

描述: HaiGene 血清血浆 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 的血清血浆 TaqMan miRNA 反转录试剂盒专用于血清血浆 miRNAs 分子的反转录试验 (不可用于组织和细胞), 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	D1803A (25T×25 μl)	D1803B (100T×25 μl)
5×TaqMan miRNA RT Solution A	65 μl	250 μl
10×TaqMan miRNA RT Solution B	65 μl	250 μl
10×PS TaqMan miRNA RT Primer	65 μl	250 μl
RNase Free H ₂ 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

血清血浆 miRNA 10 μl

5×TaqMan miRNA RT Solution A 2.5 μl

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 12.5μl 反应体系中加入如下试剂, 并混合均匀。

10×PS TaqMan miRNA RT Primer 2.5 μl

10×TaqMan miRNA RT Solution B 2.5 μl

H₂O 7.5 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。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)。

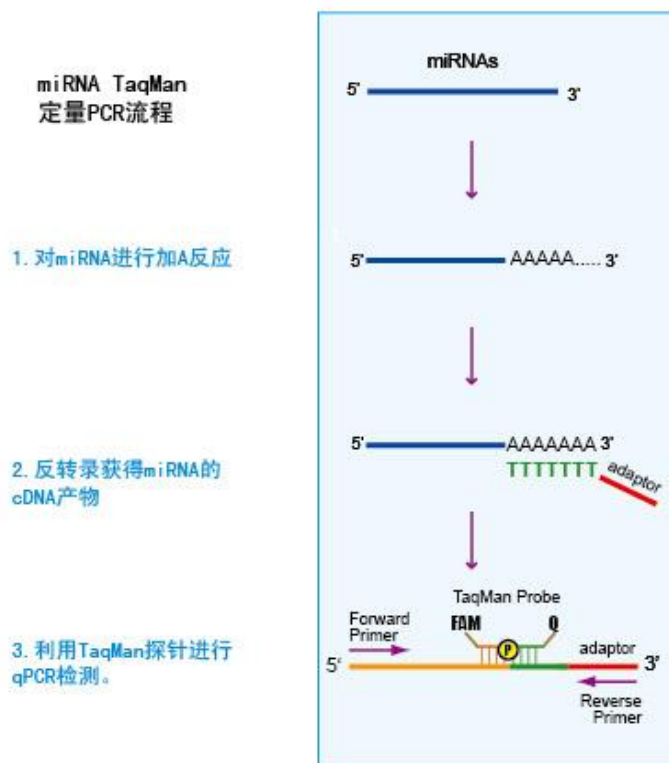


图 1, HaiGene TaqMan miRNAs 定量检测原理

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 hsa-miR16 miRNA 定量 PCR 试剂盒(货号: TAP01511); TaqMan cel-miR-39 miRNA 定量 PCR 试剂盒(货号: TAP01513)。

(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 μ l PCR 反应体系:

5 \times Golden HS TaqMan qPCR Mix	4 μ l
50 \times ROX Reference Dye	0.4 μ l
20 \times miRNA TaqMan Assay	1 μ l
cDNA 模板	2 μ l
ddH ₂ O	12.6 μ l

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 μ l PCR 反应体系:

5 \times Golden HS TaqMan qPCR Mix	4 μ l
20 \times miRNA TaqMan Assay	1 μ l
cDNA 模板	2 μ l
ddH ₂ O	12.6 μ l

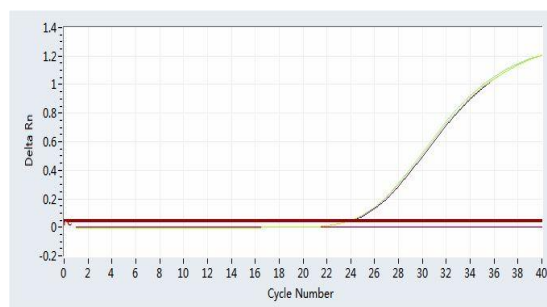
(2) 进行 Real-Time PCR 反应

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(hsa-miR16)。



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.