

**描述:** HaiGene TaqMan miRNA 反转录试剂盒采用加 A 法进行反转录, 加 A 法的反转录效率远高于茎环法, 因此, 采用该方法可极大的提高检测灵敏度 (原理见图 1)。该试剂盒操作简单, 仅需要两步即可轻松完成 miRNA 的 cDNA 合成, 合成的 cDNA 可用于所有 miRNA 的后续定量检测。反转录完毕后采用特异性的上游引物和接头引物进行 PCR 扩增, FAM 标记 TaqMan 探针作为荧光报告基团进行定量检测 (原理见图 1)。

HaiGene 的 TaqMan miRNA 反转录试剂盒专用于 miRNAs 分子的反转录试验, 转录获得的 cDNA 产物用于 TaqMan 定量 PCR 方法检测 miRNAs 分子 (仅适用 HaiGene TaqMan miRNA 定量 PCR 试剂盒, 货号: TAPXXXXX)。

## 组分

| 名称                            | D1802A<br>(25T×20 μl) | D1802B<br>(100T×20 μl) |
|-------------------------------|-----------------------|------------------------|
| 5×TaqMan miRNA RT Solution A  | 25 μl                 | 100 μl                 |
| 10×TaqMan miRNA RT Solution B | 50 μl                 | 200 μl                 |
| 10×TaqMan miRNA RT Primer     | 50 μl                 | 200 μl                 |
| RNase Free H <sub>2</sub> O   | 1 ml                  | 1 ml×2                 |

**储存:** 请置于-20°C, 可保存 2 年; 避免反复冻融

## 操作方法

1 按以下组分在 0.2 ml EP 管中配制应液

miRNA (5~100 ng/μl) 4 μl

5×TaqMan miRNA RT Solution A 1 μl

**注意:** 不建议使用 Total RNA, Total RNA 试验结果通常差于 miRNA。

2 在 PCR 仪上按以下条件进行加 A 反应:

37°C 30min

85°C 5min

3 反应完毕后, 在上述 5μl 反应体系中加入如下试剂, 并混合均匀。

10×TaqMan miRNA RT Primer 2 μl

10×TaqMan miRNA RT Solution B 2 μl

H<sub>2</sub>O 11 μl

4 在 PCR 仪上按以下条件进行反转录反应:

30°C 5min

55°C 60min

95°C 5min

获得的 cDNA 产物可用于多个目标 miRNA 的检测。反转录完毕后获得的 miRNA cDNA, 可加入 20~80μl ddH<sub>2</sub>O 稀释 2~5 倍, 通常取 2μl 即可用于 HG TaqMan miRNA 定量 PCR 试剂盒检测(货号: TAPXXXXX, 该试剂盒有一万余种, 详细列表可查询 HG TaqMan miRNA qPCR kit.xls)。

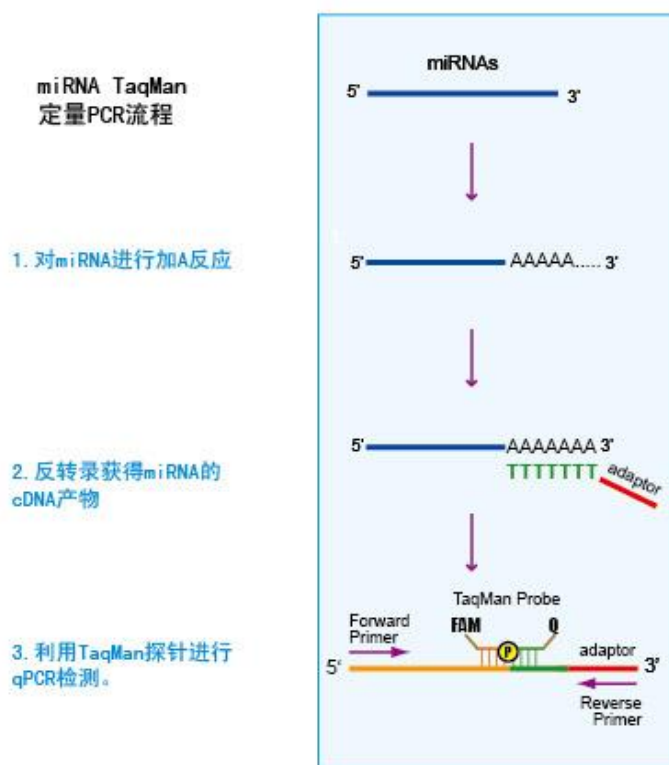


图 1, HaiGene TaqMan miRNAs 定量检测原理

5 利用 HG TaqMan qPCR Kit 对上述 miRNA cDNA 产物进行 RealTime PCR 检测

内参基因可选择使用: TaqMan RNU6B miRNA 定量 PCR 试剂盒(货号: TAP01501)适用于人、鼠等哺乳动物组织、细胞样品; TaqMan hsa-miR16 miRNA 定量 PCR 试剂盒(货号: TAP01511) 适用于来源于人、鼠全血样品。

