

miRbay™ SV miRNA单管反应检测试剂盒

Cat No: MB001a-xxx-100

众多研究已经证明miRNA的差异表达可以作为鉴定多种疾病的生物标记,这也是目前miRNA研究领域的重要方向。其中miRNA定量检测是将miRNA研究成果推向临床疾病诊断应用的瓶颈和关键技术。目前miRNA定量检测多采用RT-qPCR的方法,用测定PCR扩增所需的循环数来实现。由于每个目标miRNA的RT和PCR反应效率不尽相同,绝对定量需要人工合成的待测miRNA作出标准曲线来加以校正。但样品中RNA含量的多元化及RNA样品中杂质对RT和PCR反应的影响,增加了测定的不确定性,而RT-qPCR方法对样品和标准的检测反应并不是在同一个反应体系中进行,因而从严格意义上来说,绝对定量是不可能用现有测定方法来实现的。对于血液等生物样本来讲,从不同个体纯化出的RNA中所含的杂质对RT反应及PCR扩增效率具有抑制甚或促进的作用,加大了使用传统RT-qPCR方法进行定量测定的难度。另外样品的处理和纯化,一般采用盐酸胍苯酚等蛋白质变性剂抽提方法得到纯度很高的RNA,但由于miRNA的平均大小仅为22nt,需要高浓度乙醇长时间沉淀以避免丢失,使纯度和产率这对矛盾更加突出,而用亲和树脂柱的纯化方法一般能保证RNA的纯度但尚需证明纯化后RNA的完整性,即miRNA的选择性丢失的问题。这些问题一直困扰着将miRNA检测技术推向临床应用的努力。miRbay™ SV miRNA Assay采用欧米伽引物对样品miRNA和内置的标准在同一反应管中进行同步检测,由同步测得的分子标准量为动态定量的标准尺度,获得待测miRNA的相对峰值,滤掉杂质和RNA成分对反应效率的影响,通过对比实测的标准曲线而做到绝对定量,对RNA纯度的要求也大大降低,真正意义上实现了绝对定量测定,为实现临床应用迈出了决定性的一步。

miRbay™ SV miRNA Assay kit带来以下益处:

- 1.绝对定量:得益于与样本RNA在同一反应管中反应形成的动态定量标准,消除复杂样品以及RNA纯度对测定的干扰,可对目标miRNA进行绝对定量。
- 2.高特异性:可鉴别只有1个碱基差别或同一家族的miRNA。
- 3.高灵敏度:上样量范围 1 ug - 10 pg RNA (注:miRNA表达量随样本性质改变)。
- 4.测定范围:在 $10^2 - 10^5$ 拷贝数范围内准确定量,超出此范围可作相对定量。
- 5.结果客观:设立了内控做为RT或PCR反应失败导致阴性结果的指标。对基因片段的甄别可以精确到 ± 0.2 个碱基。
- 6.重复性好:SV反应的原理和miRbay严格的质量控制保证每次测定的重复性。

7.直观性强:通过基因片段分析的内标控制可以直观测量目标miRNA的拷贝数。

miRbay™ SV miRNA Assay原理简介

基于miRbay™ 独创的欧米伽引物技术(专利申请号:PCT/CN2013/070525),miRbay miRNA检测技术采用了多目标同步扩增荧光片段长度多态性分析法,能在同一反应中对不同序列的RNA进行甄别并定量测定。欧米伽引物能避免链内引发的引物二聚体形成,

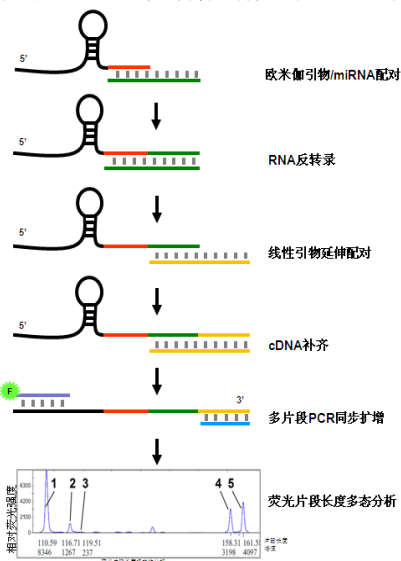
提高末端引发精确度,并利用可变的编码区为多个目标miRNA

设置预定的长度多态性,解决了单反应检测多个目标miRNA的关键问题。

miRbay™ SV miRNA Assay Kit 提供一种全新的可定量的miRNA检测工具,将多种小RNA以不同的分子数目与待测miRNA样品预混在一起,以单反应管的模式(single vial, SV)对比内置标准RNA,在同一反应体系和处理环境下,实现测定目标miRNA的操作。首先,miRbay miRNA检测技术将针对目标和内标小RNA分子分别设计的欧米伽反转录引物混合使用,使目标和内标分子与探针的杂交配对在同一反应管进行,并将锁定的RNA以线性定量的方式反转录为cDNA。随后利用新合成的cDNA序列将具有共用的PCR反向靶点序列的适配寡聚

DNA线性定量地加入cDNA。由此形成的目标cDNA和内标cDNA长度不同但区别很小,也享有相似的高级结构。目标cDNA和内标cDNA的正反链末端拥有共同序列可由一对荧光标记的通用引物进行PCR同步扩增,因而在进一步的PCR扩增中,各种cDNA信号的扩增可以接近于线性定量的方式同步进行以增

PCR片段	探针	长度编码区	片段长度	RNA拷贝数
1	← RNA 标准 #1		110.60 nt	1×10^6
2	← RNA 标准 #2		116.70 nt	1×10^4
3	← RNA 标准 #3		119.60 nt	1×10^3
4	← miR 103a		158.40 nt	可变检测
5	← miR 107		161.60 nt	可变检测



