

HB miR Multi Assay Kit™

使用说明手册

北京赛百盛基因技术有限公司

地址：北京市海淀区上地四街1号院2号楼202室

邮编：100085

电话：010-62969345/46, 010-82784296/92

传真：010-82784290

Email：info@sbsbio.com

公司主页：<http://www.sbsbio.com>

目录

I.	简介-----	2
II.	产品组成-----	2
III.	HB microRNA 定量系统-----	3
IV.	HB microRNA 技术-----	4
	◆ HB miR Multi Assay kit™的miRNA表达分析-----	4
	◆ HB miR Multi Assay kit™的敏感度测验-----	5
	◆ miRQC实验-----	7
	◆ 检测let-7e的对比试验-----	9
	◆ HB miR Multi Assay kit™与其他同类产品的对比-----	11
	◆ HB miR Multi Assay kit™的高反应性-----	13
V.	使用流程-----	19
VI.	可兼容设备-----	21
VII.	订购信息-----	21

I. 简介

MicroRNAs (miRNAs) 是一类细胞内生的很小的单链非编码RNA分子，长度大约为22个核苷酸。miRNAs在后转录阶段调控基因表达，在大量人类疾病（比如癌症，血管类疾病，免疫类疾病和传染类疾病）中起到一定作用，并且可以在很多疾病的治疗过程中作为有效的靶目标。miRNAs的检测具有很重要的价值，不仅有助于增进我们对miRNA分子功能的理解，另一方面可以作为未来可能的一种有效的人类疾病诊断检测方法。

在miRNA分析中 HB miR Multi Assay kit™ 的特点：

- 多种分析方式
- 实时荧光定量PCR (SYBR Green荧光染料以及双标记TaqMan® 探针)
- 电泳分析
- DNA测序分析

II. 产品组成

HB miR Multi Assay kit™ 系统 I

Product	Components	
HB_I RT Reaction kit	1. HB_I Nucleic mix I	HB_I RT-Primer
		dNTP
		ATP
	2. HB_I miR Multi buffer	HB_I RT buffer
	3. HB_I miR Enzyme mix	Poly A polymerase
		Reverse Transcriptase
HB_I Real-time PCR Master mix kit	4. HB_I Oligo	HB_I Oligo
	5. HB_I 2X SYBR Green Master mix [or qPCR Master Mix (dual-labeled probe)]	HB_I SYBR Green Master mix (or qPCR Master mix)
HB_I Nucleic mix II	6. HB_I Nucleic mix II	HB_I Extension sequence
		HB_I Primer mix
	7. HB_I Dual-labeled Probe +	HB_I Dual-labeled Probe

HB miR Multi Assay kit™ 系统 II

Product	Components	
HB_II Nucleic mix I	1. HB_II Nucleic mix I	HB_II Spec. Primer
		dNTP
HB_II RT Reaction kit	2. HB_II 2X miR Multi buffer	HB_II RT buffer
	3. HB_II miR Enzyme mix	Reverse Transcriptase
	4. HB_II Oligo	HB_II Oligo
HB_II Real-time PCR Master mix kit	5. HB_II 2X SYBR Green Master mix [or qPCR Master mix (dual-labeled probe)]	HB_II SYBR Green Master mix (or qPCR Master mix)
HB_II Nucleic mix II	6. HB_II Nucleic mix II	HB_II Extension sequence
		HB_II Primer mix
	7. HB_II Dual-labeled Probe +	HB_II Dual-labeled Probe

III. HB microRNA 定量系统

系统 1: 从cDNA文库样品中检测多种miRNAs

- ◆ HB_I RT Reaction kit

HB_I RT Reaction kit 中包括 HB_I Nucleic mix I, HB_I miR Multi Buffer 以及 HB_I miR Enzyme mix。这个试剂盒能够在单管样品中进行一步到位逆转录反应。Poly A 聚合酶催化反应将腺苷酸加在 miRNA 的 3' 端, 然后与 M-MLV 逆转录酶及逆转录引物 (RT-Primer) 一起, 将带有 poly (A) 尾巴的 RNA 进行逆转录。

- ◆ HB_I Real-time PCR Master mix kit

HB_I Real-time PCR Master mix kit 内包含在实时 (Real-time) PCR 中使用的 HB_I 2X SYBR Green Mastermix [或 qPCR Master mix (dual-labeled probe)] 和 HB_I Oligo, 以及 HB_I Nucleic mix II。

- ◆ HB_I Nucleic mix II

HB_I Nucleic mix II 能够用来在 cDNA 中定量一段特定的 miRNA 序列。其中包括带有部分目标 miRNA 序列的引物混合物及扩展序列。

- ◆ HB_I Dual-labeled probe

双标记探针分子在 5' 端有一个荧光报告基团, 在 3' 端有一个荧光淬灭基团。HB_I Dual-labeled probes (双标记探针) 会在退火阶段与正反向引物位点中的一段互补序列特异性联结。HB_I Dual-labeled probes 需要与 qPCR Master mix 一同作用。

系统 2: 通过靶向 RT-Primer 检测特定 microRNA

- ◆ HB_II Nucleic mix I

HB_II Nucleic mix I 包括特定靶向的逆转录引物 (RT primer)。这个引物的作用是帮助扩展目标 miRNA 的 3' 端序列。

- ◆ HB_II RT Reaction kit

HB_II RT Reaction kit 包括 HB_II 2X miR Multi buffer 以及 HB_II miR Enzyme mix。使用这个试剂盒以及试剂 HB_II Nucleic mix I 可以从全 RNA 样品中逆转录得到 cDNA。

- ◆ HB_II Real-time PCR Master mix kit

HB_II Real-time PCR Master mix kit 包括在实时 (Real-time) PCR 中使用的 HB_II 2X SYBR Green Mastermix [或 qPCR Master mix (dual-labeled probe)] 和 HB_II Oligo, 以及 HB_II Nucleic mix II。

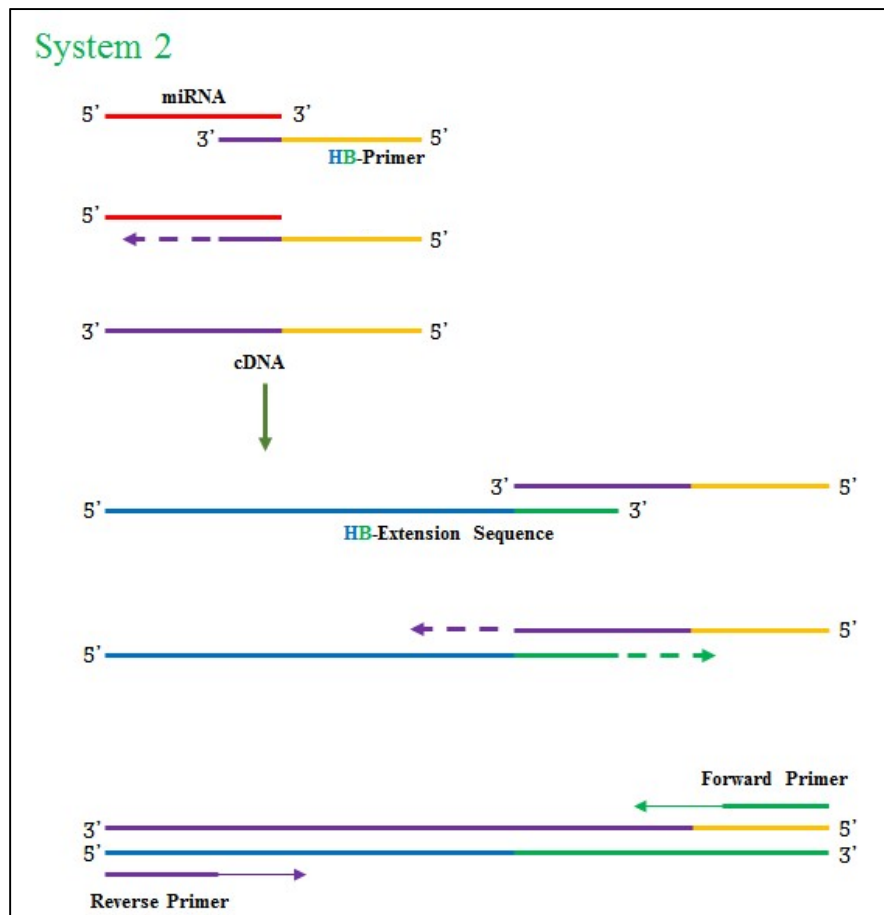
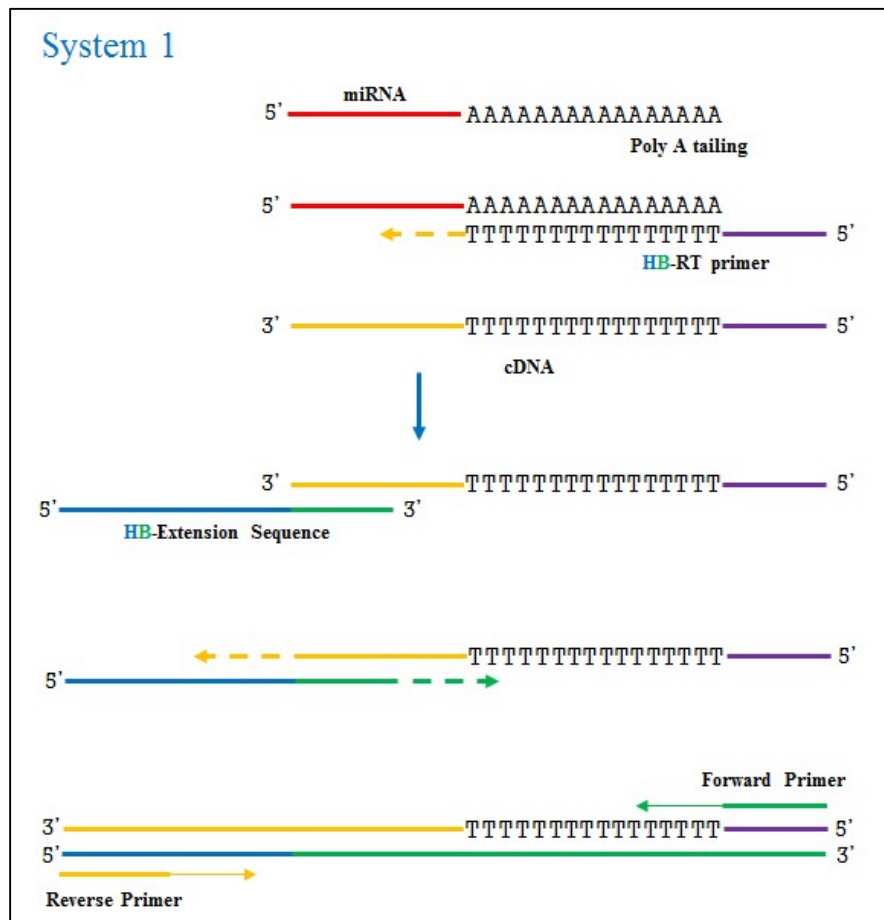
- ◆ HB_II Nucleic mix II

