

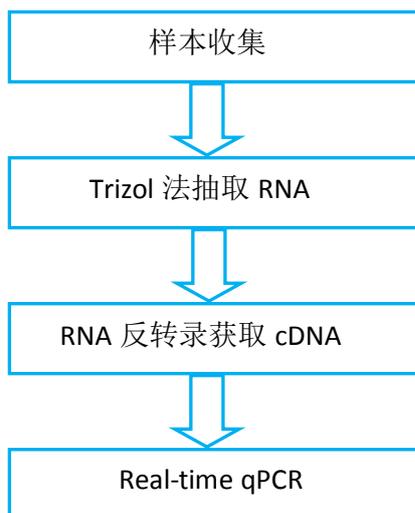
Real-time qPCR 检测

操作手册

一、实验概述

Real-time Quantitative PCR Detecting System, 即实时荧光定量核酸扩增检测系统, 也叫实时定量基因扩增荧光检测系统, 简称 qPCR。是一种在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程, 最后通过特定数学原理对未知模板进行定量分析的方法, 实现了 PCR 从定性到定量的飞跃。

二、实验流程



三、实验材料:

1. 主要试剂

试剂名称	试剂来源	Cat.No.
Trizol	上海普飞	3101-100
M-MLV	promega	M1705
dNTPs	promega	U1240
oligo dT	上海生工	B0205
Bulge-Loop™ miRNA qPCR Primer Set	广州锐博	详见实验报告
Rnase Inhibitor	promega	N2115
Primer(R&F)	上海生工	详见实验报告
SYBR Master Mixture	TAKARA	DRR041B

2. 主要器材

器材名称	来源	Cat.No
Nanodrop 分光光度计	Thermo	2000/2000C
稳压电泳仪	上海天能	EPS-600
超细匀浆机	FLUKO 公司	F6/10
Real time PCR 仪器	Agilent 公司	MX3000p
反转录耗材	Axygen	

四、实验步骤:

1. 总 RNA 抽提

(1) 收取样品, Trizol 裂解。

细胞样品: 收集细胞 (6 孔板 80% 细胞密度), 2000 rpm 离心 5 min, 去上清, 细胞沉淀中加入 1 mL Trizol, 充分混匀后室温静置 5 min, 然后转移至新的 1.5 mL EP 管中;

组织样品: 将待研磨的组织样品从液氮或者 -80°C 冰箱中取出, 无菌刀片于干冰上将组织样品切割成约 3 mm×3 mm×3 mm 大小, 置于装有 1 mL Trizol 裂解液的 1.5 mL EP 管中。将超细匀浆机工作头浸入 Trizol 裂解液中 5-10 s 灭活 RNA 酶后, 组织研磨; 研磨后 4°C, 5000 rpm 3 min 离心, 弃沉淀, 吸取上清移至新的 1.5 mL EP 管中。

(2) 每管加入 200 μ L 氯仿, 用手上下颠倒 EP 管 15 s, 室温静置 10 min。

(3) 4°C、12800 rpm, 离心 15 min。

(4) 吸取上层液体移至新的 1.5 mL EP 管, 加入等体积预冷的异丙醇, 混匀后 4°C 静置 10 min。

(5) 4°C、12800 rpm 离心 12 min 后, 弃上清。

(6) 加入 1 mL、75% 乙醇 (用 DEPC 水新鲜配制), 洗涤沉淀。

(7) 4°C、11800 rpm 离心 5 min, 弃去大部分上清。

(8) 4°C、11800 rpm 再次离心 5 min, 弃去上清, 室温干燥。

(9) 待 RNA 沉淀基本透明时, 加入 RNase-free 水 (加入体积视 RNA 沉淀量而定) 至完全溶解, Nanodrop 2000/2000C 分光光度计分析测定所抽提 RNA 的浓度及质量。

2. 反转录获得 cDNA (使用 Promega M-MLV 试剂盒, protocol:

<http://cn.promega.com/resources/protocols/product-information-sheets/g/mmlv-reverse-transcriptase-protocol/>)

2.1 MicroRNA 反转录

配制引物:

- (1) 每 1nmol 引物加入 RNase-free water 200 μ L, 涡旋振荡充分溶解, 后瞬时离心, 配成终浓度为 5 μ M 引物储存液。
- (2) RT 引物: 取 5 μ M 的 RT 引物储存液 1 μ L, 加入 79 μ L 的 RNase-free water, 配制成 62.5 nM 的 RT 引物工作液 (如果需要配制多种 RT 引物混合工作液, 取各种 5 μ M 的 RT 引物工作液各 1 μ L, 最后加 RNase-free water 至 80 μ L 即可)。
- (3) PCR 引物: 按照 5 μ M 的浓度使用。

反转录:

- (1) 将 2 μ L 反转录引物 (0.5 μ g/ μ L) 和 2.0 μ g Total RNA 加入到 PCR 小管中, 补 RNase-Free H₂O 至 11 μ L; 混匀后离心, 70 $^{\circ}$ C 温浴 10 min; 之后立即置于冰水混合物中冰浴, 使反转录引物和模板退火。
- (2) 上述混合物按下表的比例, 在冰浴中进行反应体系 (25 μ L 体系) 配制, 混匀, 离心。

