaptor、RL5 Buffer 和 RL5 Enzyme mix 取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用，以下所有步骤均在冰上操作。

## 3.1 5' 接头变性

5' 接头 RL5 Adaptor 自身可能形成二级结构，使用前需变性打开二级结构。按照反应个数 N，取 N × 1.1 μl 5' 接头 RL5 Adaptor 于 RNase-free 的 PCR 管中；如起始模板投入量为 100 ng，需使用 RNase-free ddH<sub>2</sub>O 对 RL5 Adaptor 进行 1:1 稀释；将 PCR 管置于提前预热至 70°C 的 PCR 仪中反应 2 min，反应结束后立即取出置于冰上 2 min。

## 3.2 按照下表配制 5' 接头连接反应体系：

组分	体积
2.2 产物	25.5 μl
变性 RL5 Adaptor	1 μl
RL5 Buffer	1 μl
RL5 Enzyme mix	2.5 μl
Total	30 μl

## 第四章：Small RNA 建库

3.3 使用移液器吹打 10 ~ 15 次充分混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于热盖的 PCR 仪中运行如下程序：

温度	时间
25°C	1 h
4°C	hold

## 4. cDNA 合成

将 RT Buffer 和 RT Enzyme mix 取出，解冻并混匀、短暂离心收集至管底，置于冰上备用。

## 4.1 按照下表配制逆转录反应体系：

组分	体积
3.3 产物	30 μl
RT Buffer	8 μl
RT Enzyme mix	2 μl
Total	40 μl

4.2 使用移液器吹打 10 ~ 15 次充分混匀，短暂离心收集反应液至管底。将反应管置于热盖的 PCR 仪中运行如下程序：

温度	时间
50°C	1 h
80°C	5 min
4°C	hold

▲ 该步骤反应产物可于 -20°C 存放 24 h。

## 5. 文库富集

将 Universal Primer、Index Primer 和 Amplification mix 3 取出，解冻混匀后置于冰上备用。

## 5.1 按照下表配制反应体系：

组分	体积
4.2 产物	40 μl
Amplification mix 3	50 μl
Universal Primer	2.5 μl
Index Primer	2.5 μl
Nuclease-free ddH <sub>2</sub> O	5 μl
Total	100 μl

## 第四章：Small RNA 建库

备忘录

5.2 将上述反应液混匀，短暂离心收集至管底。将反应管置于热盖的 PCR 仪中运行如下反应程序：

温度	时间
94°C	3 min
94°C 65°C 72°C	N cycles { 15 sec 15 sec 15 sec}
72°C	1 min
4°C	hold

反应循环数参考如下表：

模板投入	循环数
1 μg	12 ~ 13
500 ng	13 ~ 14
200 ng	14 ~ 15
100 ng	15 ~ 16

▲ 不同样本的 Small RNA 含量差异较大，上表的参考反应循环数是依据 293T 细胞总 RNA 和小鼠肝脏组织总 RNA 为测试样本得到的参考数据。

▲ 该步骤反应产物可于 -20°C 存放 24 h。

## 6. PCR 产物纯化

6.1 将 VAHTS DNA Clean Beads 提前 30 min 从 2 ~ 8°C 取出，静置使其平衡至室温。

6.2 颠倒或涡旋振荡使 VAHTS DNA Clean Beads 充分混匀，吸取 180 μl (1.8 ×) 加入到 PCR 产物中，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。

6.3 室温孵育 10 min，使 DNA 结合到磁珠上。

6.4 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后（约 10 min），小心移除上清。

6.5 保持样品始终处于磁力架上，加入 200 μl 新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温孵育 30 sec，小心移除上清。

## 6.6 重复 6.5 一次。

6.7 保持样品始终处于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约 5 ~ 10 min。

▲ 加入 80% 乙醇时不要吹散磁珠。

▲ 最后移除上清时需使用 10 μl 移液器将残留液体吸干净，避免磁珠过分干燥（龟裂）而降低回收效率。

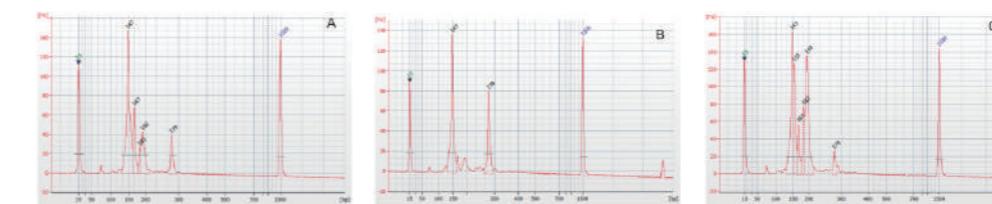
6.8 将样品从磁力架上取出，加入 30 μl Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O，使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min 后置于磁力架上，待溶液澄清后（约 5 min），小心吸取 27.5 μl 上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。