HB_II Nucleic mix II 能够用来在 cDNA 中定量某段特定的 miRNA 序列。其中包括带有部分目标 miRNA 序列的引物混合物及扩展序列。

- ◆ HB_II Dual-labeled probe

双标记探针分子在 5' 端有一个荧光报告基团, 在 3' 端有一个荧光淬灭基团。HB_II Dual-labeled probes (双标记探针) 会在退火阶段与正反向引物位点中的一段互补序列特异性联结。HB_II Dual-labeled probes 需要与 qPCR Master mix 一同作用。

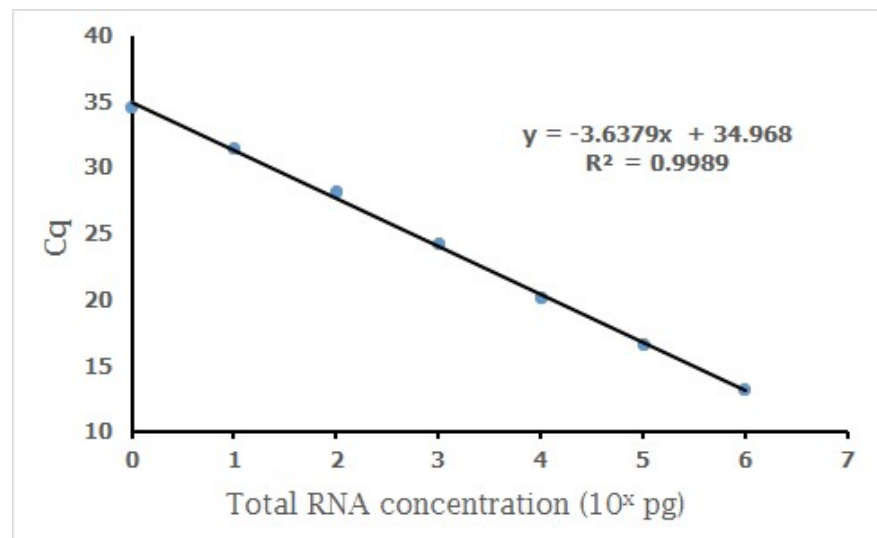
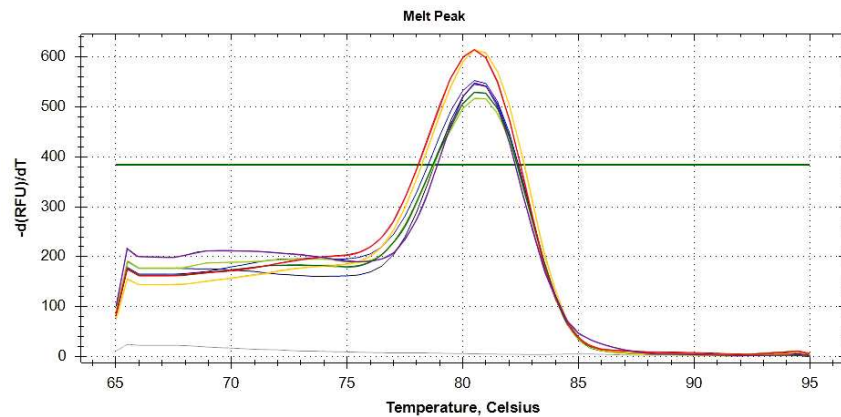
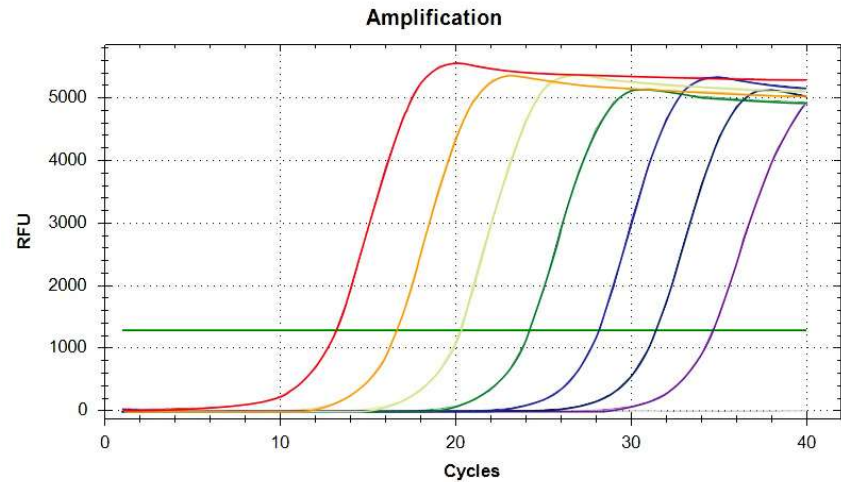
IV. HB microRNA技术 • HB miR Multi Assay kit™的miRNA表达分析



◆ HB miR Multi Assay kit™ 的敏感度测验

The HB miR Multi Assay kit™ 系统1和2均能提供miRNA的线性检测和定量分析。实验中使用了人脑全RNA并设置了从1 pg 到1 μg的含量梯度。

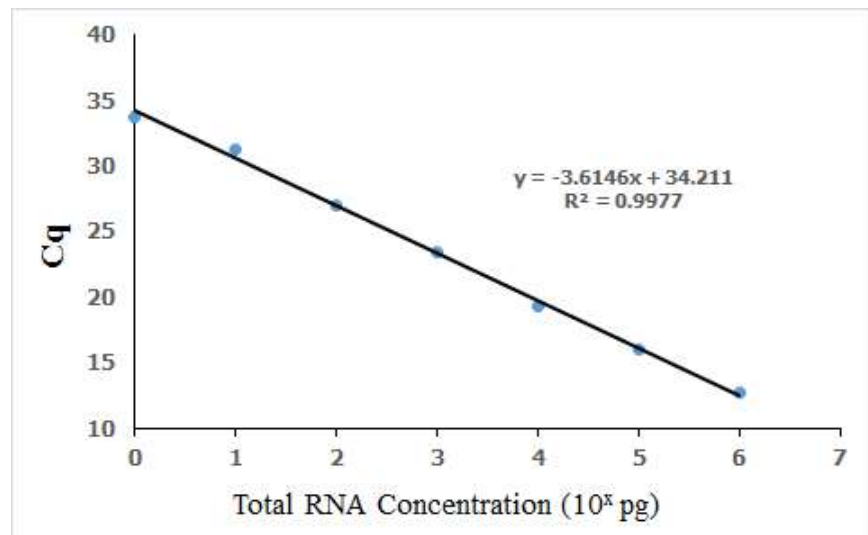
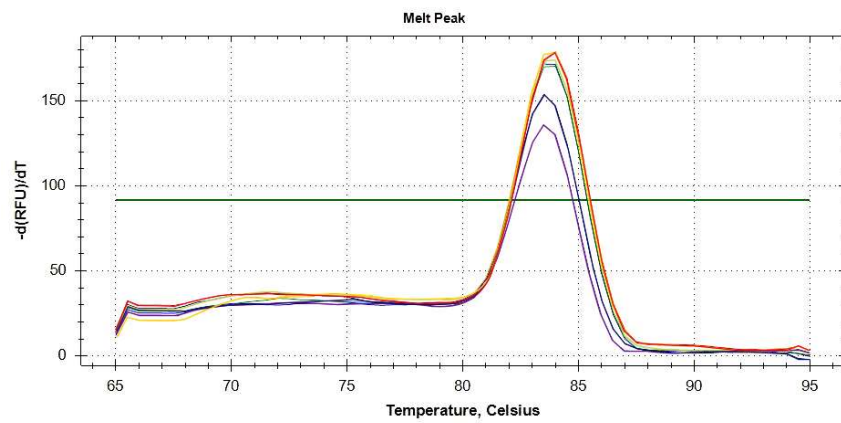
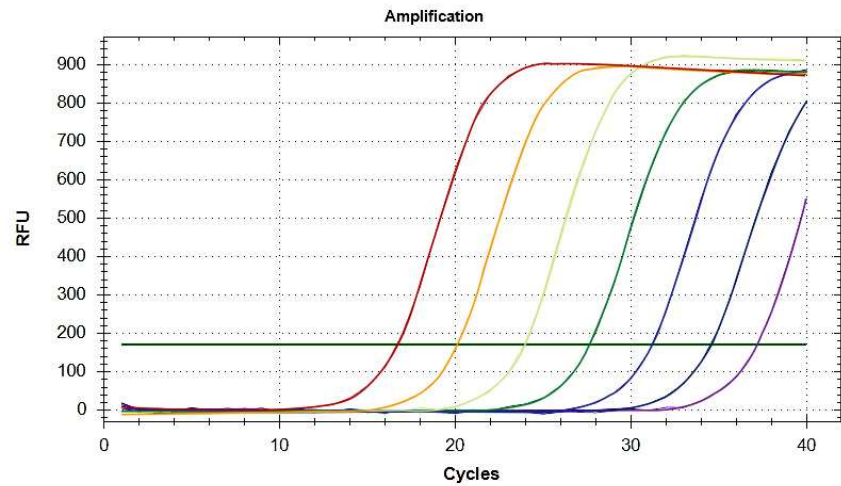
系统 1



