



选择正确的 miRNA 研究工具， 成功触手可及



凯杰生命科学

Sample to Insight

一个成功的 miRNA 实验涉及到很多关键因素，下面我们将详细为您揭秘在 miRNA 纯化，表达以及功能实验中的成功要素及注意事项。

QIAGEN® microRNA 分析产品



- miRNeasy 系列更多见下表
- miScript® II RT Kit
- miScript Plant RT Kit
- miScript PCR Array
- miScript Primer Assays
- miScript Precursor Assays
- miScript Single Cell qPCR Kit
- miRNA Inhibitors
- miRNA Mimics
- miScript Target Protectors
- HiPerFect® and Attractene and Controls

microRNA 纯化

获得高品质的 miRNA 是整个实验最关键的步骤，与传统的 Trizol 或其他类型的纯化方法相比，miRNeasy 的表现最为优秀和稳定。

miRNA 纯化试剂盒：采用 QIAGEN miRNeasy 专利技术，确保 miRNA 高纯度，高产量，miRNA 无丢失。

表 1. 起始样本类型及对应 miRNA 纯化产品

样品类型	miRNA 纯化试剂盒
动物组织或细胞	miRNeasy Mini Kit, miRNeasy Micro Kit miRNeasy 96 Kit Allprep® Universal DNA/RNA/miRNA Kit
FFPE 组织切片	miRNeasy FFPE Kit
稳定在 RNAlater® Animal Blood Tubes 中的小鼠、大鼠及其它动物的血液	miRNeasy Protect Animal Blood System
血清 / 血浆中 exosome	exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit
稳定并纯化	
PAXgene® Tissue Container 中的组织	PAXgene Tissue miRNA Kit
稳定在 PAXgene Blood RNA Tubes 中的人血液	PAXgene Blood miRNA Kit
血清、血浆、尿液等无细胞体液	miRNeasy Serum/Plasma Kit spike-in control
植物	miRNeasy Mini Kit

exoRNeasy Serum/Plasma Maxi Kit:

- 快速高效纯化血清 / 血浆中的 Exosome 中的总 RNA (含 miRNA)
- 能处理高达 4 ml 的血清 / 血浆样本，高灵敏度检测低丰度转录本
- 高度富集囊泡 Exosome 中的 RNA
- 操作流程简单，离心柱原理便于平行处理多个样本

实验证明 QIAGEN miRNA 纯化试剂效果明显优于同类产品

表 2. 利用 TRIzol, mirVana (L 公司), miRNeasy (QIAGEN) 从 HeLa 和 ZR-75-1 细胞中纯化包含 miRNA 的总 RNA

Cell line	Prep type	No. of preps	RNA yield mean (SD)	260:280 mean (SD)	260:230 mean (SD)	RIN mean (SD)
HeLa	TRIzol	10	45.59 (7.17)	1.89 (0.0406)	1.28 (0.208)	9.9 (0.14)
HeLa	mirVana	8	43.16 (12.01)	1.96 (0.0364)	1.36 (0.323)	9.9 (0.11)
HeLa	miRNeasy	11	34.07 (5.40)	2.08 (0.00874)	1.97 (0.389)	9.9 (0.11)
ZR-75-1	TRIzol	4	23.52 (1.39)	1.84 (0.0432)	0.815 (0.0759)	9.8 (0.075)
ZR-75-1	mirVana	4	16.92 (5.84)	2.01 (0.0356)	1.28 (0.361)	9.1 (0.17)
ZR-75-1	miRNeasy	4	18.37 (1.93)	2.05 (0.0311)	1.87 (0.337)	9.8 (0.050)

利用三种方法进行 miRNA 纯化, QIAGEN 的 miRNeasy 纯化效果最出色, 特别是 260/230 比值 QIAGEN 明显优于其他两种方法。260/230 的数值过高是由于盐类残留, 一般认为 260/230 在 1.7 以上时盐类的残留会比较少, 对后续的实验没有影响。只有 QIAGEN 的产品可以达到这样的要求。

