

qPCR 实验报告

一、实验材料

试剂名称	试剂厂家	试剂货号
总 RNA 提取试剂盒	康为世纪	CW0597S
逆转录试剂盒	合肥知恩生物	ZNMA-001
SYBR Green PCR 试剂盒	合肥知恩生物	ZNMA-002

二、实验仪器

仪器名称	仪器厂家	仪器型号
Real-time PCR 检测仪	罗氏	LC96
微量核酸测定仪	杭州奥盛	Nano-100
超低温冰箱	Thermo	905- μ ITS (490L)
台式离心机	Thermo	Pico17
组织研磨器	上海净信	JXSTPR-24

三、实验方法

1、RNA 提取（参考试剂盒说明书）

- 细胞：离心收集细胞。每 5×10^6 细胞加入 1 mL TRIzon Reagent。组织：30-50 mg 组织在液氮中充分研磨后加入 1 mL TRIzon Reagent，或在组织样品中加入 1 mL TRIzon Reagent 后匀浆处理。
- 样品中加入 TRIzon Reagent 后反复吹打几次，使样本充分裂解。室温放置 5 分钟，使蛋白核酸复合物完全分离
- 每 1 mL TRIzon Reagent 加入 200 μ L TRIzon Pal™，盖好管盖，剧烈振荡 15 秒，室温放置 2 分钟。
- 4°C 12000 rpm (13400 \times g) 离心 10 分钟，此时样品分为三层：红色有机相，中间层和上层无色水相，RNA 主要在上层水相中，将上层水相移到一个新的 RNaseFree 离心管中。
- 在得到的水相溶液中加入等体积的 70% 乙醇（无 RNase 水配制），颠倒混匀。
- 将上步所得溶液全部加入到已装入收集管的吸附柱（Spin Columns RM）中。若一次不能加完溶液，可分多次转入。12000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 向吸附柱中加入 350 μ L Buffer RW1，12000 rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 配制 DNase I 混合液：取 52 μ L RNase-Free Water，向其中加入 8 μ L 10 \times Reaction Buffer 和 20 μ L DNase I (1 U/ μ L)，混匀配制成终体积为 80 μ L 的反应液。
- 向吸附柱中直接加入 80 μ L DNase I 混合液，20~30°C 孵育 15 分钟，离心。
- 向吸附柱中加入 350 μ L Buffer RW1，12000 rpm 离心 1 分钟，弃废液，将吸附柱重新放回收集管中。
- 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer RW2（使用前检查是否已加入无水乙醇），12000 rpm 离

心 20 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放回收集管中。

(12) 重复上面步骤。

(13) 12000 rpm 离心 2 分钟，倒掉收集管中废液。将吸附柱置于室温数分钟，彻底晾干。

注意：这一步的目的是将吸附柱中残余的乙醇去除，乙醇的残留会影响后续的酶促反应。

(14) 将吸附柱置于一个新的无 RNase 离心管中，向吸附柱的中间部位加入 30~50 μ L RNase-Free Water，室温放置 1 分钟，12000 rpm 离心 1 分钟，收集 RNA 溶液，-80 $^{\circ}$ C 保存 RNA，防止降解。

2、cDNA 合成

采用全式金公司 cDNA 合成试剂盒合成 cDNA，反转录体系和条件见表 1（mRNA）和表 2（miRNA，颈环法）。

表 1 逆转录反应（mRNA）

组份	体积
RNA	7 μ l
Random Primer	1 μ l
2 \times ES Reaction Mix	10 μ l
<i>EasyScript</i> [®] RT/RI Enzyme Mix	1 μ l
gDNA Remover	1 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min	
85 $^{\circ}$ C 加热 5s 灭活, -20 $^{\circ}$ C 保存	

表 2 逆转录反应（miRNA，颈环法）

组份	体积
RNA	6.5 μ l
颈环-RT 引物	0.5 μ l
Random Primer	1 μ l
2 \times ES Reaction Mix	10 μ l
<i>EasyScript</i> [®] RT/RI Enzyme Mix	1 μ l
gDNA Remover	1 μ l
25 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min	
85 $^{\circ}$ C 加热 5s 灭活, -20 $^{\circ}$ C 保存	

3、Real-time PCR 扩增

(1) 引物合成

qPCR 引物由上海生工设计合成，引物序列见表 3。

表 3 引物序列

Primer	Sequence (5'-3')
--------	------------------

(2) Real time-PCR 反应体系

根据 Real time-PCR 反应体系配制反应液。在 PCR 反应管中分别加入 ddH₂O、SybrGreen qPCR Master Mix、Forward primer、Reverse primer、cDNA 模板，充分混匀。反应体系按照表 4 配制。

表 4 qPCR 扩增体系

组份	体积
qPCR Mix	10 μ l
Forward Primer (10 μ M)	0.5 μ l
Reverse Primer (10 μ M)	0.5 μ l
cDNA	2 μ l
Water, nuclease-free	7 μ l
Total volume	20 μ l

(3) PCR 反应程序

PCR 反应程序按表 5 设置。

表 5 qPCR 反应程序

Step	Temperature, °C	Time	Number of cycles
预变性	94	30s	1
变性	94	5 s	40
退火	61	35 s	
	95	10 s	
熔解曲线	65	60s	1
	97	1s	

4、Real-Time PCR 数据处理

PCR 扩增后，实时荧光定量 PCR 仪自动分析结果，根据阴性对照调整阈值和基线以确定各个标本的 Ct 值，并根据熔解曲线确定该 Ct 值是否有效。将结果导出，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析目的基因在对照组和各测定组之间的表达差异，计算公式如下： $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$ ，再求得对照组 ΔCt 的平均值，记为 $\Delta Ct_{\text{对照平均}}$ ，用各组的 ΔCt 分别减去 $\Delta Ct_{\text{对照平均}}$ ，求得 $\Delta\Delta Ct$ 值，即 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{样本}} - \Delta Ct_{\text{对照平均}}$ ，再计算各组 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值，即为各组中基因的相对表达量。