Template: FirstChoice® Human Brain Reference Total RNA (Ambion, cat. No. AM6050)

Target miRNA: hsa-miR-106b-5p (MIMAT0000680 UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU)

系统 2



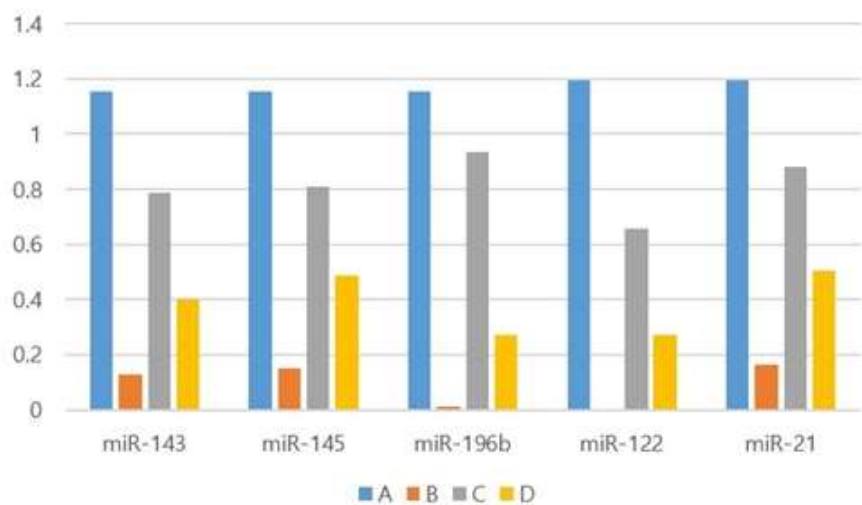
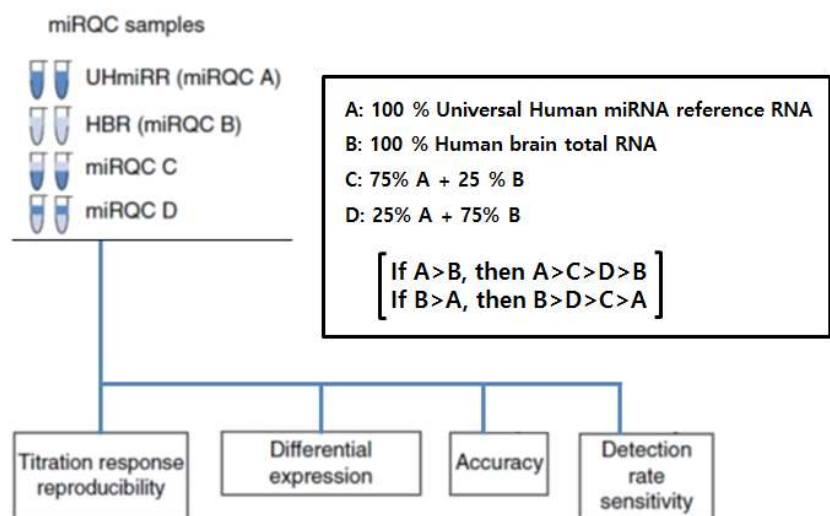
Template: FirstChoice® Human Brain Reference Total RNA (Ambion, cat. No. AM6050)

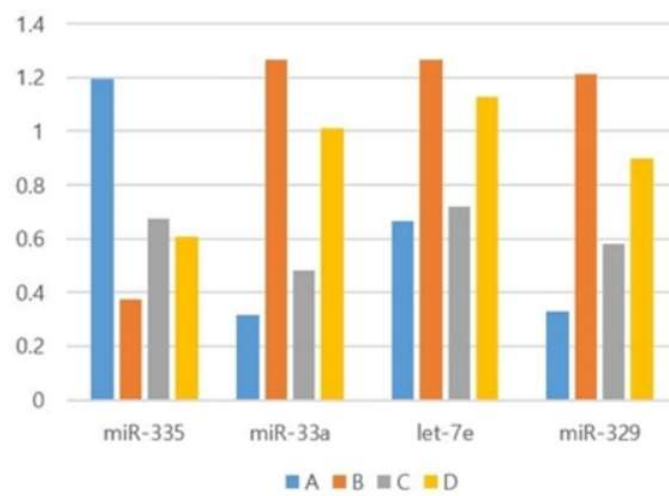
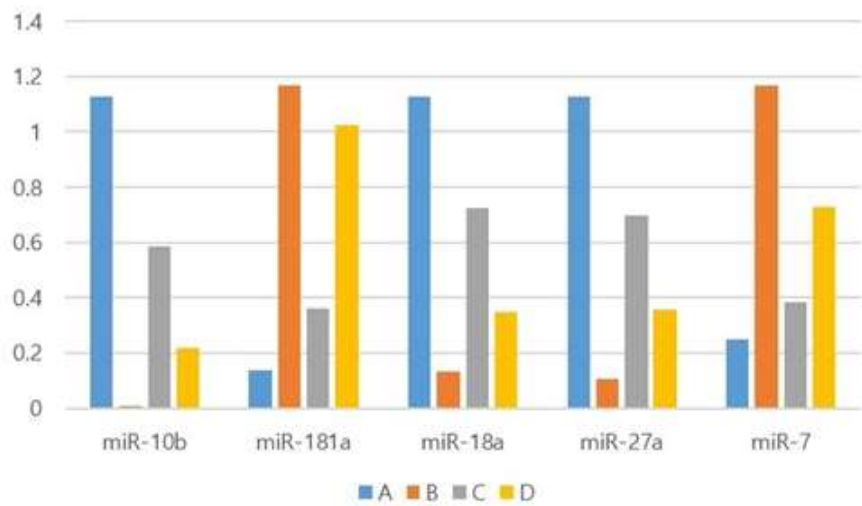
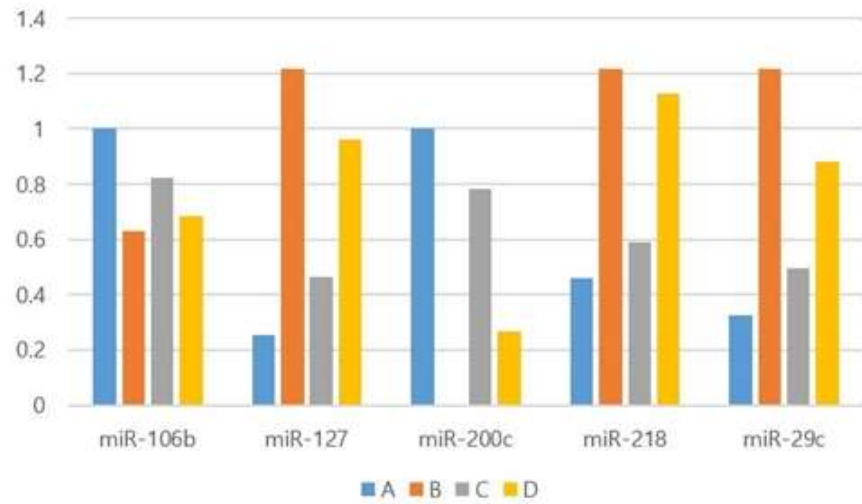
Target miRNA: hsa-miR-145-5p (MIMAT0000437 GUCCAGUUUCCCCAGGAUCCCU)

◆ miRQC实验

我们使用HB miR Multi Assay kit™对不同种类的miRNA进行了实验，结果见下图。该实验是基于对microRNA质量监控（miRQC）实验 (Nat Methods. 2014 Aug;11(8):809-15.) 中的miRNA表达平台的定量评估而进行的。对效果的评估标准中包括可重复性，差异表达，准确性以及检测率。

