

# 实时荧光定量 PCR 具体实验步骤

## 1 样品 RNA 的抽提

①取冻存已裂解的细胞，室温放置 5 分钟使其完全溶解。

②两相分离 每 1ml 的 TRIZOL 试剂裂解的样品中加入 0.2ml 的氯仿，盖紧管盖。手动剧烈振荡管体 15 秒后，15 到 30℃孵育 2 到 3 分钟。4℃下 12000rpm 离心 15 分钟。离心后混合液体将分为下层的红色酚氯仿相，中间层以及无色水相上层。RNA 全部被分配于水相中。水相上层的体积大约是匀浆时加入的 TRIZOL 试剂的 60%。

③RNA 沉淀 将水相上层转移到一干净无 RNA 酶的离心管中。加等体积异丙醇混合以沉淀其中的 RNA，混匀后 15 到 30℃孵育 10 分钟后，于 4℃下 12000rpm 离心 10 分钟。此时离心前不可见的 RNA 沉淀将在管底部和侧壁上形成胶状沉淀块。

④RNA 清洗 移去上清液，每 1mlTRIZOL 试剂裂解的样品中加入至少 1ml 的 75%乙醇（75%乙醇用 DEPC $H_2O$  配制），清洗 RNA 沉淀。混匀后，4℃下 7000rpm 离心 5 分钟。

⑤RNA 干燥 小心吸去大部分乙醇溶液，使 RNA 沉淀在室温空气中干燥 5-10 分钟。

⑥溶解 RNA 沉淀 溶解 RNA 时，先加入无 RNA 酶的水 40 $\mu$ l 用枪反复吹打几次，使其完全溶解，获得的 RNA 溶液保存于-80℃待用。

## 2 RNA 质量检测

### 1) 紫外吸收法测定

先用稀释用的 TE 溶液将分光光度计调零。然后取少量 RNA 溶液用 TE 稀释（1:100）后，读取其在分光光度计 260nm 和 280nm 处的吸收值，测定 RNA 溶液 浓度和纯度。

#### ① 浓度测定

A260 下读值为 1 表示 40  $\mu$ g RNA/ml。样品 RNA 浓度( $\mu$ g/ml)计算公式为：A260  $\times$  稀释倍数  $\times$  40  $\mu$ g/ml。具体计算如下：

RNA 溶于 40  $\mu\text{l}$  DEPC 水中, 取 5 $\mu\text{l}$ , 1:100 稀释至 495 $\mu\text{l}$  的 TE 中, 测得  $A_{260} = 0.21$

RNA 浓度 =  $0.21 \times 100 \times 40 \mu\text{g/ml} = 840 \mu\text{g/ml}$  或  $0.84 \mu\text{g}/\mu\text{l}$

取 5 $\mu\text{l}$  用来测量以后, 剩余样品 RNA 为 35  $\mu\text{l}$ , 剩余 RNA 总量为:

$35 \mu\text{l} \times 0.84 \mu\text{g}/\mu\text{l} = 29.4 \mu\text{g}$

## ②纯度检测

RNA 溶液的  $A_{260}/A_{280}$  的比值即为 RNA 纯度, 比值范围 1.8 到 2.1。

## 2) 变性琼脂糖凝胶电泳测定

### ①制胶

1g 琼脂糖溶于 72ml 水中, 冷却至  $60^{\circ}\text{C}$ , 10 ml 的  $10\times$  MOPS 电泳缓冲液和 18 ml 的 37% 甲醛溶液(12.3 M)。

$10\times$ MOPS 电泳缓冲液

浓度 成分

0.4M MOPS, pH 7.0

0.1M 乙酸钠

0.01M EDTA

灌制凝胶板, 预留加样孔至少可以加入 25  $\mu\text{l}$  溶液。胶凝后取下梳子, 将凝胶板放入电泳槽内, 加足量的  $1\times$ MOPS 电泳缓冲液至覆盖胶面几个毫米。

### ②准备 RNA 样品

取 3 $\mu\text{g}$ RNA, 加 3 倍体积的甲醛上样染液, 加 EB 于甲醛上样染液中至终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。

加热至  $70^{\circ}\text{C}$  孵育 15 分钟使样品变性。

### ③电泳

上样前凝胶须预电泳 5min, 随后将样品加入上样孔。5–6V/cm 电压下 2h, 电泳至溴酚兰

指示剂进胶至少 2-3cm。

#### ④紫外透射光下观察并拍照

28S 和 18S 核糖体 RNA 的带非常亮而浓（其大小决定于用于抽提 RNA 的物种类型），上面一条带的密度大约是下面一条带的 2 倍。还有可能观察到一个更小稍微扩散的带，它由低分子量的 RNA（tRNA 和 5S 核糖体 RNA）组成。在 18S 和 28S 核糖体带之间可以看到一片弥散的 EB 染色物质，可能是由 mRNA 和其它异型 RNA 组成。RNA 制备过程中如果出现 DNA 污染，将会在 28S 核糖体 RNA 带的上面出现，即更高分子量的弥散迁移物质或者带，RNA 的降解表现为核糖体 RNA 带的弥散。用数码照相机拍下电泳结果。

