

TaqMan MicroRNA Assays 简要操作说明 (Rev. A.0)

本操作说明提供了 TaqMan MicroRNA Assays 的简要操作指南。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://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042167.pdf

一. 配制反转录体系

1. 准备总 RNA

- (1) 注意：应选择适当的提取方法，避免提取过程中丢失 microRNA
- (2) RNA 定量

2. 准备反转录预混液

- (1) 将 Taqman MicroRNA 反转录试剂盒中的组分放在冰上融化后涡旋混匀。
- (2) 准备一支无 RNA 酶的离心管，参照下表，在冰上配制反转录预混液。

组成成分	反应体系
100 mM dNTPs (with dTTP)	0.15 μ l
反转录酶	1.00 μ l
10 X 反转录 buffer	1.50 μ l
RNase 抑制剂	0.19 μ l
无核酸酶 H ₂ O	4.16 μ l
总体积	7.00 μ l

- (3) 涡旋混匀，离心。
- (4) 将反转录预混液放置在冰上备用。

3. 配制反转录体系

- (1) 在冰上将 5x 反转录引物和 RNA 模板融化。涡旋混匀。
- (2) 15 μ l 的反转录体系中，加入 1-10 ng RNA (5 μ l)，7 μ l 反转录预混液，3 μ l 反转录引物，涡旋混匀，离心。
- (3) 将反应管放在冰上放置 5 分钟，然后进行反转录实验。

4. 设置反转录步骤

将反应管放入 PCR 仪内，按照下列的反应程序进行设置：

模式：标准模式，反应体积：15 μ l

阶段	时间	温度
退火	30 分钟	16°C
延伸	30 分钟	42°C
失活	5 分钟	85°C
	∞	4°C

二. 定量 PCR 扩增

1. 准备定量 PCR 反应体系

- (1) 将反应用到的组分放在冰上融化，混匀后放置冰上备用。
- (2) 按照 20 μl 反应体系计算所需要的试剂量。将各组分加入离心管中，涡旋混匀，离心。注意：每个反应推荐作 3 个副孔。

组成成分	反应体系
TaqMan Universal PCR Master Mix II, no UNG ^[1]	10.00 μl
ddH ₂ O	7.67 μl
Taqman MicroRNA Assay (20X)	1.00 μl
反转录产物	1.33 μl ^[2]
总体积	20.00 μl

^[1] Taqman Universal PCR Master Mix II with UNG 也可用于 TaqMan MicroRNA Assay 的检测。

^[2] 每个反应中最多加入 1.33 μl 反转录产物

2. 准备定量 PCR 反应板

- (1) 在每个反应孔中加入 20 μl 的反应液。
- (2) 将反应板的膜封好或将八联管的管盖盖紧，离心。避免产生气泡。

3. 运行定量 PCR 反应程序

- (1) 反应程序：标准模式

反应体积：20 μl

设置反应程序如下：

阶段	UNG 酶激活 ^[1]	预变性	循环 (40 X)	
			变性	退火/延伸
温度	50°C	95°C	95°C	60°C
时间	2 分钟	10 分钟	15 秒	60 秒

^[1] 如果反应液中没有 UNG 酶，可以删除此步骤

- (2) 将反应板放入定量 PCR 仪中，开始反应。



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

© 2017 Thermo Fisher Scientific Inc.

ThermoFisher
SCIENTIFIC