如果miRNA的表达在A中大于在B中 ($A > B$)，那么可以得出 $A > C > D > B$ ；如果反过来是 $B > A$ ，那么 $B > D > C > A$ 。因此我们得出结论，该实验结果与分析逻辑完全相符。



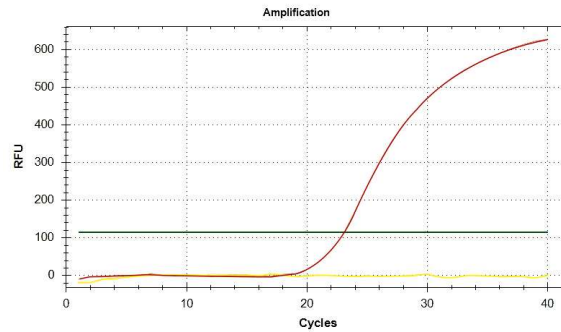


◆ 检测let-7e的对比试验

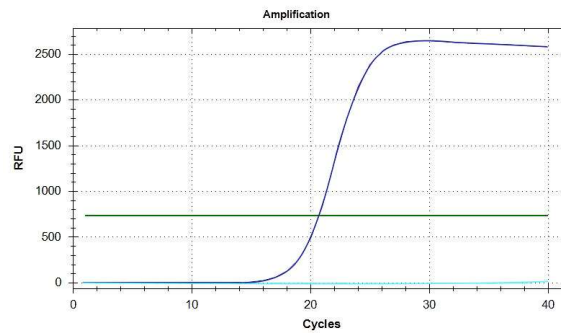
我们分别用HB miR Multi Assay kit™和市场上的其他同类产品(Competitor)进行了实时定量PCR的对比实验。实验中采用A549人肺癌细胞株作为模板。

当分析同类产品实验结果的熔解曲线时，其在低温段表现出非特异性。与其相比，我们的产品HB miR Multi Assay kit™的实验结果的熔解曲线表现出更显著的变化。这说明HB miR Multi Assay kit™比其他同类产品效果更好。

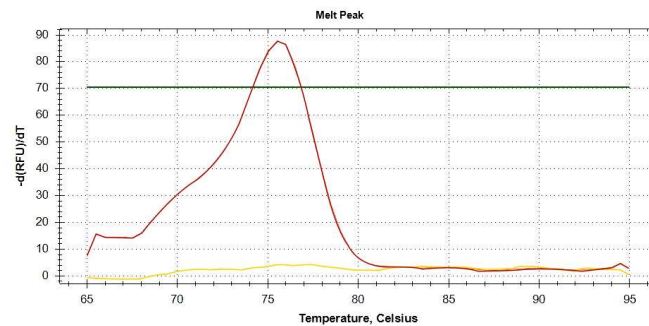
Competitor



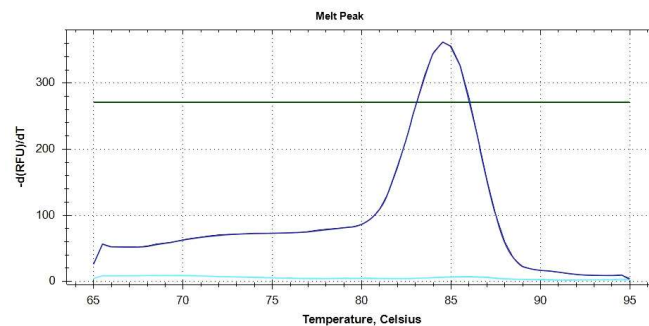
HB miR Multi Assay kit™



Competitor



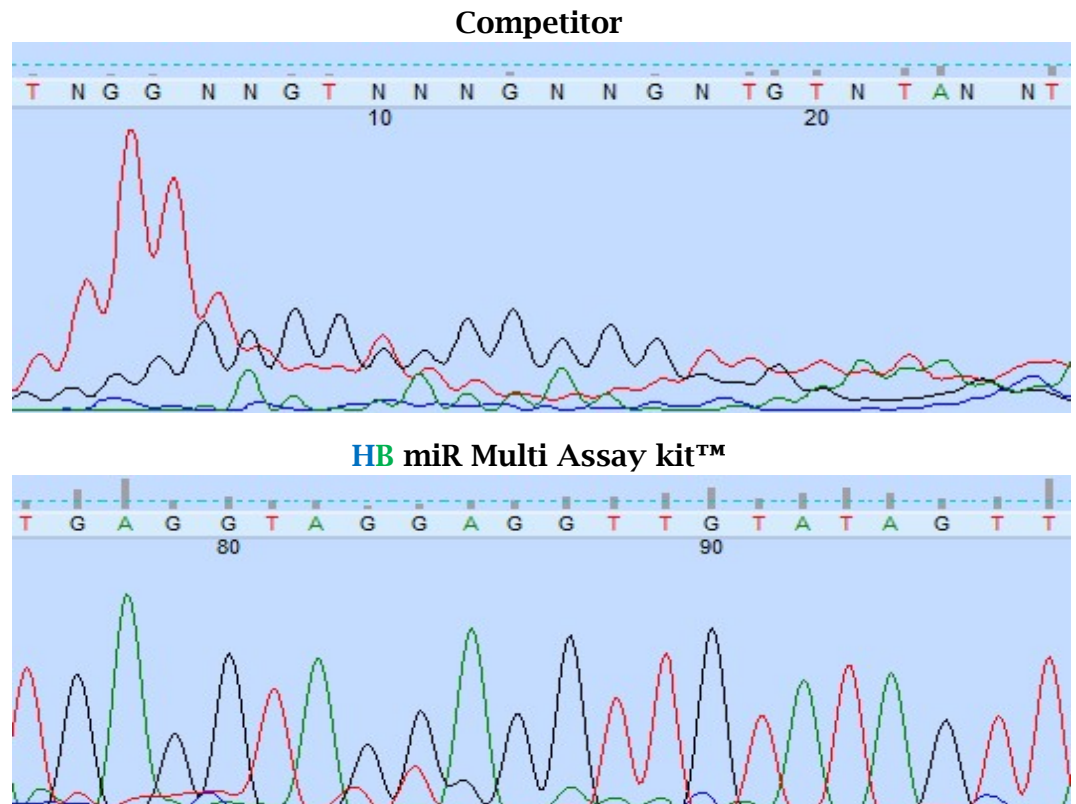
HB miR Multi Assay kit™



同时，我们确认了在只使用HB miR Multi Assay kit™时，PCR产物是可以进行测序分析的。我们对其他同类产品和我们的HB miR Multi Assay kit™的结果均进行了测序数据分析。同时，我们还在1.5% 琼脂糖凝胶中进行了电泳分析。凝胶电泳后纯化出来的DNA也用来进行了测序分析。

如图所示，HB miR Multi Assay kit™的序列准确地被分析出来。

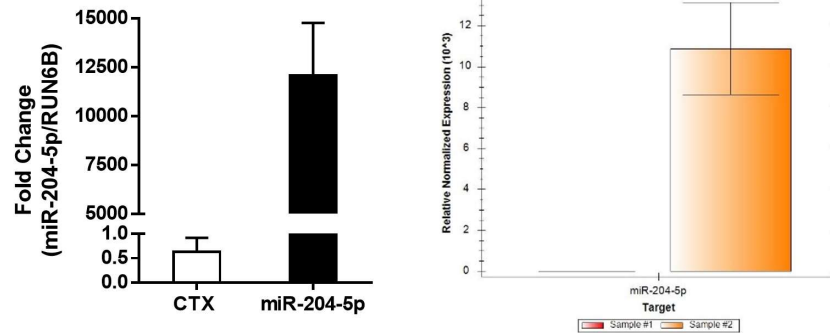
(c.f. the sequence of has-let-7e-5p : UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU)



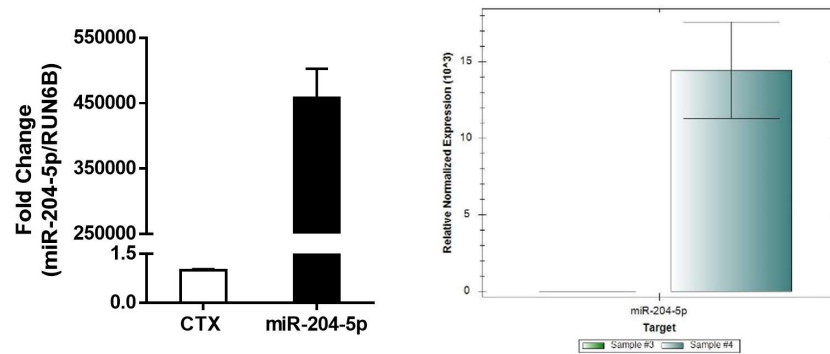
◆ HB miR Multi Assay kit™与其他同类产品的对比

我们从多种细胞株中提取了全RNA。其他同类产品(Competitor)的TaqMan®探针实验结果（见左图）以及HB miR Multi Assay kit™的实验结果（见右图），实验中使用RNU6B作内部对照。