### (1) 配制反应体系

#### 根据机型选择步骤 A 或 B

A: 需要添加 ROX 染料进行反应孔间信号校正的 Real-Time PCR 仪, 包括: ABI 7000/7300/7500/7900 等。  
按照如下组分配制 20 $\mu$ l PCR 反应体系:

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| <u>5<math>\times</math>Golden HS TaqMan qPCR Mix</u> | <u>4 <math>\mu</math>l</u>        |
| <u>50<math>\times</math>ROX Reference Dye</u>        | <u>0.4 <math>\mu</math>l</u>      |
| <u>20<math>\times</math>miRNA TaqMan Assay</u>       | <u>1 <math>\mu</math>l</u>        |
| <u>*cDNA 模板</u>                                      | <u>1~2.5 <math>\mu</math>l</u>    |
| <u>ddH<sub>2</sub>O</u>                              | <u>Up to 20 <math>\mu</math>l</u> |

B: 无需添加 ROX 染料进行反应孔间信号校正的 Real-Time PCR 仪, 包括: LightCycler (Roche); MyiQ 2、CFX96 Real-Time PCR (Bio-Rad); Line-Gene (杭州博日) 等。  
按照如下组分配制 20 $\mu$ l PCR 反应体系:

|  |                                   |
|--|-----------------------------------|
| <u>5<math>\times</math>Golden HS TaqMan qPCR Mix</u> | <u>4 <math>\mu</math>l</u>        |
| <u>20<math>\times</math>miRNA TaqMan Assay</u>       | <u>1 <math>\mu</math>l</u>        |
| <u>*cDNA 模板</u>                                      | <u>1~2.5 <math>\mu</math>l</u>    |
| <u>ddH<sub>2</sub>O</u>                              | <u>Up to 20 <math>\mu</math>l</u> |

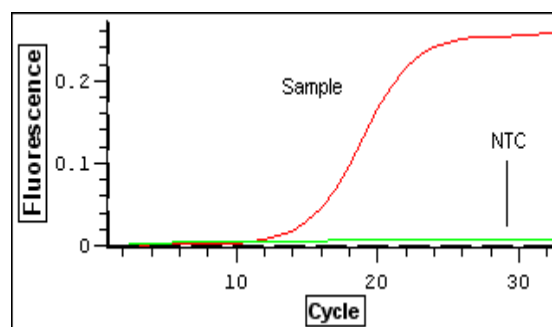
### (2) 进行 Real-Time PCR 反应

通常采用两步法, 程序如下:

|          |                 |       |          |
|----------|-----------------|-------|----------|
| Stage 1: | 95 $^{\circ}$ C | 15min |          |
| Stage 2: | 95 $^{\circ}$ C | 10s   |          |
|          | 60 $^{\circ}$ C | 60s   | 40cycles |

(收集信号采用 FAM 染料通道)

反应结束后确认 Real-Time PCR 的 cDNA 样品和 NTC 阴性对照的扩增曲线。



### References:

- [1] Development of a robust, low cost stem-loop real-time quantification PCR technique for miRNA expression analysis. *Mol Biol Rep.* 2013. PMID: 23307300.
- [2] Quantitative stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. *Methods Mol Biol.* 2011. PMID: 21533691.
- [3] MicroRNA detection in prostate tumors by quantitative real-time PCR (qPCR). *J Vis Exp.* 2012. PMID: 22643910.
- [4] Circulating microRNA-196a as a candidate diagnostic biomarker for chronic hepatitis C. *Mol Med Rep.* 2015. PMID: 25738504.
- [5] Novel real-time PCR assay of microRNAs using S-Poly(T), a specific oligo(dT) reverse transcription primer with excellent sensitivity and specificity. *PLoS One.* 2012. PMID: 23152780.
- [6] Diagnostic microRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. Proof of principle. *Cancer Genomics Proteomics.* 2013. PMID: 23741026.
- [7] Stem-loop RT-qPCR for microRNA expression profiling. *Methods Mol Biol.* 2012. PMID: 22144190.
- [8] Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2011. PMID: 22066022.