

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 (25T×20 μl)	D1802B (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 ₂ O	1 ml	1 ml×2

储存: 请置于-20℃，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℃ 30min

85℃ 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

H₂O 11 μl

4 在 PCR 仪上按以下条件进行反转录反应:

30℃ 5min

55℃ 60min

95℃ 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 ddH₂O 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)。

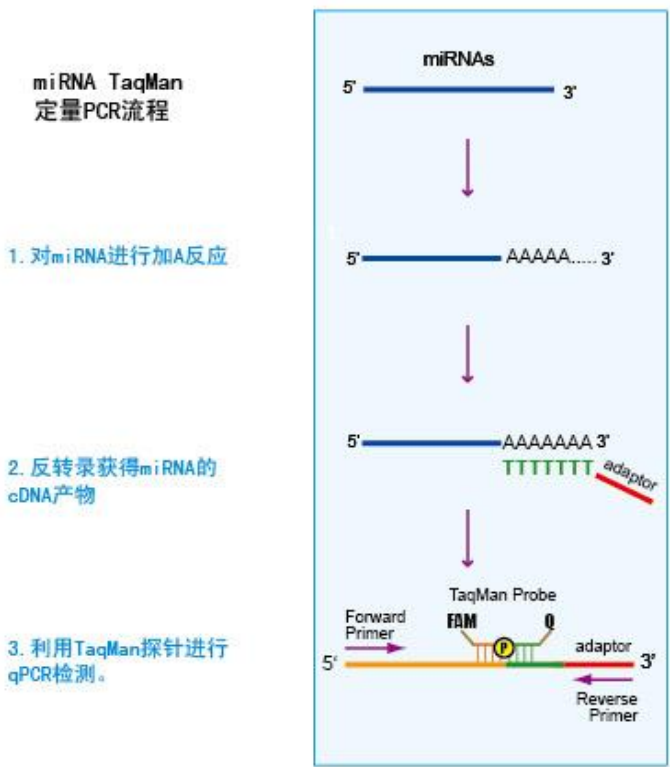


图 1， HaiGene TaqMan miRNAs 定量检测原理

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。

5.1 配制反应体系(20 μ l)

5 $\times$ Golden HS TaqMan qPCR Mix	4 μ l
20 $\times$ miRNA TaqMan Assay	1 μ l
*cDNA 模板	1~2.5 μ l
ddH ₂ O	Up to 20 μ l

5.2 进行 Real-Time PCR 反应

通常采用两步法, 程序如下:

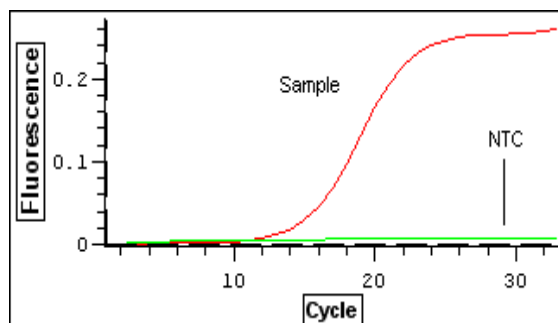
Stage 1: 95 $^{\circ}$ C 15 min (热启动, 不可缩短时间)

Stage 2: 95 $^{\circ}$ C 10 s

60 $^{\circ}$ C 30 s 40cycles

(收集信号采用 FAM 染料通道, Rox 校正信号选择 None)

5.3 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.