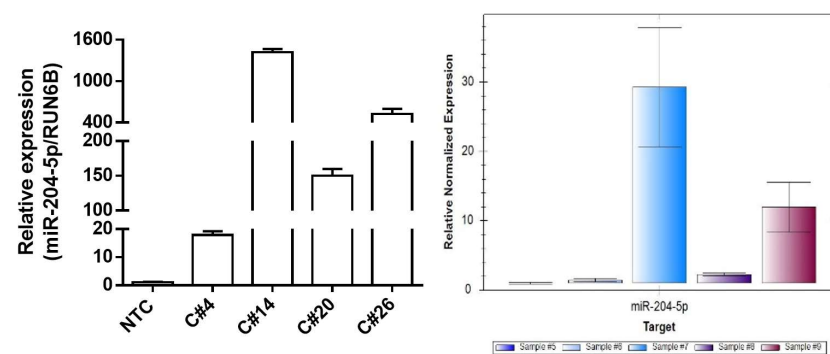
miR Base accession	miRNA	Sequence(5'→ 3')
MIMAT0000265	hsa-miR-204-5p	UCCCCUUGUCAUCCUAUGCCU



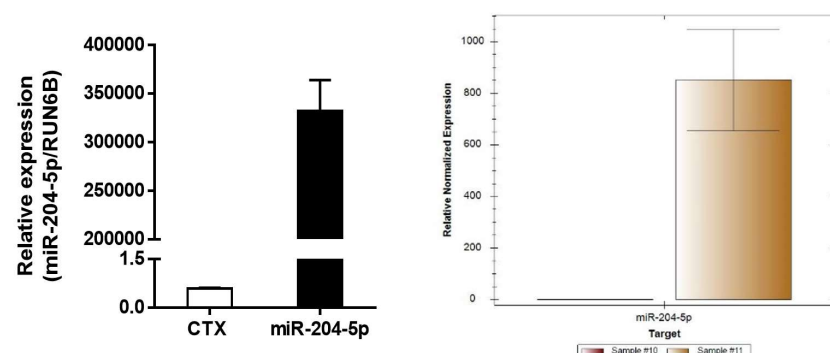
Sample 1-2: MDA-MB-231 (Transient transfection of miR-204-5p mimics)



Sample 3-4: MCF7 (Transient transfection of miR-204-5p mimics)



Sample 5-9: 4T1 (miR-204-5p stable expressing cell lines)

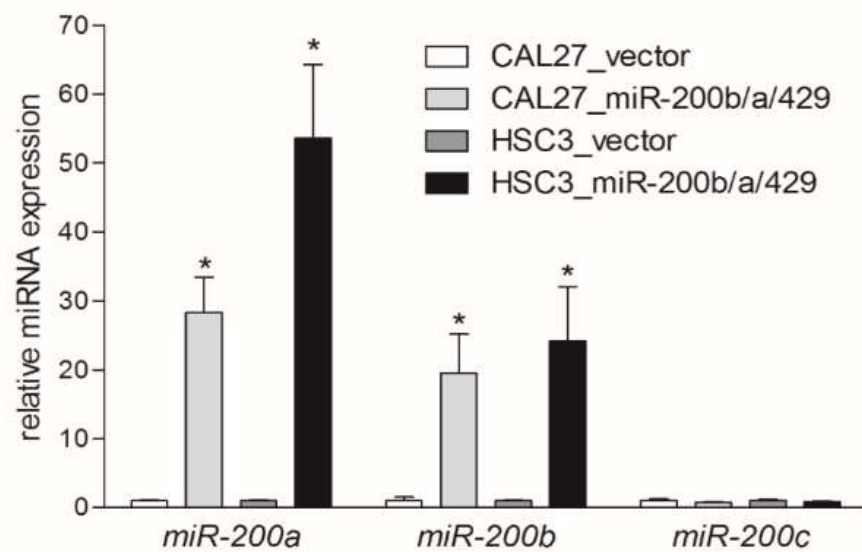


Sample 10-11: 4T1 (Transient transfection of miR-204-5p mimics)

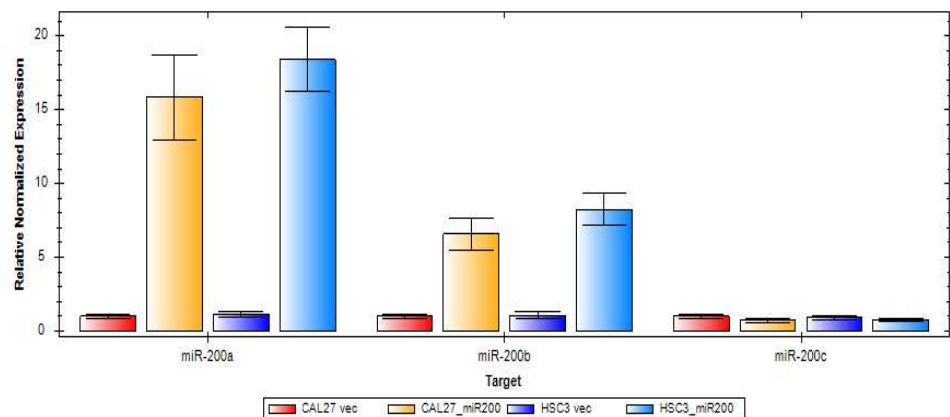
miR-200家族内部不同分子在序列上可能存在3-5个核苷酸的差异。在检测miR-200a, 200b和200c时, 其他同类产品的TaqMan® 探针实验结果以及 HB miR Multi Assay kit™的实验结果见下图。实验中使用RNU6B作内部对照。

miR Base accession	miRNA	Sequence(5'→ 3')
MIMAT0000682	hsa-miR-200a-3p	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU
MIMAT0000318	hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAGAUGA
MIMAT0000617	hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAAGAUGGA

Competitor



HB miR Multi Assay Kit™

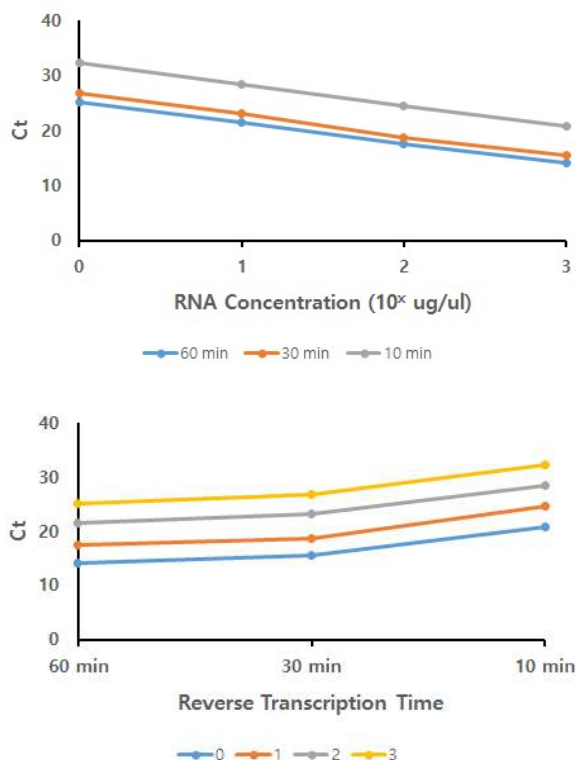


◆ HB miR Multi Assay kit™的高反应性

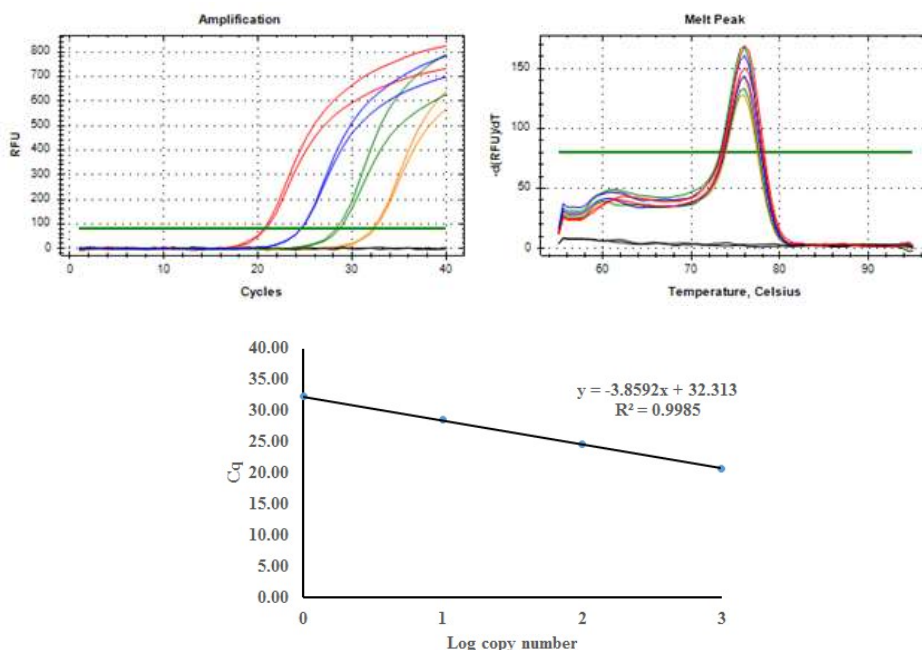
我们分别使用HB miR Multi Assay kit™和其他同类产品(Competitor)进行了时间控制的逆转录实验。在实验中使用A549人肺癌细胞株作为模板。

