

## TaqMan® Advanced miRNA Assays 简要操作说明

货号：A25576

本操作说明提供了 TaqMan® Advanced miRNA Assays 的简要操作指南，该试剂需要与 TaqMan® Advanced miRNA cDNA Synthesis Kit (Cat. no. A28007) 配套使用。

更详细信息，请至赛默飞世尔官方网站下载英文版说明书：[https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100027897\\_TaqManAdv\\_miRNA\\_Assays\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100027897_TaqManAdv_miRNA_Assays_UG.pdf)

### RNA 准备注意事项：

- 在提取总 RNA 时，需要确保 small RNA 完整存留在样本中。
- 对于组织样本，每个反应需要总 RNA 的量为 1-10 ng。
- 对于从全血、血浆、血清等液体样本提取的总 RNA，每个反应可以加入 2  $\mu\text{L}$  的总 RNA。
- 为了获得最佳的逆转录效果，RNA 必须符合以下条件：
  - 1) 不含逆转录抑制剂或 PCR 抑制剂；
  - 2) 溶解在 PCR 兼容性的溶液中；
  - 3) 无 RNase 酶；
  - 4) 模板必须是非变性的总 RNA。

### 一. 加尾反应

- 冰上解冻样本及 cDNA 合成所需的试剂，轻微涡旋，短暂离心。注意：提前将 50% PEG 8000 试剂取出，让其恢复至室温备用。
- 在 1.5 mL 离心管中准备以下 poly(A)加尾反应混合液：

组成成分	1 次反应	4 次反应*	10 次反应*
10×Poly (A) Buffer	0.5 $\mu\text{L}$	2.2 $\mu\text{L}$	5.5 $\mu\text{L}$
ATP	0.5 $\mu\text{L}$	2.2 $\mu\text{L}$	5.5 $\mu\text{L}$
Poly (A) Enzyme	0.3 $\mu\text{L}$	1.3 $\mu\text{L}$	3.3 $\mu\text{L}$
RNase-free water	1.7 $\mu\text{L}$	7.5 $\mu\text{L}$	18.7 $\mu\text{L}$
总体积	3 $\mu\text{L}$	13.2 $\mu\text{L}$	33 $\mu\text{L}$

\*为避免移液损失，配制多个反应孔时，请为各组分预留 10% 的余量。列表中各组分体积已包含了增加的 10%。

- 涡旋 poly(A)加尾反应混合液，并短暂离心。
- 取新的反应板/管，在每个反应孔/管中加入 2  $\mu\text{L}$  样本及 3  $\mu\text{L}$  混合液，每个反应孔的总体积为 5  $\mu\text{L}$ 。
- 密封反应板/管，充分涡旋混匀，将所有成分离心至管底。

6. 将反应板/管放到 PCR 仪上，参照以下程序运行：

步骤	温度	时间
多聚腺苷酸化	37°C	45 分钟
终止反应	65°C	10 分钟
Hold	4°C	Hold

7. 加尾反应结束后，需要立即进行后续的连接反应。

## 二. 连接接头反应

1. 在1.5 mL的离心管里，根据反应的次数配制以下连接反应的预混液。

组分	1次反应	4次反应*	10次反应*
5xDNA Ligase Buffer	3 $\mu$ L	13.2 $\mu$ L	33 $\mu$ L
50% PEG8000**	4.5 $\mu$ L	19.8 $\mu$ L	49.5 $\mu$ L
25xLigase Adaptor	0.6 $\mu$ L	2.6 $\mu$ L	6.6 $\mu$ L
RNA Ligase	1.5 $\mu$ L	6.6 $\mu$ L	16.5 $\mu$ L
RNase-free water	0.4 $\mu$ L	1.8 $\mu$ L	4.4 $\mu$ L
总体系	10 $\mu$ L	44 $\mu$ L	110 $\mu$ L

\*为避免移液损失，配制多个反应孔时，请为各组分预留 10%的余量。列表中各组分体积已包含了增加的 10%。

\*\*50%PEG 8000 非常粘稠，为了准确吸取，请在室温下操作，缓慢抽吸并分配溶液。

2. 涡旋混匀连接反应的预混液，短暂离心。

3. 将 10  $\mu$ L 的连接反应体系加入到含有 poly(A)加尾反应产物（来自于第一步加尾反应）的反应板/管里，每孔/管总反应体积为 15  $\mu$ L。

4. 密封反应板/管，短暂涡旋混匀（推荐使用 Eppendorf™ MixMate™，Cat. No. 21-379-00，1900 rpm，1分钟）。为了保证连接反应的有效进行，必须进行充分混匀。

5. 短暂离心反应板/管，把所有反应组分离心至板/管底。

6. 把反应板/管放到PCR仪上，设置反应程序：

步骤	温度	持续时间
连接	16°C	60 分钟
Hold	4°C	Hold

7. 连接反应完成后，需要立即进行逆转录反应。

## 三. 逆转录反应

1. 在 1.5 mL 的离心管里，根据反应的次数配制以下逆转录混合液：

组分	1次反应	4次反应*	10次反应*
5×RT Buffer	6 μL	26.4 μL	66 μL
dNTP Mix (25 mM each)	1.2 μL	5.3 μL	13.2 μL
20×Universal RT Primer	1.5 μL	6.6 μL	16.5 μL
10×RT Enzyme Mix	3 μL	13.2 μL	33 μL
RNase-free water	3.3 μL	14.5 μL	36.3 μL
总体积	15 μL	66 μL	165 μL

