



肿瘤microRNA芯片 (AP-0003) 使用说明书

试剂盒内包含的内容(括号内为保存条件):

30 ul Oligo Mix (-20 °C)
400 ul Annealing buffer (RT)
500 ul RNase free water (-20 °C)
15 ul Magnetic streptavidin beads (4 °C)
120 ul Beads binding buffer (RT)
1 ml Bead wash buffer (RT)
6 ul Ligase (-20 °C)
250 ul Ligation buffer (-20 °C)
60 ul Extension mix (-20 °C)
60 ul Labeling mix (-20 °C)
6 ul T7 RNA polymerase (-20 °C)
30ml 1x Hybridization buffer (RT)
30ml 5x Hybridization wash buffer (RT)
60ml Blocking buffer (RT)
50 ul Streptavidin-HRP conjugate (4 °C)
40ml 5x Detection wash buffer (RT)
3.6 ml Substrate A (4 °C)
3.6 ml Substrate B (4 °C)
3 Array I membranes (RT)
3 Detection sheets (RT)

不包括在试剂盒中, 但需要准备的材料和仪器:

磁力架 (Magnetic stand (96孔板))
PCR仪
分子杂交仪 (Hybridization oven)
洗涤盘 (Washing tray)
50ml 离心管 (Corning tubes are recommended, cat#430290) 或者杂交瓶
0.2ml PCR管
成像系统 (例如Alpha Innotech image) 或者使用x线胶片曝光

RNA样品操作前的准备工作

为避免RNase对RNA样品的污染, 所有实验要严格遵守RNA操作的要求, 在实验前需准备高温高压灭菌的微量离心管和移液枪头 (如有条件, 尽可能使用DEPC处理的耗材); 在实验操作中, 需戴口罩和一次性橡胶手套。

实验前准备工作:

- 稀释5x杂交洗涤缓冲液(Hybridization wash buffer) 和5x检测洗涤缓冲液(Detection wash buffer) 到1x。具体方法:

1x 杂交洗涤缓冲液(Hybridization wash buffer) :

30ml 5x杂交洗涤缓冲液(Hybridization wash buffer) 中加入120ml ddH₂O

1x 检测洗涤缓冲液 (Detection wash buffer) :

40ml 5x 检测洗涤缓冲液 (Detection wash buffer) 中加入160 ml ddH₂O

- 将1x的杂交液 (Hybridization buffer) 和1x杂交洗涤缓冲液(Hybridization wash buffer) 在42°C 水浴中预热1个小时, 或者至缓冲液透亮无沉淀为止。
- 在进行第4步的T7RNA转录的时候, 可以准备预杂交

操作过程:

1. 按照下面的步骤, 将miRNA和寡核苷酸混合液 (Oligo mix) 退火结合。

(1) 样品准备

X ul 5ug总RNA (total RNA) 或者10ng微小RNA(miRNA)

10 ul Oligo mix

20 ul Annealing buffer

X ul ddH₂O

40ul (总体积)

(2) 在PCR仪器上, 将上述混合液先在72°C放置5分钟, 然后再在53°C放置90分钟。

2. miRNA/oligo 杂交体的选择

(1) 洗涤磁珠 (Beads washing)

- 轻轻用手敲打管子来混匀磁珠
- 吸取5 ul混匀后的磁珠, 加入到0.2ml PCR的管子里
- 加入100 ul退火缓冲液(annealing buffer), 置于磁力架上30秒钟
- 吸出并丢弃上层液体
- 将管子从磁力架上拿出备用

(2) 磁珠选择 (Beads selection)

- 加入40 ul磁珠结合缓冲液 (Bead binding buffer) 到上面第1步准备好的40ul退火混合液中, 然后加入到第2(1)步中的磁珠中, 并混匀
- 在37°C反应30分钟
- 将磁珠混合液置于磁力架上30秒钟, 吸出缓冲液
- 将管子从磁力架上取下, 加入100ul的磁珠洗涤缓冲液 (Bead wash buffer), 用移液器来轻轻的上下吹打, 然后置于磁力架上30秒钟, 然后吸出缓冲液
- 重复以上洗涤过程一次

3. miRNA特异性的寡核苷酸连接成单一分子

(1) 在混匀后的磁珠中加入50ul的连接缓冲液 (Ligation buffer), 用移液器来轻轻的上下吹打, 置于磁力架上30秒钟, 然后吸出缓冲液

(2) 将管子从磁力架上取下, 加入20ul连接缓冲液 (Ligation buffer), 用移液器来轻轻的上下吹打混匀, 然后加入2ul连接酶 (ligase), 置于37°C反应90分钟

4. T7RNA转录

- (1) 在第3步中准备好的连接混合液中直接加入100ul的磁珠洗涤缓冲液(Bead washing buffer), 用移液器来轻轻的上下吹打, 置于磁力架上30秒钟, 然后吸出缓冲液
- (2) 将管子从磁力架上取下, 加入20ul延伸混合液(Extension mix), 并混匀珠子
- (3) 将该混合液置于PCR仪上, 按照下面程序来处理样品: 94°C 2分钟, 54°C 1分钟, 72°C 1.5分钟, 和94°C 30秒钟.
- (4) 将管子从PCR仪上取出, 置于磁力架上30秒钟, 然后立即吸出该延伸混合液(20ul)到另外一个干净的管子中(注意是保留液体, 丢弃磁珠)
- (5) 加入20ul标记混合液(Labeling mix)和1ul的T7 RNA聚合酶(T7RNA polymerase)到管子中
- (6) 置于37°C 1个小时
- (7) 转录好的RNA可以用于杂交反应