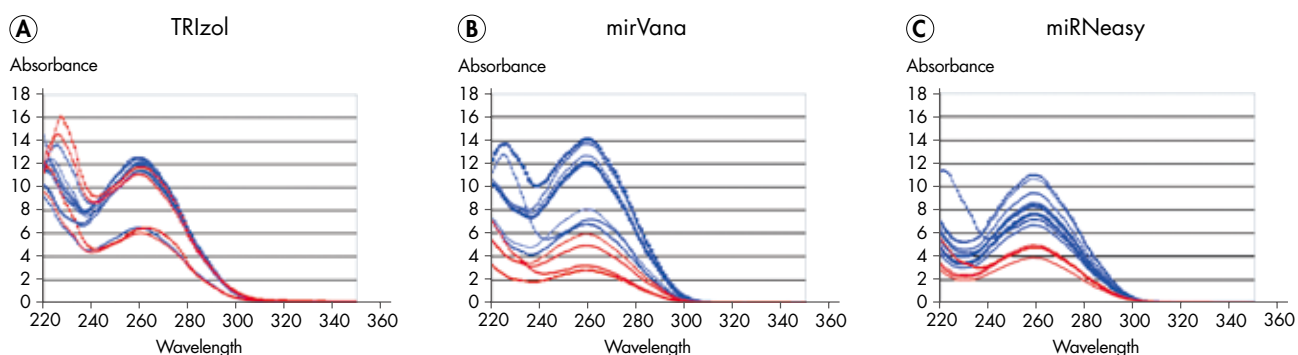


图 1. 利用三种方法纯化 miRNA, 对得到的 miRNA 进行吸收光谱分析, 蓝色是 HeLa 细胞, 红色是 75-1 细胞系。miRNeasy 重复性最好, 盐离子残留最少 (OD230 的值最小)。

以上数据文献来源: Robert A Ach*, Hui Wang and Bo Curry. (2008) Measuring microRNAs: Comparisons of microarray and quantitative PCR measurements, and of different total RNA prep methods. BMC Biotechnology. **8**, 69.

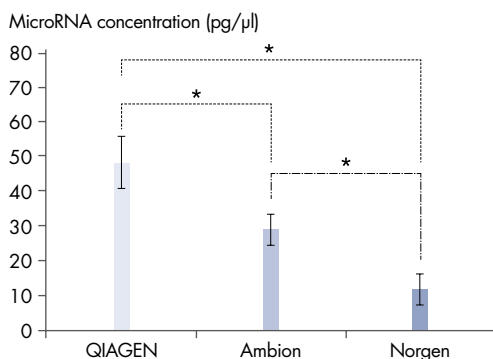


图 2. 对比 3 种常见的试剂盒 (QIAGEN, Ambion, Norgen) 从 200 μ l 血清中提取 miRNA 的效果, 可以看到 QIAGEN 的产量最高 (纵坐标为产量, QIAGEN 约为 50 $\text{pg}/\mu\text{l}$, Ambion 约为 30 $\text{pg}/\mu\text{l}$ 。

以上数据文献来源: Yu Li, Kris V. Kowdley. (2012) Method for microRNA isolation from clinical serum samples. Anal Biochem. **431(1)**, 69-75。