强可探测的荧光信号。

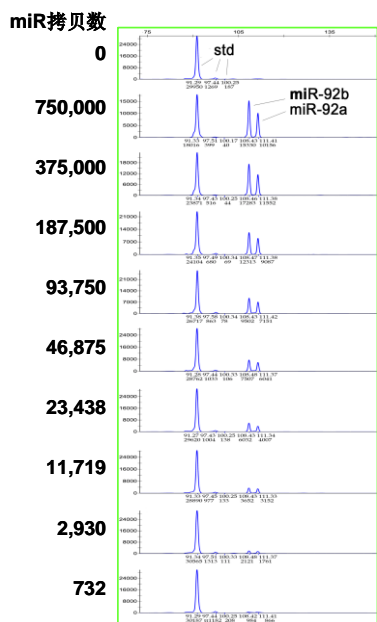
PCR产物经荧光片段长度多态性分析,不同的RNA分子由不同长度所编码的探针来识别,并经荧光PCR扩增标记,产生对应于不同的DNA片段长度,为对目标miRNA分子及其前体定量检测和验证提供专一性强、灵敏度高、准确定量的解决方法。

标准曲线的制作和样品miRNA的拷贝数计算

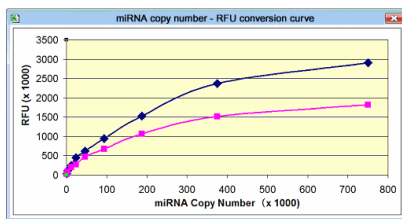
对单个miRNA而言,多目标同步扩增荧光片段长度多态性分析法中的每一步中间产物的实现和信号的扩增是以线性或接近线性定量的方式进行的,因此荧光强度与目标miRNA的浓度成线性定量的关系。但受DNA分析仪的线性定量范围的客观限制,所测得的荧光强度与miRNA

的浓度测定关系与仪器探头的响应曲线一致,符合乘幂回归关系。miRNA的检出遵循miRNA与互补的探针序列杂交配对的原理,能产生与特定miRNA相应的cDNA。cDNA的反转录效率受到探针序列的影响,最终会体现在DNA片段扩增的丰度上,因而不能直接比较不同的miRNA。而每一个特定的miRNA具有相同的反转录及PCR扩增效率。本方法中所用的内标RNA可与样本目标一同检测,通过同内标miRNA荧光丰度的比较,将不同的目标miRNA浓度转换为

不同的相对荧光丰度,由此可测绘出目标miRNA的绝对定量标准曲线。通过比对由目标miRNA的浓度标准曲线而得到样品中miRNA的绝对定量值。miRbay™ SV miRNA Assay Kit附有用miRbay™ RNA Storage Buffer (Cat: MB002a-RSB)以2倍比例稀释的标准miRNA,为客户制作绘制标准曲线提供方便。并可用于校正因操作人员不同带来的系统误差,让不同实验室获得的数据具有可比性。miRbay™也免费为客户提供能自动计算标准曲线制作的excel模版文档以简化计算和校正曲线的绘制。并能将测得的样品丰度直接转换为miRNA分子拷贝数。上图为实测的miR-92a(粉红),miR-92b(蓝)浓度校正曲

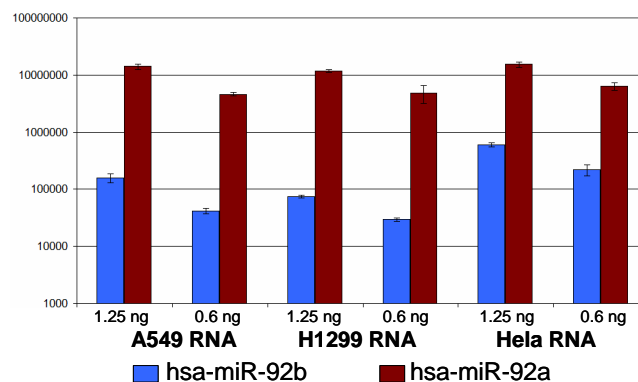


miR-92a, miR-92b标准曲线的片段长度多态性分析谱



线。

miRbay miRNA检测方法能直观地检出样品miRNA分子数,并有很好的重复性。在对2株非小细胞肺癌细胞及1株宫颈癌细胞不同RNA样品浓度的miR-92a和miR-92b的测定结果显示4次重复测定的统计偏差仅为12.94%(CV)。所测得的miR-92a和miR-92b的分子数含量显示如下图:



实现miRNA多目标测定的全新工具

一个微小RNA(miRNA)家族有多个成员,拥有共同的种子序列,识别类似的信使RNA(mRNA)目标,其表达谱变化是基因表达调控中有趣的现象。家族中各成员之间功能相关,碱基差异很小,难以做到同时检测各个成员表达的丰度;有些miRNA基因首尾相邻,串联成簇构成miRNA基因簇,簇中各个成员往往作用于同一基因或同一调控过程,多个成员同时作用可更加有效地发挥功能,保证各项生命活动有序地进行,对miRNA基因簇的研究,比对单个miRNA的研究更能真实地反应机体精细而复杂的调控过程;调节细胞周期、细胞分裂、细胞凋亡、免疫反应等这些重要生命过程涉及的基因众多,与此功能相关的多目标miRNAs的检测研究,是了解这些功能在基因水平调节的重要内容。实际上对多目标miRNA同时检测研究是一种普遍的需求,但在miRNA研究领域,同时对多目标进行测定目前还缺乏灵敏而客观的鉴定技术手段。由于欧米茄引物技术实现了可以在一个反应中为不同的目标miRNA设计长度不同的扩增产物而加以区分,使得miRbay多目标同步扩增荧光片段多态性分析法成为miRNA多目标测定的一种全新工具和技术解决方案。