



齐齐哈尔医学院附属第三医院

The Third Affiliated Hospital Of Qiqihar Medical University

齐齐哈尔市肿瘤医院

Qiqihar Cancer Hospital

# qPCR实验操作流程

中心实验室

池涛

# 第一部分 细胞总RNA的提取及定量

# 关键点

所有RNA的提取过程中都有五个关键点：

1. 样品细胞或组织的有效破碎；
2. 有效地使核蛋白复合体变性；
3. 对内源RNA酶的有效抑制；
4. 有效地将RNA从DNA和蛋白混合物中分离；
5. 对于多糖含量高的样品还牵涉到多糖杂质的有效除去。

# 防止RNA酶污染的措施

1. 所有的玻璃器皿均应在使用前于180°C的高温下干烤6h或更长时间。
2. 塑料器皿可用0.1%DEPC水浸泡12h以上，高压灭菌。
3. 有机玻璃的电泳槽等，可先用去污剂洗涤，双蒸水冲洗，乙醇干燥，再浸泡在3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>室温10min，然后用0.1%DEPC水冲洗，晾干。
4. 配制的溶液应尽可能用0.1% DEPC在37°C处理12h以上。然后用高压灭菌除去残留的DEPC。不能高压灭菌的试剂，应当用DEPC处理过的无菌双蒸水配制，然后经滤膜过滤除菌。
5. 操作人员戴一次性口罩、帽子、手套，实验过程中手套要勤换。
6. 设置RNA操作专用实验室，所有器械等应为专用。

# 操作步骤

## 样品处理

- 提取组织RNA时，每50~100mg组织用1ml Trizol试剂对组织进行裂解；
- 悬浮细胞先离心沉淀，每 $5-10 \times 10^6$ 个细胞加1ml Trizol后，反复用枪吹打或剧烈振荡以裂解细胞。
- 培养贴壁细胞不须消化，可直接用Trizol进行消化、裂解，Trizol体积按 $10\text{cm}^2/\text{ml}$ 比例加入。

(注意：匀浆一定要彻底，是提取高质量RNA的前提；细胞数量与Trizol的比例，细胞的数量不能过多。)

# 操作步骤

1. 细胞或组织加Trizol (RNAisoPlus) 后剧烈振荡15s, 室温放置5min, 使其充分裂解。

(注意: 此时可放入 $-80^{\circ}\text{C}$ 长期保持)

2. 按0.2ml 氯仿/1ml Trizol加入氯仿, 剧烈振荡混匀后室温放置5min。

(注意: 此步振荡非常重要, 建议在旋涡振荡器上进行。)

3.  $4^{\circ}\text{C}$  12,000g离心15min。样品分为三层: 底层为黄色(红或绿)有机相, 上层为无色水相和一个中间层。RNA主要在水相中, 水相体积约为所用Trizol试剂的60%。

4. 吸取上层水相, 至另一离心管中。一般400-450 $\mu\text{l}$  就足够了, 宁少勿多!

(注: 千万不要吸取中间界面)

# 操作步骤

5. 加入等体积异丙醇混匀，4°C放置5-10min。
6. 4°C 12,000g离心10min，弃上清，离心后在管侧和管底出现胶状沉淀。
7. 按1ml 75%乙醇/ml Trizol加入75%乙醇洗涤RNA沉淀，（切勿触及沉淀！）温和振荡离心管，悬浮沉淀。
8. 4°C 12,000g离心5min，尽量弃上清。
9. 室温晾干或真空干燥RNA沉淀5-10min。（注：RNA样品不要过于干燥，否则很难溶解。）
10. 加入10μl无RNase的水，充分震荡混匀。

# 紫外吸收检测RNA的浓度

- RNA在260nm波长处有最大的吸收峰。因此，可以用260nm波长分光测定RNA浓度，OD值为1相当于大约  $40 \mu\text{g/ml}$  的单链RNA。用双蒸水稀释RNA样品（ $1 \mu\text{l RNA} + 49 \mu\text{l 水}$ ）倍并以双蒸水为空白对照，根据此时读出的OD<sub>260</sub> 值即可计算出样品稀释前的浓度：

$$\text{RNA (mg/ml)} = 40 \times \text{OD}_{260} \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}(n) / 1000$$

dsDNA(双链DNA)	$1\text{OD}_{260} = 50\text{ug/ml}$
ssDNA(单链DNA)	$1\text{OD}_{260} = 33\text{ug/ml}$
RNA	$1\text{OD}_{260} = 40\text{ug/ml}$