▲ 洗脱产物可在 -20°C 暂存一周；除磁珠纯化外，PCR 产物也可使用对 200 bp 以下 DNA 片段有较高回收效率的 PCR 产物专用纯化试剂盒进行纯化。

6.9 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测文库：取 1 μl 纯化后的 PCR 产物用 Agilent DNA 1000 chip 分析，由于 2100 迁移率的影响，最终文库的主峰分布可能存在约 6 ~ 8 bp 偏差，如下图所示：miRNA 文库的峰在 143 ~ 147 bp 处，piRNA 文库的峰在 153 ~ 156 bp 处。

## 第四章：Small RNA 建库

▲ 不同样本中 Small RNA 含量和种类均有差别，不同长度的 miRNA、piRNA 及其他 Small RNA 的比例也有差异，最终文库主峰的位置也可能存在几个碱基的偏差。



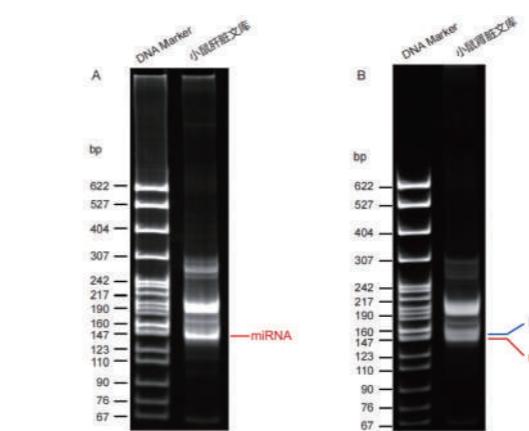
注：A 图和 B 图分别为 1 μg、100 ng 小鼠肝脏总 RNA 起始的 Small RNA 文库，147 bp 处的主峰为 miRNA；C 图为 1 μg 小鼠肾脏总 RNA 起始的 Small RNA 文库，147 bp 处的主峰为 miRNA，153 bp 处的主峰为 piRNA。

## 7. 文库分选

根据 6.9 步骤中文库质控的结果选择文库分选纯化方式，如 2100 图显示 120 bp 处有较多接头二聚体、70 ~ 80 bp 处有较多扩增引物残留以及 160 bp 和 190 bp 处有明显的 rRNA，则建议选择 PAGE 胶分离；如接头二聚体、扩增引物残留以及 rRNA 较少则可以选择磁珠进行文库分选。为确保最终有效文库的比例，建议使用 PAGE 胶进行文库分选。

### 方案 A：6% 非变性 PAGE 胶分选文库

- (1) 将 6% 10 孔非变性 PAGE 胶装置于电泳槽中，向其中加入适量 1 × TBE 电泳缓冲液。
- (2) 向纯化的 PCR 产物中加入 5 μl 6 × Loading Buffer 混匀后离心收集至管底。
- (3) 取 5 μl pBR322/MspI digest DNA Marker 缓慢加入 PAGE 胶样孔中，然后再加入 10 μl 1 × Loading Buffer 进行平衡。
- (4) 将混有 Loading Buffer 的 PCR 产物缓慢加入 PAGE 胶样孔中，每个样品上两个样孔，每孔 15 μl。如有多个文库在同一 PAGE 胶上电泳，为避免样品间交叉污染，不同样品间需隔开一个样孔，空出的样孔可补加 15 μl 1 × Loading Buffer 进行平衡。
- (5) 上样完成后，120 ~ 150 V 电压电泳约 1 h，不同的电泳装置电泳迁移速率可能不一致，所需电泳时间有差异，待样孔中的 Loading Buffer 蓝色指示剂全部跑出胶板后约 3 ~ 5 min 方可停止电泳。
- (6) 将 PAGE 胶从电泳装置中取出，将 PAGE 胶从胶板上剥下。用 Gel-red 核酸染料染色 10 min，在凝胶成像仪中进行观察，如下图所示，大约 140 bp 和 150 bp 处的条带分别对应于 miRNA 文库和 piRNA 文库的条带。