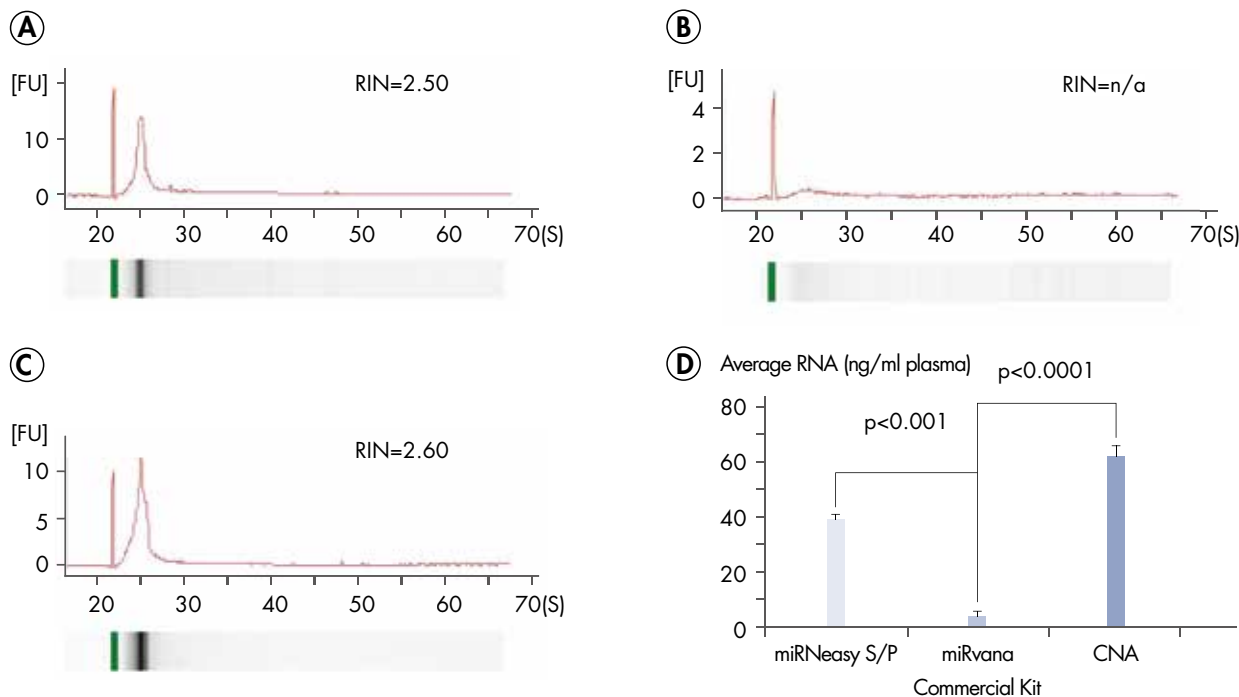


图 3. 利用 Bioanalyzer 分析从三个不同的商品化试剂盒纯化游离 miRNA 的效果。A. – C. 代表了三个试剂盒从 1ml 血浆中纯化到的 miRNA 的电泳图及 RIN 值；**A.** 图使用的是 QIAGEN 的 miRNeasy Serum/Plasma Kit；**B.** 图使用的是 mirVana microRNA Isolation Kit；**C.** 图使用的是 QIAGEN 的 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit；**D.** 图是定量结果。以上均三次独立重复实验。结果表明 QIAGEN 的两款从血浆中纯化 miRNA 的产品均大大优于 Ambion 的 mirVana 试剂。
文献来源： Page K, Guttery DS, Zahra N, Primrose L, Elshaw SR, et al. (2013) Influence of Plasma Processing on Recovery and Analysis of Circulating Nucleic Acids. *PLoS ONE* **8**(10): e77963. doi:10.1371

用 TRIzol 纯化 miRNA，您的 miRNA 文章随时有风险！

据报道因为使用了 Invitrogen 品牌的 TRIzol 试剂，韩国科学家 Narry Kim 撤回了一篇 *Molecular Cell* 期刊文章。因为她们后续研究 microRNA (miRNA) 衰减时发现，所用的 Invitrogen 品牌的 TRIzol 试剂会对特殊 GC 含量的 miRNA 或具二级结构的 miRNA 产生选择性丢失，从而导致假阴性实验结果。

文章标题：Retraction Notice to: Cell Adhesion-Dependent Control of MicroRNA Decay。

在这篇 2011 年发表于《*Molecular Cell*》杂志上的文章中，研究人员称，一旦细胞粘附性丧失，某些 miRNA 迅速降解。miR-141, miR-200a, miR-21, miR-29b, miR-34a, miR-301a 验证了这一机制。在 RNA Measurement 中表示使用的是 Invitrogen 品牌的 TRIzol 试剂。

然而，在撤回时，他们表示由于使用 TRIzol 试剂，导致低 GC 含量的 miRNA (miR-141、miR-29b、miR-21、miR-106b、miR-15a、miR-34a) 在 样品制备阶段选择性丢失，从而导致假阴性实验结果。而不是之前所说“一旦细胞粘附性丧失，某些 miRNA 迅速降解。”