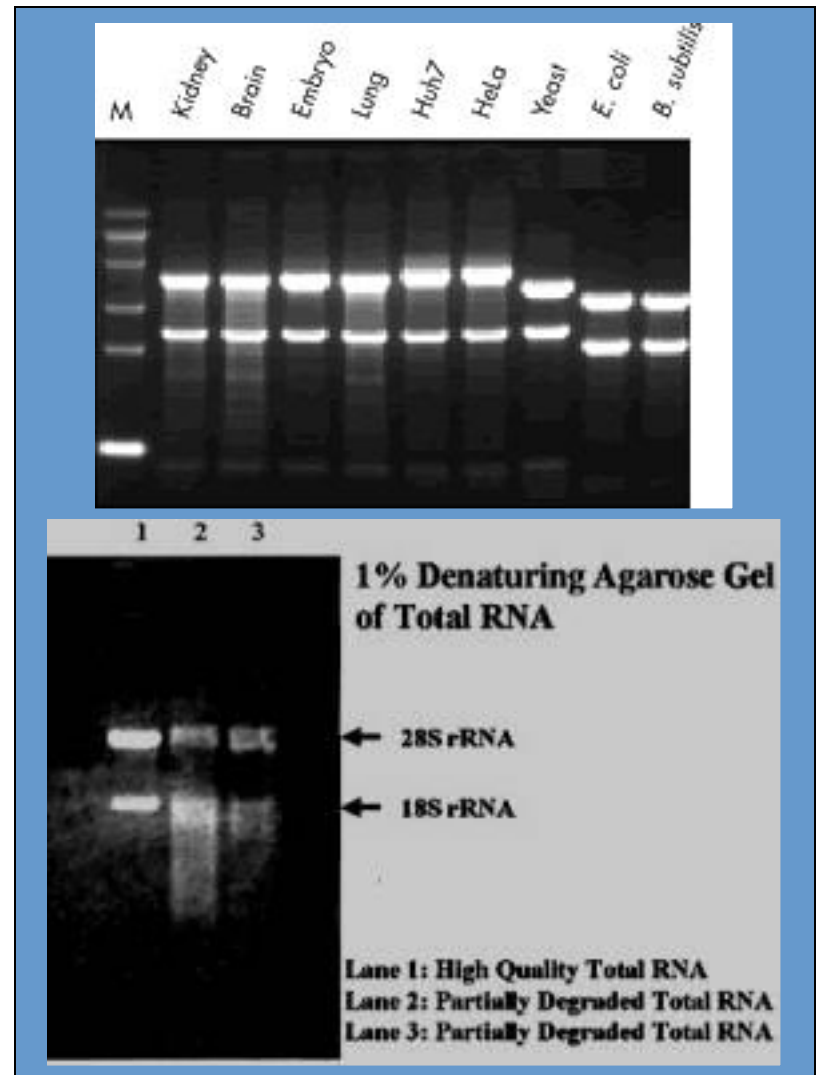


# 紫外吸收检测RNA的纯度

- RNA纯品： $OD_{260} / OD_{280} \approx 2.0 (1.8 \sim 2.0)$ ， $OD_{260} / OD_{230} > 2.0$
- 若 $OD_{260} / OD_{280}$ 小于1.8，说明样品中还可能含有蛋白质或酚，应再用酚/氯仿抽提，以乙醇沉淀纯化RNA。
- 若 $OD_{260} / OD_{280}$ 大于2.0，则提示可能有异硫氰酸残存或RNA降解。
- $OD_{260} / OD_{230}$ 比值小于2.0时表明有小分子及盐存在。

# RNA完整性检测

- 完整的RNA电泳可明显地观察到28S和18S两条带，并且28S大约是18S的两倍宽。
- 若两条带不明显，则说明RNA部分降解，可能的原因是污染了RNase。



# 第二部分 逆转录-聚合酶链反应

# 仪器和主要试剂

1. 基因扩增仪、微量加样枪、灭菌超薄PCR反应管
2. 总RNA
3. 第一链cDNA合成试剂盒（含有逆转录酶、RNA酶抑制剂、缓冲液）
4. dNTP mix: 含dATP、dCTP、dGTP、dTTP各2 mmol/L

# 操作步骤

采用TaKaRa PrimeScript RT reagent kit进行cDNA第一链合成:

按下列组分配制RT反应液

1. 5X PrimeScrip Buffer	2.0 $\mu$ l
2. PrimeScript RT Enzyme Mix	0.5 $\mu$ l
3. Oligo dT Primer (50 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
4. Random 6mers (100 $\mu$ M)	0.5 $\mu$ l
Total RNA	6.5 $\mu$ l
<hr/>	
总体积	10 $\mu$ l

反转录反应条件如下

37°C	15min	(反转录反应)
85°C	5sec	(反转录酶失活反应)

注: 反转录步骤在PCR仪中进行

# qPCR反应体系

取8连管，用微量加样枪按下述顺序分别加入各试剂(注意每换一种试剂换一个吸头)：

第一链cDNA	2 $\mu$ l
GreenPCR master mix	10 $\mu$ l
上游引物 (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l
下游引物 (10 $\mu$ M)	0.8 $\mu$ l
RNase Free H2O	6.4 $\mu$ l
总体积	20 $\mu$ l

如配好的反应液较多沾到管壁上，可将反应管置台式离心机中瞬时离心，使反应液集中于管底，然后将反应管放到基因扩增仪上。

# qPCR参数设置

- ① 95°C预变性5分钟后开始以下循环
- ② 

95°C	5秒	} 40 循环
60°C	10 秒	
72°C	15 秒	
- ③ 72°C 5 分钟
- ④ 4 °C 保温

实验过程约2小时



# 数据统计

1、用内参基因的CT值归一目标基因的CT值：

$$\Delta CT (\text{test}) = CT (\text{target, test}) - CT (\text{ref, test})$$

$$\Delta CT (\text{calibrator}) = CT (\text{target, calibrator}) - CT (\text{ref, calibrator})$$

2、用校准样本的 $\Delta CT$ 值归一试验样本的 $\Delta CT$ 值：

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{test}) - \Delta CT (\text{calibrator})$$

3、计算表达水平比率：

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{表达量的比值}$$



**谢谢**