在分析其他同类产品的实验结果Ct值时，该值在缩短的逆转录时间实验组中出现了明显的上升。然而，我们的产品的实验结果中，即使在缩短了的逆转录时间实验组中，依然表现出了同样的Ct值，说明我们的产品HB miR Multi Assay kit™的反应性比其他同类产品更好。

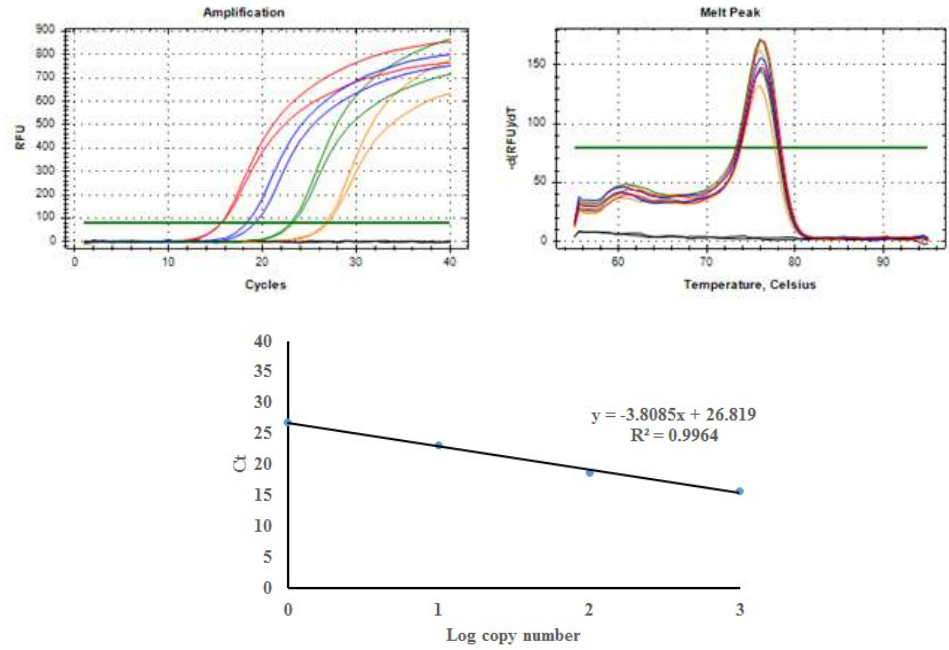
Competitor



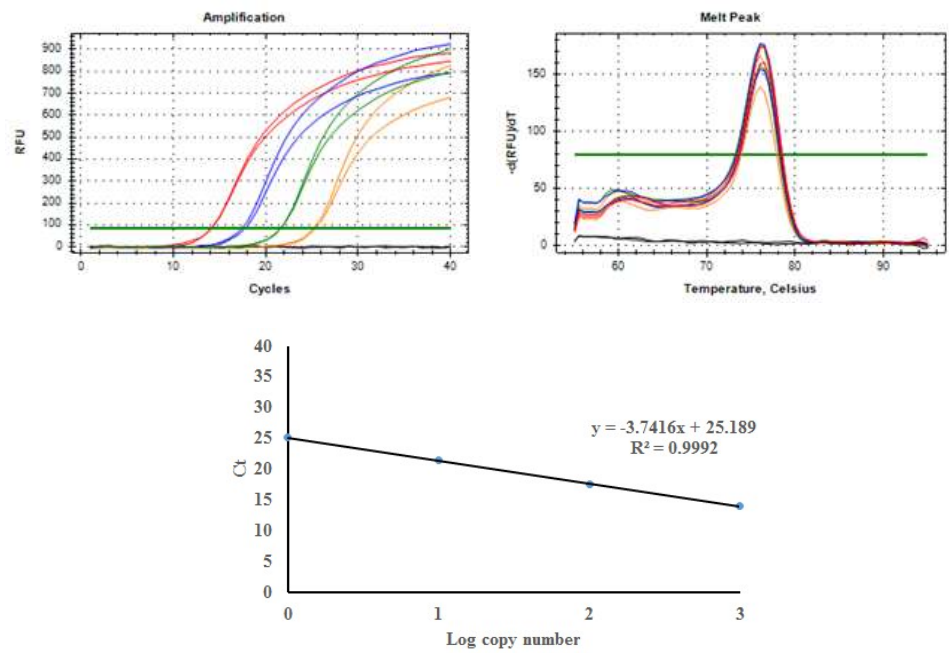
• RT time 10 min.



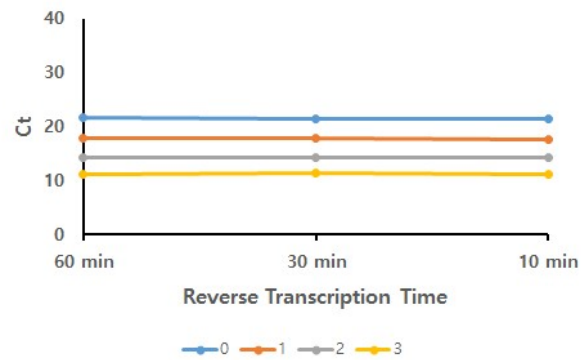
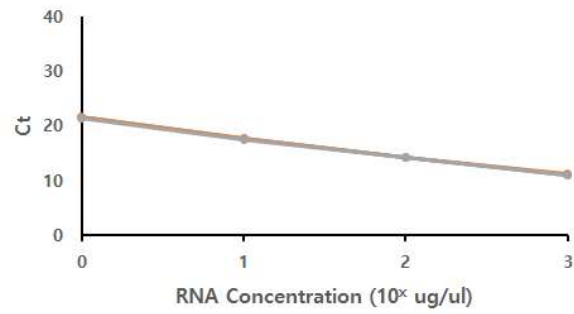
- RT time 30 min.



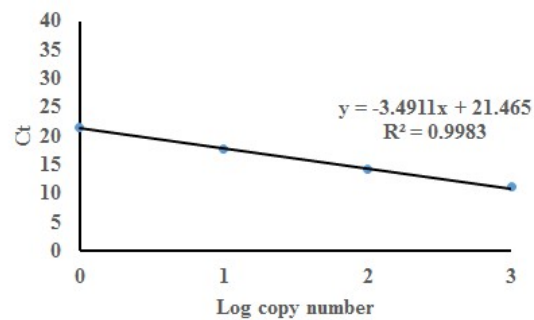
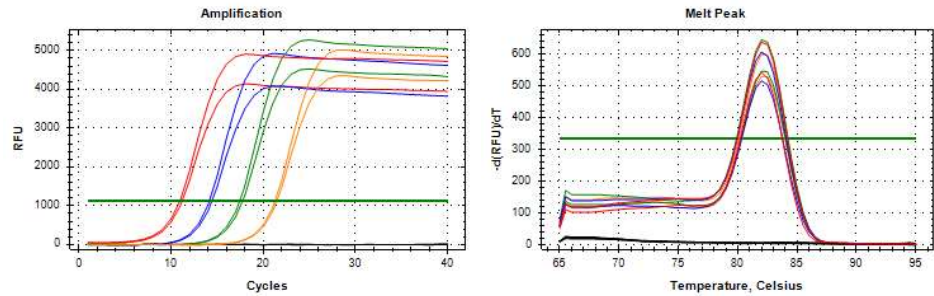
- RT time 60 min.