### 3 样品 cDNA 合成

#### ①反应体系

序号 反应物 剂量

1 逆转录 buffer 2 $\mu$ l

2 上游引物 0.2 $\mu$ l

3 下游引物 0.2 $\mu$ l

4 dNTP 0.1 $\mu$ l

5 逆转录酶 MMLV 0.5 $\mu$ l

6 DEPC 水 5 $\mu$ l

7 RNA 模版 2 $\mu$ l

8 总体积 10 $\mu$ l

轻弹管底将溶液混合，6000rpm 短暂离心。

②混合液在加入逆转录酶 MMLV 之前先 70℃干浴 3 分钟，取出后立即冰水浴至管内外温

度一致，然后加逆转录酶 0.5μl，37℃水浴 60 分钟。

③取出后立即 95℃干浴 3 分钟，得到逆转录终溶液即为 cDNA 溶液，保存于-80℃待用。

#### 4 梯度稀释的标准品及待测样品的管家基因 (β-actin) 实时定量 PCR

①β-actin 阳性模板的标准梯度制备 阳性模板的浓度为 10<sup>11</sup>，反应前取 3μl 按 10 倍稀释 (加水 27μl 并充分混匀) 为 10<sup>10</sup>，依次稀释至 10<sup>9</sup>、10<sup>8</sup>、10<sup>7</sup>、10<sup>6</sup>、10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>，以备用。

②反应体系如下：

标准品反应体系

序号 反应物 剂量

1 SYBR Green 1 染料 10μl

2 阳性模板上游引物 F 0.5μl

3 阳性模板下游引物 R 0.5μl

4 dNTP 0.5μl

5 Taq 酶 1μl

6 阳性模板 DNA 5μl

7 ddH<sub>2</sub>O 32.5μl

8 总体积 50μl

轻弹管底将溶液混合，6000rpm 短暂离心。

管家基因反应体系：

序号 反应物 剂量

1 SYBR Green 1 染料 10μl

2 内参照上游引物 F 0.5μl

3 内参照下游引物 R 0.5μl

4 dNTP 0.5μl

5 Taq 酶 1μl

6 待测样品 cDNA 5μl

7 ddH<sub>2</sub>O 32.5μl

8 总体积 50μl

轻弹管底将溶液混合，6000rpm 短暂离心。

③制备好的阳性标准品和检测样本同时上机，反应条件为：93℃ 2 分钟，然后 93℃ 1 分钟，55℃ 2 分钟，共 40 个循环。

## **5 制备用于绘制梯度稀释标准曲线的 DNA 模板**

①针对每一需要测量的基因，选择一确定表达该基因的 cDNA 模板进行 PCR 反应。

反应体系：

序号 反应物 剂量

1 10× PCR 缓冲液 2.5 ul

2 MgCl<sub>2</sub> 溶液 1.5 ul

3 上游引物 F 0.5 ul

4 下游引物 R 0.5 ul

5 dNTP 混合液 3 ul

6 Taq 聚合酶 1 ul

7 cDNA 1 ul

8 加水至总体积为 25ul

轻弹管底将溶液混合，6000rpm 短暂离心。

35 个 PCR 循环（94℃1 分钟；55℃1 分钟；72℃1 分钟）； 72℃ 延伸 5 分钟。

②PCR 产物与 DNA Ladder 在 2%琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 检测 PCR 产物是否为单一特异性扩增条带。

③将 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释: 将 PCR 产物进行 10 倍梯度稀释: 设定 PCR 产物浓度为  $1 \times 10^{10}$ , 依次稀释至  $10^9$ 、 $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$  几个浓度梯度。

## 6 待测样品的待测基因实时定量 PCR

①所有 cDNA 样品分别配置实时定量 PCR 反应体系。

体系配置如下:

序号 反应物 剂量

1 SYBR Green 1 染料 10 ul

2 上游引物 1ul

3 下游引物 1ul

4 dNTP 1ul

5 Taq 聚合酶 2ul

6 待测样品 cDNA 5ul

7 ddH<sub>2</sub>O 30ul

8 总体积 50 ul

轻弹管底将溶液混合, 6000rpm 短暂离心。

②将配制好的 PCR 反应溶液置于 Realtime PCR 仪上进行 PCR 扩增反应。反应条件为: 93°C 2 分钟预变性, 然后按 93°C 1 分钟, 55°C 1 分钟, 72°C 1 分钟, 共 40 做个循环, 最后 72°C 7 分钟延伸。

## 7 实时定量 PCR 使用引物列表

引物设计软件: Primer Premier 5.0, 并遵循以下原则: 引物与模板的序列紧密互补; 引物

与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构;引物不在模板的非目的位点引发 DNA 聚合反应(即错配)。

## **8 电泳**

各样品的目的基因和管家基因分别进行 Realtime PCR 反应。PCR 产物与 DNA Ladder 在 2%琼脂糖凝胶电泳, GoldView™染色, 检测 PCR 产物是否为单一特异性扩增条带。