\*为避免移液损失，配制多个反应孔时，请为各组分预留 10%的余量。列表中各组分体积已包含了增加的 10%。

2. 涡旋混匀逆转录混合液，短暂离心。
3. 将 15 μL 的逆转录混合液加入到含有连接反应产物（来自于第二步连接反应）的反应管里（每孔/管总反应体积为 30 μL）。
4. 密封反应板/管，短暂涡旋混匀。
5. 短暂离心反应板/管，把所有反应组分离心至板/管底。
6. 把反应板/管放到 PCR 仪上，设置反应程序：

步骤	温度	持续时间
逆转录反应	42°C	15 min
终止反应	85°C	5 min
Hold	4°C	Hold

7. 逆转录反应之后可以立即进行microRNA 预扩增，或将逆转录产物储存于-20°C（最长两个月）。

#### 四. miR-Amp 反应（microRNA 预扩增）

1. 在 1.5 mL 的离心管里，根据反应的次数配制以下预扩增混合液：

组分	1次反应	4次反应*	10次反应*
2×miR-Amp Master Mix	25 μL	110 μL	275 μL
20×miR-Amp Primer Mix	2.5 μL	11 μL	27.5 μL
RNase-free water	17.5 μL	77 μL	192.5 μL
总体系	45 μL	198 μL	495 μL

\*为避免移液损失，配制多个反应孔时，请为各组分预留 10%的余量。列表中各组分体积已包含了增加的 10%。

2. 涡旋混匀，离心。
3. 在新反应板/管的每个孔里加 45 μL 的 miR-Amp 预扩增混合液。

4. 在反应板/管的每个孔里加 5  $\mu\text{L}$  逆转录反应产物（来自于第三步逆转录反应），总反应体积为 50  $\mu\text{L}$ 。
5. 密封反应板/管，轻微涡旋混匀，离心。
6. 把反应板放入 PCR 仪，参照下表设置反应程序，并将仪器设置为最大升温速度：

步骤	温度	持续时间	循环数
酶激活	95°C	5分钟	1
变性	95°C	3秒	14
退火/延伸	60°C	30秒	
终止反应	99°C	10分钟	1
Hold	4°C	Hold	1

7. 继续进行实时荧光定量PCR实验；或者将未稀释的预扩增产物置于-20°C储存（最长两个月）。

#### 实时荧光定量PCR实验总体要求：

Assay（引物和探针的预混液）要置于-20度避光保存；建议对每个反应进行四次重复；根据您的试验要求，可以将各组分混合成预混液，根据反应孔的数量，列出预混液中要包含的成分，为各组分预留10%的余量，以免移液损失；如果要使用较小的反应体积，请按比例缩减反应的所有组分。不推荐<10  $\mu\text{L}$ 的反应体系。

#### 五. 配置qPCR反应体系：

1. 将Assay置于冰上融化，轻微涡旋混匀，离心，置于冰上待用。
2. 1:10稀释cDNA模板（来自于第四步的miR-Amp预扩增产物）。
3. 轻轻晃动预混液（master mix）混匀，不用颠倒。
4. 在1.5 mL的离心管里，根据反应的次数配制以下qPCR混合液：

组分	1次反应	4次反应*
2 $\times$ TaqMan <sup>®</sup> Fast Advanced Master Mix	10 $\mu\text{L}$	44 $\mu\text{L}$
TaqMan <sup>®</sup> Advanced miRNA Assay	1 $\mu\text{L}$	4.4 $\mu\text{L}$
RNase-free water	4 $\mu\text{L}$	17.6 $\mu\text{L}$
总体积	15 $\mu\text{L}$	66 $\mu\text{L}$

\*为避免移液损失，配制多个反应孔时，请为各组分预留10%的余量。列表中各组分体积已包含了增加的10%。

5. 充分涡旋混匀各组分，短暂离心。
6. 在PCR反应板的每个孔里加入15  $\mu\text{L}$  qPCR反应混合液。
7. 在每个孔里加5  $\mu\text{L}$  稀释后的cDNA模板，总体积为20  $\mu\text{L}$ 。
8. 封上光学贴膜，轻微涡旋混匀，离心。

## 六. 运行 qPCR 反应程序:

1. 将反应板放入qPCR仪中。
2. 参照下表设置qPCR反应条件:

StepOnePlus™, ViiA™ 7, QuantStudio® systems			
Step	Temperature	Duration	Cycles
酶激活	95°C	20 秒	1
变性	95°C	1 秒	40
退火/延伸	60°C	20 秒	
7500, 7500 Fast systems			
Step	Temperature	Duration	Cycles
酶激活	95°C	20 秒	1
变性	95°C	3 秒	40
退火/延伸	60°C	30秒	

3. 设置反应体积 (20 µL)

4. 运行程序

## 七. 实验数据分析

针对不同的仪器类型, 数据分析也略有不同。一般情况下, 数据分析主要包括:

1. 观察扩增曲线, 根据需要进行设置, 比如:
  - a. 设置合适的基线和阈值线
  - b. 将一些典型的异常值从分析中剔除掉
2. 在孔位表或者结果表中, 观察复孔之间的 Ct 值是否有差异。
3. 对于绝对定量, 观察标准曲线的斜率、扩增效率、 $R^2$  值、截距、Ct 值和异常值。

出版编号 MAN0019132 修订版 A



Applied Biosystems  
技术支持服务中心  
800-820-8982  
400-820-8982

Thermo Fisher Scientific Inc.

**ThermoFisher**  
SCIENTIFIC