试剂	加入量
5 \times RT buffer	5 μ l
10 mM dNTPs	2 μ l
Rnasin (40U/ μ L)	0.4 μ l
M-MLV-RTase (200U/ μ l)	1 μ l
RNase-Free H ₂ O	5.6 μ l

- (3) 42 $^{\circ}$ C 水浴反应 1h, 然后 70 $^{\circ}$ C 水浴 10min 使 RT 酶失活, 得到的反转录产物 cDNA, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

2.2 RNA 反转录

- (1) 将 1 μ L Oligo dT (0.5 μ g/ μ L) 和 2.0 μ g Total RNA 加入到 PCR 小管中, 补充 RNase-Free H₂O 至 10 μ L; 混匀后离心, 70 $^{\circ}$ C 温浴 10 min; 之后立即置于冰水混合物中冰浴, 使 Oligo dT 和模板退火。
- (2) 在上述混合物中, 按下表的比例配制反应体系 (冰上进行), 混匀, 短暂离心

试剂	加入量
5 \times RT buffer	4 μ L
10 mM dNTPs	2 μ L
Rnasin (40 U/ μ L)	0.4 μ L

M-MLV-RTase (200 U/ μ L)	1 μ L
RNase-Free H ₂ O	2.6 μ L

(3) 上述体系在 42 °C水浴反应 1 h, 然后在 70 °C水浴 10 min 使 RT 酶失活, 将得到的 RT 产物 cDNA 置于-20 °C保存备用。

注: dNTPs 是 dATP , dCTP, dGTP, dTTP 的混合, 浓度为 10 mM

3. Real-time PCR 检测

(1) 按下列比例配置反应体系 (20 μ L 体系):

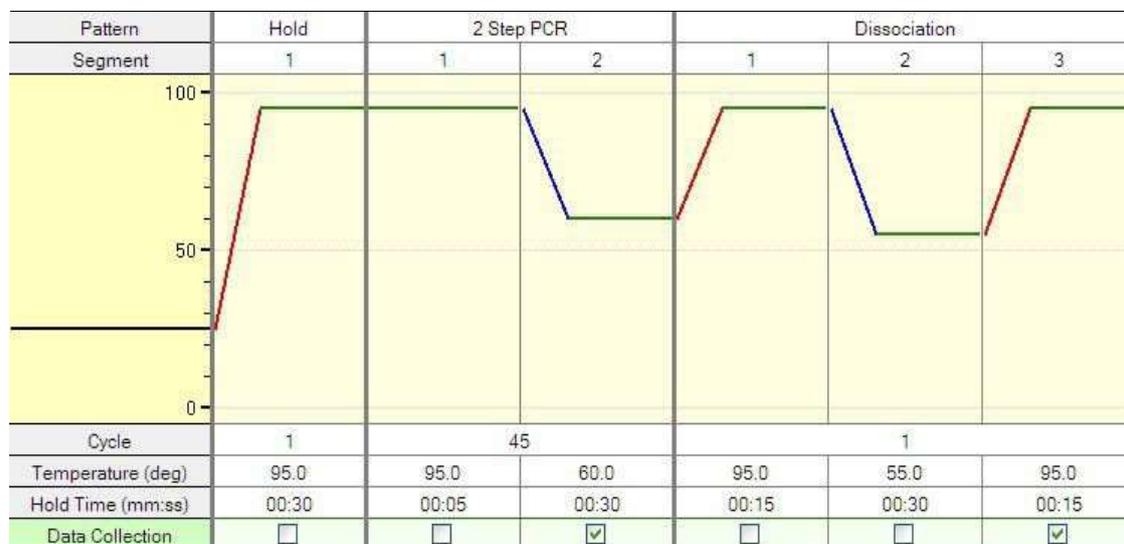
① MicroRAN PCR 引物来自广州市锐博生物科技有限公司。

试剂	加入量
SYBR premix ex taq	10.0 μ L
上游引物 (2.5 μ M)	2 μ L
下游引物 (2.5 μ M)	2 μ L
cDNA	2.0 μ L
RNase-Free H ₂ O	4.0 μ L

② RNA PCR

试剂	每管加入量
SYBR premix ex taq:	10.0 μ L
上游引物 (2.5 μ M)	0.5 μ L
下游引物 (2.5 μ M)	0.5 μ L
cDNA	1.0 μ L
RNase-Free H ₂ O	8.0 μ L

(2) 两步法进行 Real-Time PCR, 并制作熔解曲线, 程序如下:



五、数据分析

相对定量分析 $F=2^{-\Delta\Delta Ct}$

ΔCt =目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值;

$-\Delta\Delta Ct$ =NC 组 ΔCt 平均值-各样品 ΔCt 值;

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 反映各样品相对 NC 组样品目的基因的相对表达水平

六、参考文献

- [1] Svec D, et al. How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomol Detect Quantif*.2015,01:
- [2] Kubista M, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*. 2006, 27(2-3): 95-125.
- [3] Roth, M.J., Tanese, N. and Goff, S.P. Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem*.1985, 260:9326-35.
- [4] Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1989,8.64.
- [5] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-timeRT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001, 29(9):e45.
- [6] Bengtsson M, et al. Quantification of mRNA in single cells and modelling ofRT-qPCR induced noise. *BMC Mol Biol* 2008;9:63.