以上内容来源：生物通

www.ebiotrade.com/newsf/2012-7/2012716104443888.htm

miRNA 逆转录及定量分析

在 miRNA 的表达分析中，目前最为推荐的是两种方法：加尾法和茎环法。与探针法相比，SYBR® Green 方法可以大量节约时间和样本，同一次 cDNA 合成可以检测多种 miRNA，前体 miRNA，miRNA 靶标或其他非编码 RNA。可以检测探针法无法检测到的来自 3' 端可变剪切的 miRNA 异构体。

miRNA 逆转录 —— miScript II RT Kit

- 含有两种逆转录 buffer：HiFlex buffer、HiSpec buffer
- HiFlex buffer 可将 miRNA 成熟体、miRNA 前体，其他非编码的 RNA、mRNA 同时逆转录为 cDNA
- HiSpec buffer 只针对 miRNA 成熟体进行逆转录
- 单次 cDNA 产物可用于 10 多次下游的 PCR
- 简单的单管反应流程，只需要 2 步操作

miRNA SYBR Green 法检测

miScript Primer Assay & Precursor Assay —— 成熟 miRNA 和前体 miRNA 定量检测引物

QuantiTect® Primer Assay —— 靶标基因定量检测引物

提供人，大鼠，小鼠的定量 PCR 的 SYBR Green 引物，可供 miRNA 靶标基因表达水平检测。

miScript SYBR Green PCR Kit —— miRNA 定量 PCR 检测试剂

miScript Plant RT Kit

可将具有 3' 端甲基化 (2'-O-Me) 修饰的 miRNA 逆转录成 cDNA，进而可以利用 SYBR Green 法经济高效地对植物 miRNA、piRNA 进行检测。目前 QIAGEN 提供的植物 miRNA 定量引物，全部经过湿实验验证，对照严谨，结果可靠。可对水稻、玉米、大豆、烟草等物种 miRNA 进行分析。欢迎访问 www.qiagen.com/cn/shop/pcr/real-time-pcr-enzymes-and-kits/miscript-plant-mirna-solutions，了解 miScript Plant RT Kit 的更多信息。

miScript Single Cell qPCR Kit

能够实现对单个细胞中的 miRNA 进行精确的定量检测。尤其适用于液体活检，循环肿瘤细胞等前沿研究。

- 用于精确定量检测单细胞中的 miRNA
- 通用解决方案，集单细胞裂解，cDNA 合成与 miRNA 预扩增于一体
- 一次反应，所有 miRNA 均被转化成 cDNA 并得到预扩增
- 下游结合 miScript Primer Assay 或 miScript miRNA PCR Array，实现对单细胞中特定 miRNA，疾病 / 通路特异性 miRNA，或 miRNome 组的表达分析

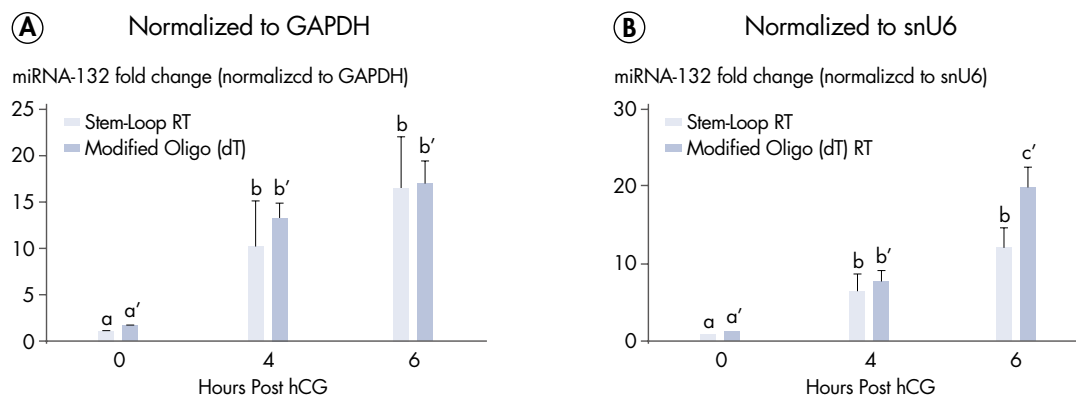


图 4. 文章对比了 2 种方法方法来分别检测细胞在 hCG 的不同作用时间时 mir-132 的表达变化。分别用了 gapdh 和 u6 来做内参，它的结论是两种方法没有显著性差异。作者在文章中总结到，虽然两种方法在最终的数据上没有显著的差异，但是 oligo dT 的方法更节约时间。茎环法针对于每一个 miRNA 都需要一个特异性的茎环引物，因此如果要在同一个样本中检测多个 miRNA，就需要多个茎环引物在同一管进行反转录，必然会引起引物之间的相互干扰。另外茎环法不能检测来自 3' 端的 miRNA 的异构体。