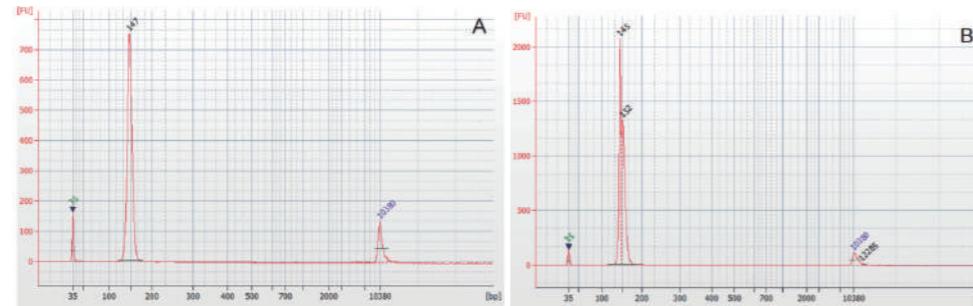
注：A 图为 1 μg 小鼠肝脏总 RNA 起始的 Small RNA 文库，红线指示的条带为 miRNA 文库；B 图为 1 μg 小鼠肾脏总 RNA 起始的 Small RNA 文库，红线指示的条带为 miRNA 文库，蓝线指示的条带为 piRNA 文库。

备忘录

## 第四章：Small RNA 建库

备忘录

- (7) 用刀片将对应的条带割下放于事先准备好的 500  $\mu\text{l}$  低吸附 EP 管中（管底已用酒精灯烧过的 1 ml 注射器针头戳了数个小洞），将 500  $\mu\text{l}$  EP 管套到 1.5 ml 低吸附 EP 管中，12,000 rpm (13,400  $\times g$ ) 离心 2 min 碾碎胶条。胶条的碾碎程度取决于 500  $\mu\text{l}$  EP 管底部小洞的孔径，所以只需使用注射器针头戳穿即可。
- (8) 离心完成后弃掉 500  $\mu\text{l}$  EP 管，向装有 PAGE 胶碎片的 1.5 ml EP 管中加入 250  $\mu\text{l}$  GE Buffer，于 50°C 水浴锅中温育 1 ~ 2 h。
- (9) 将步骤 8 的 EP 管于离心机中 12,000 rpm (13,400  $\times g$ ) 离心 2 min，蒸发到管壁的液体收集至管底。
- (10) 将步骤 9 的上清转移至离心过滤柱 Filtration Column 中 12,000 rpm (13,400  $\times g$ ) 离心 2 min 收集液体，弃去离心柱，将液体转移至新的 1.5 ml 低吸附 EP 管中。
- (11) 向步骤 10 的上清中分别依次加入 5  $\mu\text{l}$  Co-precipitator, 30  $\mu\text{l}$  3M 醋酸钠 (pH 5.2) 和 1 ml 无水乙醇，振荡混匀后于 -80°C 沉淀 1 h。
- (12) 取出 -80°C 沉淀产物，于预冷至 4°C 的冷冻离心机中 12,000 rpm (13,400  $\times g$ )，离心 30 min。
- (13) 小心移除上清，注意切勿吸取到白色沉淀。向 EP 管中加入 1 ml 新鲜配制的 80% 乙醇，于预冷至 4°C 的冷冻离心机中，12,000 rpm (13,400  $\times g$ ) 离心 10 min。
- (14) 小心移除上清，注意切勿吸取到白色沉淀。短暂离心将管壁上残留的液体收集至管底，小心移除残留液体，室温开盖干燥约 10 min。
- (15) 待步骤 14 产物中残留的酒精全部挥发，加入 15  $\mu\text{l}$  Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O 溶解沉淀。
- (16) 2100 检测分选纯化的文库：取 1  $\mu\text{l}$  分选纯化的产物用 Agilent DNA 1000 chip 或 Agilent high sensitive chip 分析，良好的文库应该如图所示，对应的 miRNA 文库条带在 147 ~ 149 bp 处。



注：A 图为 1  $\mu\text{g}$  小鼠肝脏总 RNA 起始的 Small RNA 文库 PAGE 胶纯化后对应的 2100 图；B 图为 1  $\mu\text{g}$  小鼠肾脏总 RNA 起始的 Small RNA 文库 PAGE 胶纯化后对应的 2100 图。