5. 预杂交和杂交

- (1) 将杂交膜(array membrane)置于50 ml的离心管中, 加入纯净水(ddH₂O)来润湿杂交膜, 倒掉纯净水。注意有预先点阵的一面应面向离心管管心
- (2) 加入4ml预热的1x杂交液(Hybridization buffer), 在分子杂交仪(Hybridization oven)中至少反应30-60分钟, 温度设定于42°C
- (3) 倒掉1x杂交液(Hybridization buffer), 重新加入4ml新的预热过的1x杂交液(Hybridization buffer)和40ul转录好的RNA混合液(第4步), 然后置于分子杂交仪(Hybridization oven)中杂交过夜(42°C)
- (4) 倒掉杂交液, 按照下述方法来洗涤杂交膜:
 - 加入20ml 1x杂交洗涤缓冲液(Hybridization wash buffer)来清洗杂交膜, 并倒掉
 - 加入20ml 1x杂交洗涤缓冲液(Hybridization wash buffer)置于42°C 20分钟, 倒掉缓冲液

6. 显色检测 (Detection)

- (1) 使用镊子, 小心地将杂交膜转移到一个容器中, 例如用于装200ul pipette tips的空盒子
- (2) 加入10ml 1X的显色洗涤缓冲液(1x Detection wash buffer), 漂洗一下, 倒掉
- (3) 用15ml的封闭液(Blocking buffer)来封闭杂交膜(室温, 30分钟), 并轻轻的摇动容器
- (4) 将15ul的亲素酶连接体(Streptavidin-HRP conjugate)加入到1ml 1x的封闭液(Blocking buffer), 并将稀释后亲素酶连接体转移到容器里, 请注意不要直接将亲素酶连接体加到杂交膜上, 而是加到杂交膜四周(Do not add the HRP diluted solution directly onto the membrane.)
- (5) 继续在室温下摇动容器(45分钟)
- (6) 倒掉封闭液, 并在室温下, 用15ml的1x显色洗涤液(Detection washing buffer)洗涤杂交膜3次, 每次10分钟
- (7) 混合等体积的底物A和B。将杂交膜置于检测膜(Detection sheet)的底层上, 用2ml的底物混合液来覆盖杂交膜。然后覆盖上检测膜的上层, 在室温中反应5分钟
- (8) 用纸巾擦去多余的底物。然后进行胶片曝光(例如使用Hyperfilm ECL)(2-10分钟)或者在成像系统中分析(例如 FluorChem imager from Alpha Innotech)。不管用哪种方法, 都需要曝光不同的时间, 来得到最佳的实验结果
- (9) 利用下图来定位不同位点上的人源性miRNA

Let-7a	Let-7b	Let-7c	Let-7d	Let-7e	Let-7f	Let-7g	Let-7i	miR-1	miR-7
miR-9	miR-10a	miR-15a	miR-15b	miR-16	miR-17-5p	miR-18a	miR-18b	miR-19a	miR-19b
miR-20a	miR-21	miR-25	miR-28	miR-34a	miR-99a	miR-122a	miR-124a	miR-125a	miR-125b
miR-126	miR-131	miR-133a	miR-133b	miR-143	miR-145	miR-146a	miR-146b	miR-148a	miR-155
miR-181a	miR-181b	miR-181c	miR-182	miR-192	miR-194	miR-195	miR-199a	miR-199b	miR-199a*
miR-200a	miR-200c	miR-204	miR-206	miR-216	miR-223	miR-224	miR-342	miR-368	miR-375
miR-9-1	miR-10b	miR-17-3p	miR-22	miR-23a	miR-24	miR-26a	miR-26b	miR-27a	miR-27b
miR-29a	miR-29b	miR-29c	miR-30a	miR-30b	miR-30c	miR-30c	miR-92	miR-92b	miR-93
miR-95	miR-101-1	miR-103	miR-106a	miR-106b	miR-107	miR-128a	miR-128b	miR-132	miR-134
miR-135b	miR-136	miR-137	miR-140	miR-141	miR-142-3p	miR-149	miR-150	miR-151	miR-153
miR-154	miR-181d	miR-183	miR-185	miR-186	miR-188	miR-190	miR-191	miR-196a	miR-196b
miR-197	miR-198	miR-200b	miR-202	miR-203	miR-205	miR-210	miR-214	miR-215	miR-218
miR-219	miR-221	miR-222	miR-296	miR-372	miR-373	miR-488	miR-100	miR-127	miR-142-5p
miR-31	miR-213	RNU48							

实验问题解答

1. 信号太弱，原因：

- 总RNA中没有包含小RNA
- RNA可能降解了
- 如果对照点(alignment spots)上的信号也微弱的话，有可能是亲和素酶联接体的结合时间太短，或者最后显色的时候，曝光时间太短

2. 背景不均匀

- 底物在杂交膜上分布不均

参考文献：

1. Ambros, V. (2003), MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*. 113:673–676.
2. Poy, et. al. (2004) A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 432:226–230.
3. Berezikov, et. al. (2006) Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res*. 16:1289–1298.
4. Calin, et. al. (2002) Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:15524–15529.
5. Calin, et. al. (2004) MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101:11755–11760.