以上数据文献来源: Stephanie D. Fiedler, Martha Z. Carletti, Lane K. Christenson. (2010) Quantitative RT-PCR Methods for Mature microRNA Expression Analysis. *Methods in Molecular Biology*. **630**, 49–64。

miScript miRNA PCR Arrays: 集成式筛选多个 miRNA 的表达

Assay: 单个引物，提供人、小鼠、大鼠、狗和恒河猴五个物种全 miRNA 组预制的引物，每条引物都是经过湿实验验证。其它物种提供定制服务。

Array: 将与一个通路或疾病相关的多个 miRNA 的检测引物固定到 96 孔板 /384 孔板 /100 孔板上，可以实现对 1 个样本中的多个 miRNA 进行同时筛选。研究物种包括人类，小鼠和大鼠。按照通量从低到高，分为两大类：Pathway-focus PCR Arrays 和 Pathway-focus HC PCR Arrays。

Pathway-focus PCR Arrays: 一个样本可以检测 84 个 miRNA+12 个对照。产品覆盖 22 个信号通路。

英文名称	中文名称
Apoptosis	凋亡
Brain Cancer	脑癌
Breast Cancer	乳腺癌
Cancer PathwayFinder	癌症发现者
Cardiovascular Disease	心血管疾病
Cell Differentiation & Development	细胞分化及发育
Diabetes	糖尿病
Immunopathology	免疫病理学
Inflammatory Response & Autoimmunity	炎症应答和自体免疫
Hypoxia Signal pathway	缺氧信号通路
Pain Neuropathic and Inflammatory	疼痛性神经炎症

英文名称	中文名称
Liver miFinder	肝脏发现者
miFinder	miRNA 发现者
Cancer Stem Cells	癌症干细胞
Fibrosis	纤维化
Neurological Development & Disease	神经发育和疾病
Ovarian Cancer	卵巢癌
Prostate Cancer	前列腺癌
Serum & Plasma	血清和血浆
T-Cell & B-Cell Activation	T 细胞和 B 细胞活化
Stem cell	干细胞
Tumor Suppressor	肿瘤抑制

Pathway-focus HC: 一个样本可以检测 372 个 miRNA+12 个对照。

英文名称	中文名称
Cancer PathwayFinder 384HC	癌症发现者
Liver miFinder 384HC	肝脏发现者

英文名称	中文名称
miFinder 384HC	miRNA 发现者
Serum & Plasma 384HC	血清和血浆

miRBase Profiler: 除了通路聚焦的 array, 我们还提供针对多个物种最新 miRBase 中总 miRNA 的 PCR array, 包括人、小鼠、大鼠、狗、恒河猴、奶牛的 384 孔板规格的 PCR array 和大豆、水稻及玉米的 96 孔板规格的 PCR array。