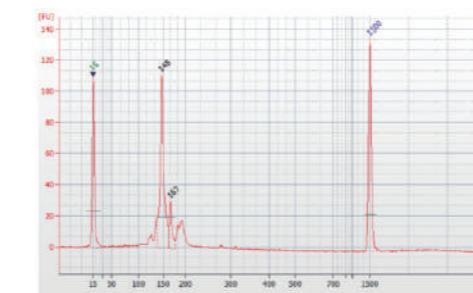
## 方案 B：双轮磁珠分选文库

- (1) 将 VAHTS DNA Clean Beads 提前 30 min 从 2 ~ 8°C 取出，静置使其温度平衡至室温。
- (2) 颠倒或涡旋振荡使 VAHTS DNA Clean Beads 充分混匀，取 25  $\mu\text{l}$  纯化的 PCR 产物于 200  $\mu\text{l}$  PCR 管中吸取 32.5  $\mu\text{l}$  磁珠 (1.3  $\times$ ) 加入到 PCR 产物中，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。
- (3) 室温孵育 10 min，使 DNA 结合到磁珠上。
- (4) 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心移取上清至新的 Nuclease-free PCR 管中。
- (5) 向步骤 4 的产物中加入 22.5  $\mu\text{l}$  磁珠 (0.9  $\times$ )，使用移液器轻轻吹打 10 次充分混匀。
- (6) 室温孵育 10 min，使 DNA 结合到磁珠上。
- (7) 将样品置于磁力架上，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心弃去上清。

## 第四章：Small RNA 建库

备忘录

- (8) 保持样品始终处于磁力架上，加入 200  $\mu\text{l}$  新鲜配制的 80% 乙醇漂洗磁珠，室温下孵育 30 sec，小心移除上清。
- (9) 重复步骤 8 一次。
- (10) 保持样品始终处于磁力架上，室温下开盖干燥磁珠约 5 ~ 10 min。加入 80% 乙醇时不要吹散磁珠；最后移除上清时需要使用 10  $\mu\text{l}$  移液器将残留液体吸干净；应避免磁珠过分干燥（龟裂）而降低回收效率。
- (11) 将样品从磁力架上取出，加入 17.5  $\mu\text{l}$  Nuclease-free ddH<sub>2</sub>O，使用移液器轻轻吹打充分混匀，室温静置 2 min 后置于磁力架上，待溶液澄清后 (约 5 min)，小心吸取 15  $\mu\text{l}$  上清至一个新的 Nuclease-free PCR 管中。
- (12) 2100 检测分选纯化的文库：取 1  $\mu\text{l}$  分选纯化的产物用 Agilent DNA 1000 chip 或 Agilent high sensitive chip 分析，良好的文库应该如图所示，对应的 miRNA 文库条带在 147 ~ 149 bp 处。



注：1  $\mu\text{g}$  小鼠肝脏总 RNA 起始的 Small RNA 文库磁珠分选后对应的 2100 图。

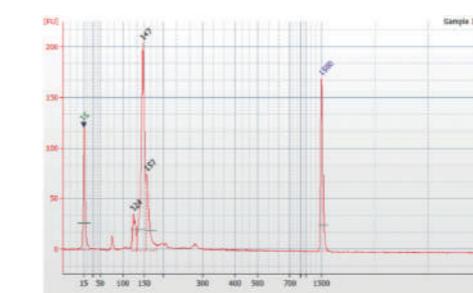
## ◆ 四、Small RNA 建库的常见 FAQ

## ● RT primer 能否在 cDNA 合成步骤添加？

不能。3' 接头连接完成后加入的 RT primer 与多余 3' 接头反向互补形成双链结构，可以有效阻止 5' 接头与 3' 接头连接，从而减少接头二聚体的形成；另外，RT primer 与已连上 3' 接头的 RNA 底物方向互补可作为逆转录步骤的引物，因此 RT primer 必须在 3' 接头连接完成之后添加。

## ● 除常规的动植物总 RNA 外，其他类型的总 RNA 是否可以作为起始模板进行文库构建？

除动、植物总 RNA 以及分离纯化的 Small RNA 外，Vazyme #NR801 可以兼容其他类型的总 RNA，比如外泌体总 RNA 作为起始模板。下图为以 HeLa 细胞培养物上清的外泌体总 RNA 为模板构建的 miRNA 文库（起始模板投入 80 ng）。





**Vazyme Online**

了解更多产品和服务信息, 请登录我们的网站 [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

**南京诺唯赞生物科技股份有限公司**

销售咨询: [sales@vazyme.com](mailto:sales@vazyme.com) 电话: 400-600-9335

技术支持: [support@vazyme.com](mailto:support@vazyme.com) 网址: [www.vazyme.com](http://www.vazyme.com)

技术服务: [service@vazyme.com](mailto:service@vazyme.com) 地址: 江苏省南京经济技术开发区科创路红枫科技园 C2 栋