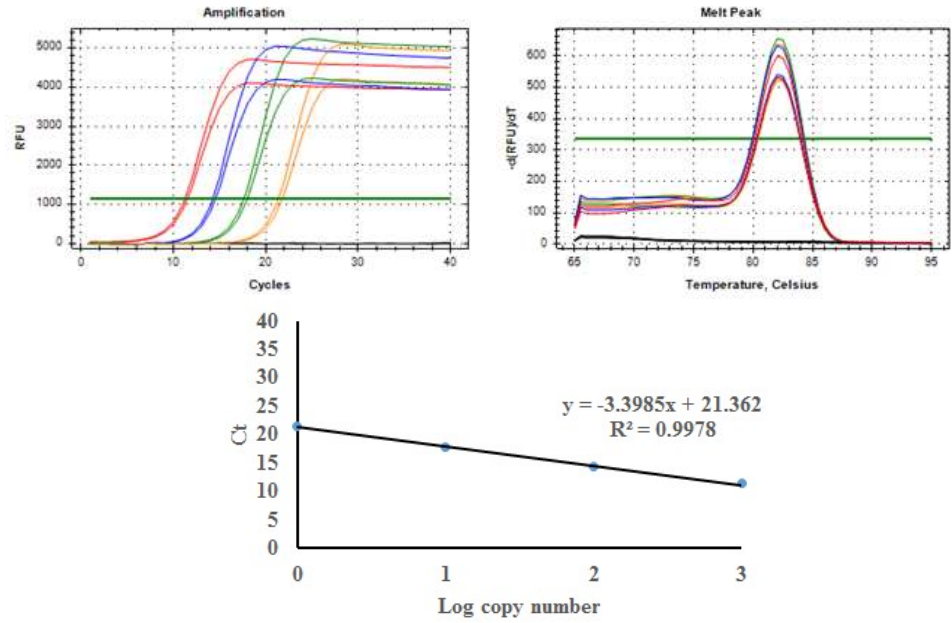
HB miR Multi Assay Kit™ 系统 I



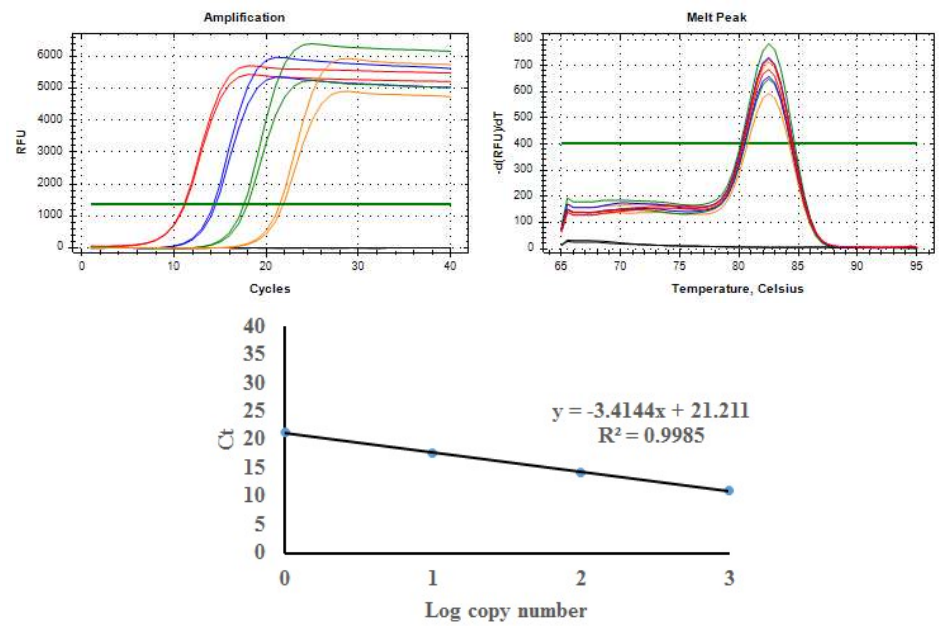
• RT time 10 min.



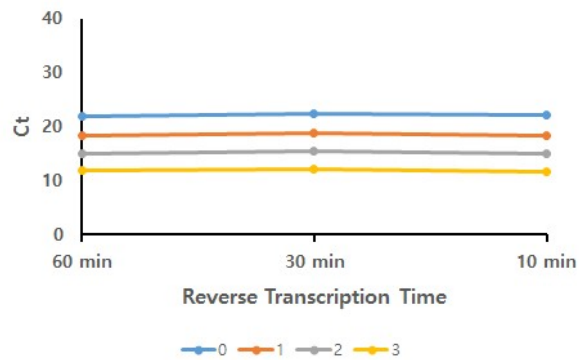
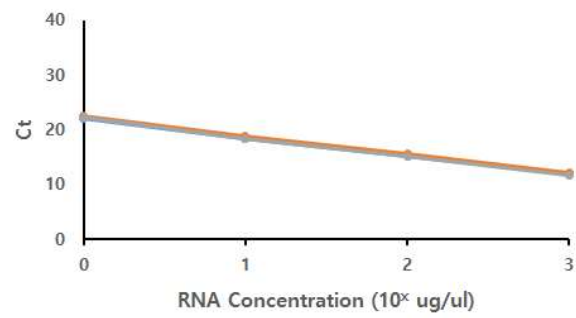
• RT time 30 min.



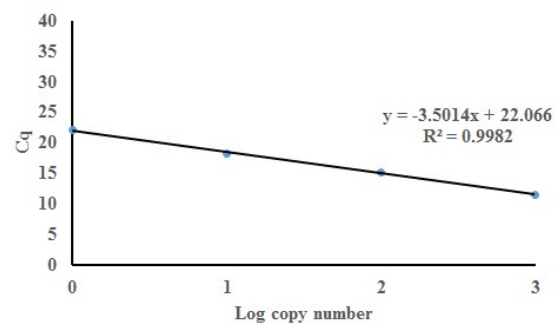
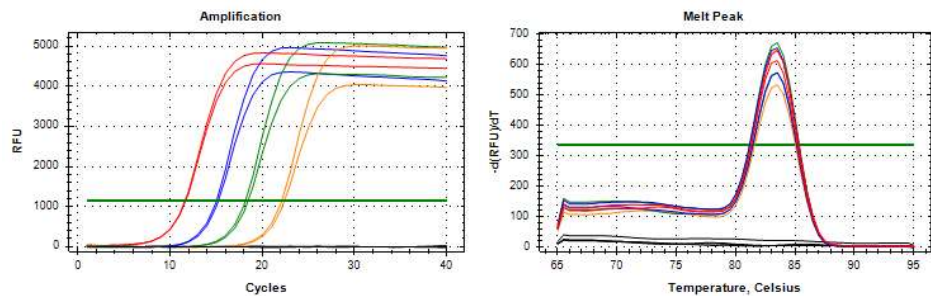
• RT time 60 min.



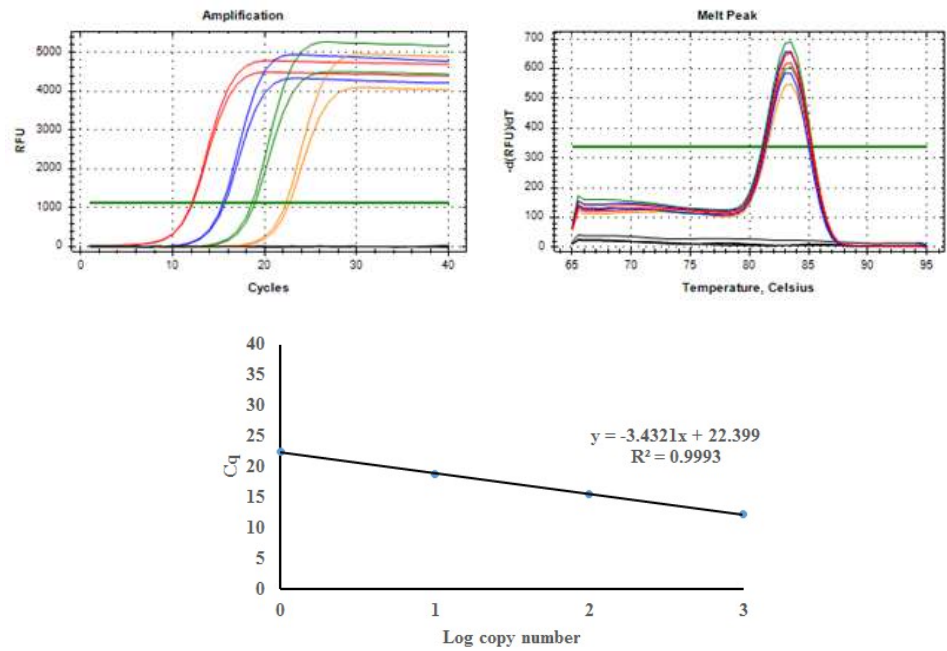
HB miR Multi Assay Kit™ 系统 II



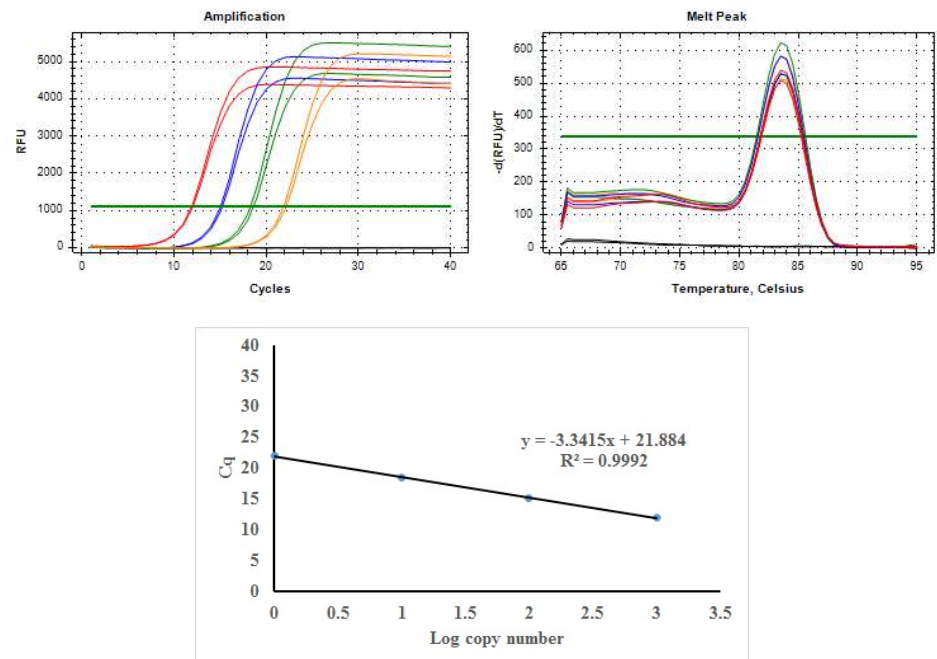
• RT time 10 min.



• RT time 30 min.



• RT time 60 min.