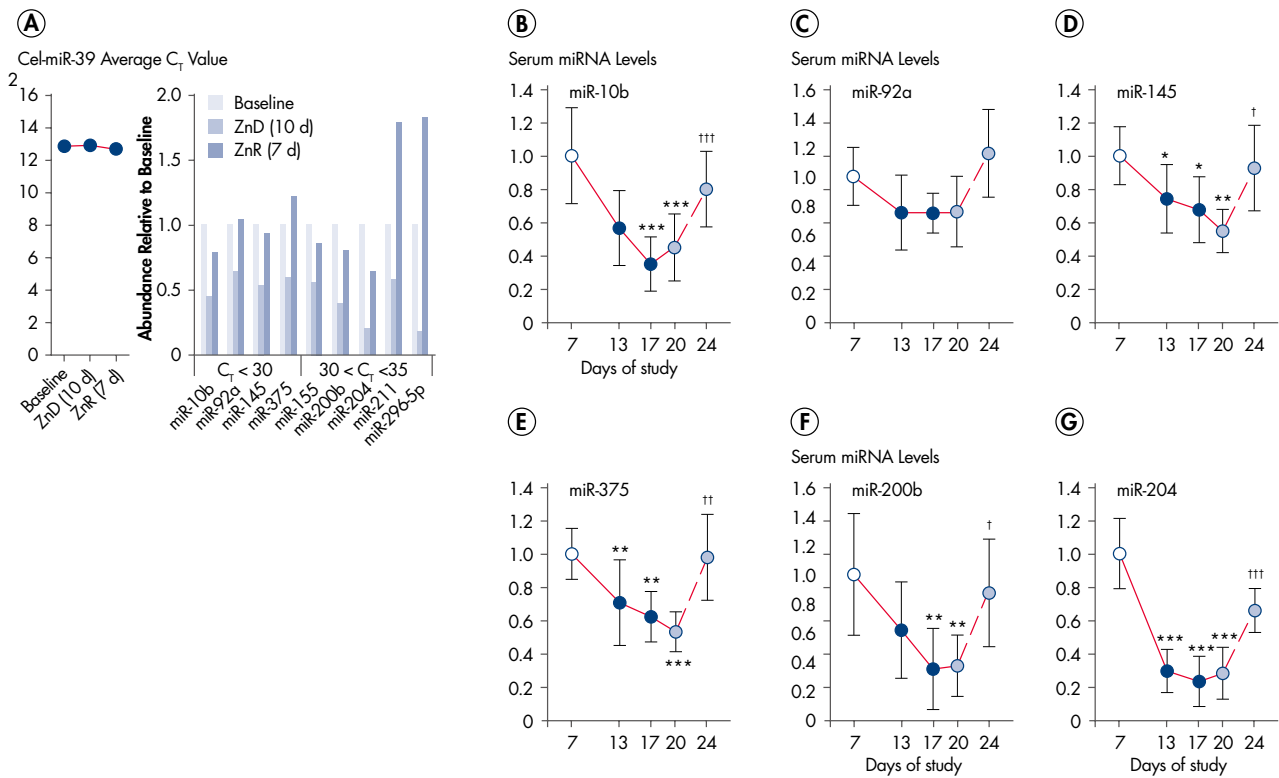


图 5. 图 A. 使用 QIAGEN 的血清血浆分类的 miRNA PCR array 快速鉴定出 9 种在低锌饮食和高锌饮食中表达差异较大的 microRNA 如 miR-10b, miR-92a 等。图 B. 至图 G. 是对于图 A. 结果的验证, 对这些 miRNA 做了动态的检测, 前 20 天给予低锌饮食, 后 4 天给予高锌饮食, 可得知在前 20 天, 随着体内锌含量的下降, 这些 miRNA 的表达量也是随之下降, 在后 4 天补充了高锌饮食以后这些 miRNA 的表达量也是迅速恢复。说明这些 miRNA 是非常好的 biomarker。

以上数据文献来源: Moon-Suhn Ryu, Bobbi Langkamp-Henken, Shou-Mei Chang, Meena N. Shankar, and Robert J. Cousins. (2011) Genomic analysis, cytokine expression, and microRNA pro_ling reveal biomarkers of human dietary zinc depletion and homeostasis. *Proc Natl Acad Sci.* **27**, 108(52)。

miRNA 功能研究

QIAGEN 公司目前提供三种 miRNA 研究功能试剂：模拟物 Mimics，抑制剂 Inhibitors，以及靶标保护剂 miScript Target Protectors。Mimics 和 Inhibitors 用于进行多个物种的 miRNA 的功能实验研究。而 miScript Target Protectors 则可以研究单个靶基因与特定 miRNA 的功能分析。

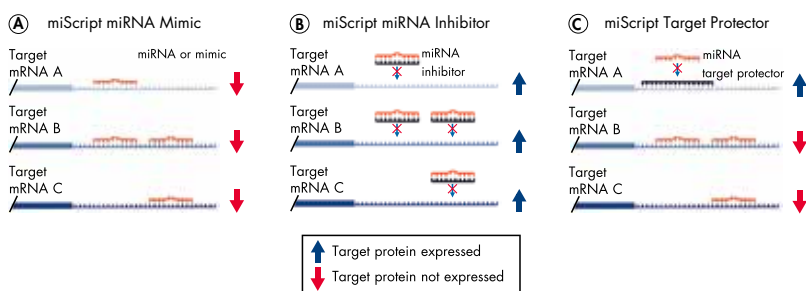


图 6. miScript miRNA Mimics、miScript miRNA Inhibitors 和 miScript Target Protectors 的作用机理。 A. miRNAs or miScript miRNA Mimics bind to their target mRNAs, causing downregulation of expression of all the targets. B. miScript miRNA Inhibitors bind to the miRNA of interest, resulting in the expression of all gene targets of the miRNA. C. In contrast, miScript Target Protectors bind to a specific miRNA binding site, resulting in expression of that miRNA target only, while all other targets remain downregulated.

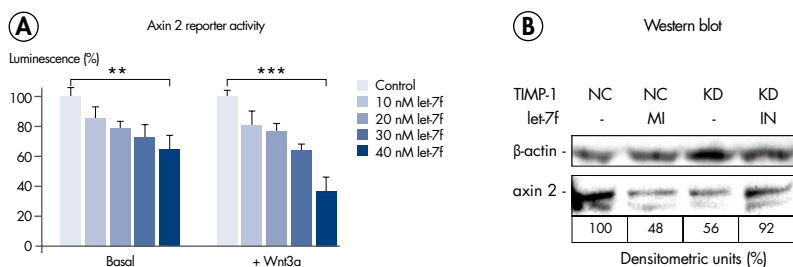


图 7. 左图：利用 QIAGEN 的 mimics 进行功能研究，随着加入的 mimics 的量的增大，相应的靶基因的表达在稳步的下降，说明 mimics 效果非常稳定。右图：western 结果，可以看到加入 mimics 后，蛋白水平明显降低了。加入 inhibitor 后表达量又恢复了。

以上数据文献来源： Virginia Egea, Stefan Zahler, Nicole Rieth, Peter Neth, Tanja Popp, Kai Kehe. (2011) Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. PNAS. vol. 109, E309-E316

客户体验分享

近期 Jo Vandesompele 教授 (Center for Medical Genetics at Ghent University) 与 QIAGEN 进行合作，成功利用 QIAGEN 的 miScript 系列研究产品进行了 miRNA 研究；Vandesompele 教授在遗传学领域有很高威望，之前一直使用 L 公司的 miRNA 产品线并与其关系密切。

Jo 和他的团队进行了与 L 公司产品的比较，结果是 QIAGEN 的 miScript 产品线表现优于所有其他竞争产品的解决方案。更重要的是 Jo 的测试结果已经使他们决定转向 QIAGEN 的产品进行 miRNA 研究，QIAGEN 的产品将帮助 Vandesompele 教授及团队在各种癌症疾病标记物方面进行研究。

样本类型： 主要是血清 / 血浆

miRNA 纯化试剂盒： miRNeasy Serum/Plasma Kit

miScript miRNA PCR Array 类型： miRNome Arrays V 18.0 包含预扩增体系

曾经使用 L 公司产品有： TaqMan Tilda Cards including preamplification，也曾经使用过 ABI 的 single assay

关于最新的许可信息和产品特定的免责声明，请阅读相关的 QIAGEN 试剂盒手册或操作指南。QIAGEN 试剂盒手册和操作指南可在 www.qiagen.com 下载，或向 QIAGEN 技术服务或当地的经销商索取。

Trademarks: QIAGEN®, Sample to Insight®, Allprep®, HiPerFect®, miScript®, QuantiTect®, RNAprotect® (QIAGEN Group); SYBR® (Molecular Probes, Inc.); PAXgene® (PreAnalytiX GmbH). © 2016 QIAGEN, all rights reserved.

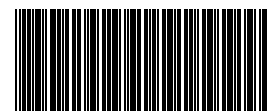
凯杰企业管理 (上海) 有限公司

电话: 021-3865 3865

技术支持热线: 800-988-0325 400-880-0325

TechService-CN@qiagen.com

www.qiagen.com



LS201606002