V. 使用流程

HB miR Multi Assay kit™ 系统 I

◆ cDNA 合成 (Poly A尾巴&逆转录)

No.	Components		Volume
	Template	Total or sample RNA (10ng ~1 ug)	X μl
1	HB_I Nucleic mix I		5 μl
2	HB_I miR Multi Buffer		6 μl
3	HB_I miR Enzyme mix		2 μl
	RNase-free water		Variable
Total Volume			20 μl

➢ 在PCR管中准备下列成分

◆ cDNA 合成反应条件

Step	Temp.	Time
Incubation	37 $^{\circ}\text{C}$	60 min
Heat inactivation	95 $^{\circ}\text{C}$	5 min

➢ 将产物保存在-20 或者直接进行后续反应。

◆ 实时(Real-time) PCR

No.	Components	Volume
4	HB_I Oligo	1 μl
5	HB_I 2x SYBR Green Master mix [or qPCR Master Mix (dual-labeled probe)]	10 μl
6	HB_I Nucleic mix II	2 μl
7	HB_I Dual-labeled Probe +	1 μl
	Template cDNA	1 μl
	Nuclease-free water	Variable
Total Volume		20 μl

➢ 该20 μL 反应液可以直接用在带荧光(SYBR Green)标记的实时(Real-time)PCR中进行检测。

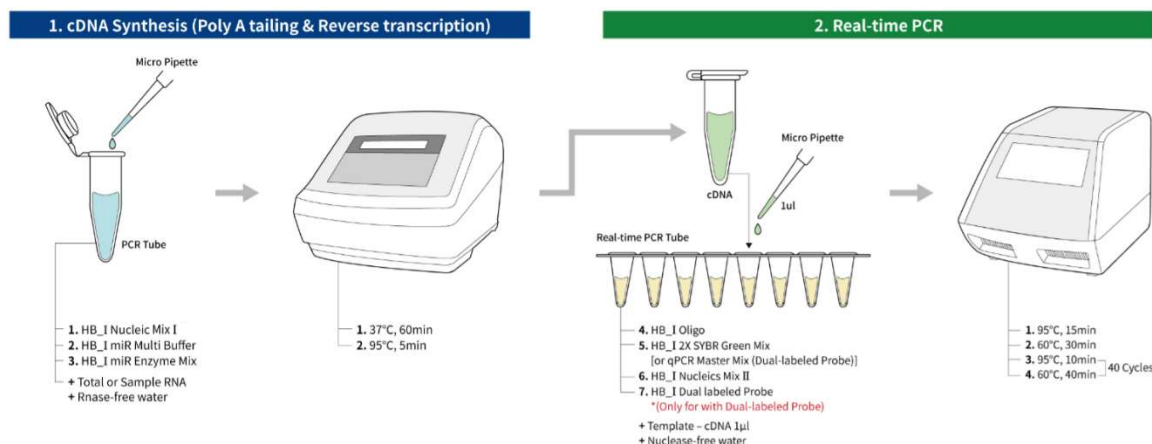
➢ + 只能使用qPCR Master mix (双标记分子探针)

◆ 实时(Real-time) PCR 反应条件

Step	Temp.	Time	Cycles
Initial Activation	95 $^{\circ}\text{C}$	15 min	
Annealing	60 $^{\circ}\text{C}$	30 min	
Denaturation	95 $^{\circ}\text{C}$	10 sec	40
Annealing & Extension	60 $^{\circ}\text{C}$	40 sec	

➢ 当使用SYBR Green荧光染料去监测 qPCR反应时，应在qPCR cycling后马上进行熔解曲线的分析。

熔解曲线分析操作内置于您的qPCR仪器的软件中。



HB miR Multi Assay kit™ 系统 II

◆ cDNA 合成 (PolyA尾巴&逆转录)

No.	Components		Volume
	Template	Total or sample RNA (10ng ~1 ug)	X $\mu\ell$
1	HB_II Nucleic mix I		3 $\mu\ell$
2	HB_II 2X miR Multi Buffer		10 $\mu\ell$
3	HB_II miR Enzyme mix		1 $\mu\ell$
	RNase-free water		Variable
Total Volume			20 $\mu\ell$

➢ 在PCR管中准备下列成分

◆ cDNA 合成反应条件

Step	Temp.	Time
Incubation	37 °C	60 min
Heat inactivation	95 °C	5 min

➢ 将产物保存在-20 或者直接进行后续反应。

◆ 实时(Real-time) PCR

No.	Components	Volume
4	HB_II Oligo	1 μl
5	HB_II 2x SYBR Green Master mix [or qPCR Master Mix (dual-labeled probe)]	10 μl
6	HB_II Nucleic mix II	2 μl
7	HB_II Dual-labeled Probe +	1 μl
	Template cDNA	1 μl
	Nuclease-free water	Variable
Total Volume		20 μl

➢ 该20 μl 反应液可以直接用在带荧光标记(SYBR Green)的实时(Real-time)PCR中进行检测。

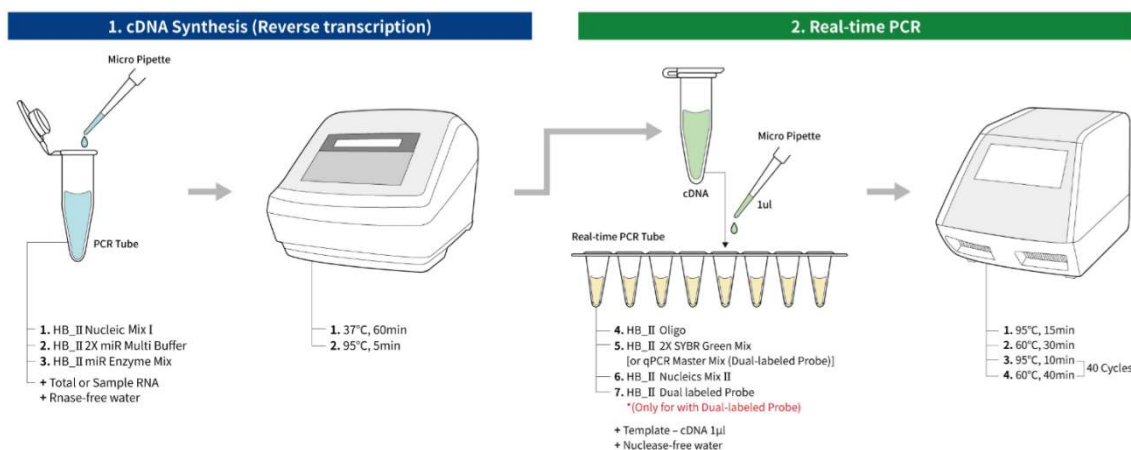
➢ + 只能使用qPCR Master mix (双标记分子探针)

◆ 实时(Real-time) PCR 反应条件

Step	Temp.	Time	Cycles
Initial Activation	95 °C	15 min	
Annealing	60 °C	30 min	
Denaturation	95 °C	10 sec	40
Annealing & Extension	60 °C	40 sec	

➢ 当使用SYBR Green荧光染料去监测 qPCR反应时，应在 qPCR cycling后马上进行熔解曲线的分析。

熔解曲线分析操作内置于您的qPCR仪器的软件中。



VI. 可兼容设备

- 与HB miR Multi Assay kit™兼容的Real-time循环仪

Manufacture	Cycler
Qiagen	Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 6000
Bio-Rad	iCycler, iQ5, MyiQ, CFX-96, CFX-384
ABI	ABI 5700, 7000, 7300, 7500 Standard, 7900HT Standard, 7700, ABI 7500 Fast, 7900 HT, 7900HT Fast, Step One plus
Roche	LightCycler 480, LightCycler 2.0
Eppendorf	MasterCycler ep realplex
Stratagene	Mx3000P, Mx3005P, Mx4000

VII. 订购信息

HB miR Multi Assay kit™ 系统 I

Product	Components	Cat. No.	Pack Size
HB_I RT Reaction kit	1. HB_I Nucleic mix I	HMI-S101	50 Rxns
	2. HB_I miR Multi buffer		
	3. HB_I miR Enzyme Mix		
HB_I Real-time PCR Master mix kit	4. HB_I Oligo	HMI-S102	150 Rxns
	5. HB_I 2X SYBR Green Master mix [or qPCR Master mix (dual-labeled probe)]		
HB_I Nucleic mix II	6. HB_I Nucleic mix *	HMI-S103	150 Rxns
	7. HB_I Dual-labeled Probe +		

* HB_II Nucleic mix II containing extension sequence which includes part of the target microRNA sequence

+ Only for qPCR Master mix (dual-labeled probe)

HB miR Multi Assay kit™ 系统 II

Product	Components	Cat. No.	Pack Size
HB_II Nucleic mix I	1. HB_II Nucleic mix I	HMI-S201	50 Rxns
HB_II RT Reaction kit	2. HB_II 2X miR Multi buffer	HMI-S202	200 Rxns
	3. HB_II miR Enzyme mix		
HB_II Real-time PCR Master mix kit	4. HB_II Oligo	HMI-S203	500 Rxns
	5. HB_II 2X SYBR Green Master mix [or qPCR Master mix (dual-labeled probe)]		
HB_II Nucleic mix II	6. HB_II Nucleic mix II *	HMI-S204	150 Rxns
	7. HB_II Dual-labeled Probe +		

* HB_II Nucleic mix II containing extension sequence which includes part of the target microRNA sequence

+ Only for qPCR Master mix (dual-labeled probe)

北京赛百盛基因技术有限公司

地址：北京市海淀区上地四街1号院2号楼202室

邮编：100085

电话：010-62969345/46, 010-82784296/92

传真：010-82784290

Email：info@sbsbio.com

公司主页：<http://www.sbsbio.com>