

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

qPCR 实验步骤

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
医用离心机	湖南凯达科学仪器有限公司	TGL-18M
荧光定量 PCR 仪	ABI	Stepone plus
超净工作台	上海力辰邦西仪器科技有限公司	SW-CJ-1D
电泳仪	北京六一仪器厂	DYY-7C
离心管	Axygen	MCT-150-L-C
TIP 头	Axygen	
PCR 仪	Applied Biosystems	2720 Thermal Cycler
紫外仪	北京六一仪器厂	WD-9403F
优普系列超纯水机	四川优普超纯科技有限公司	UPH-III-20T
冷冻研磨仪	上海净信	JXFSTPRP-CLN
酶标仪	BioTek	SYNERGY LX multi-mode reader

2、主要试剂及货号

名称	厂家	货号
AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix	南京诺唯赞生物科技有限公司	Q511-02
HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)	南京诺唯赞生物科技有限公司	R212-02
琼脂糖	擎科生物	TSJ001
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	10009218
Gold view	北京艾德莱生物科技有限公司	EP0601
Trans2K®Plus II DNA	北京全式金生物技术股份有限	BM121-01

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

名称	厂家	货号
Marker	公司	
三氯甲烷	国药集团化学试剂有限公司	10006818
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	80109218
TRIpure Reagent	北京艾德莱生物科技有限公司	RN0102
DEPC	上海生工	B600154-0025

二、实验步骤

1、总 RNA 抽提: 样本前处理

1.1. 组织: 取匀浆管, 加入 1ml 的 TRIpure Reagent, 置冰上预冷。取约 20 mg 组织, 加入到匀浆管中。匀浆仪充分研磨直至无可见组织块。

1.2. 贴壁细胞: 将培养瓶/板中培养液尽弃, 加入 1ml 4℃ 预冷的 PBS 溶液, 轻摇洗涤。除去 PBS, 加入 1ml 的 TRIpure Reagent, 轻缓振荡或用枪头吹打, 破碎细胞。

1.3. 悬浮细胞: 3000 rpm, 离心 10 分钟, 收集细胞沉淀, 加入 1ml 4℃ 预冷的 PBS 溶液重悬细胞, 3000 rpm, 离心 10 分钟, 收集细胞沉淀, 加入 1ml 的 TRIpure Reagent, 轻缓振荡或用枪头吹打, 破碎细胞。

2. 相分离: 加入 200 μ l 三氯甲烷, 颠倒充分混匀, 静置 3min, 4℃ 下 12000rpm 离心 10min, 将 400 μ l 上清转移到一新的离心管中。TBST 清洗切片, 浸洗 3 次, 每次 5 分钟。

3、洗涤 RNA: 吸除液体, 加入 1ml 75% 乙醇洗涤沉淀。4℃ 下 12000rpm 离心 5min, 将液体吸除干净。

4、溶解 RNA: 将离心管置于超净台上吹 3min, 加入 30 μ l DEPC 水溶解 RNA, 55℃ 孵育 5min。

5、RNA 质量检测: 用酶标仪检测 RNA 浓度及纯度, 电泳检测 RNA 的完整性。

6、反转录

6.1、基因组 DNA 去除

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

Component	Volume
4 × gDNA wiper Mix	4 μL
Oligo (dT)23VN (50 μM)	1 μL
Random hexamers (50 ng/μl)	1 μL
Total RNA	10 pg-1 μg
RNase free water	Add to 16 μL

用移液器轻轻吹打混匀。42℃ 2 min。

7、配制第一链 cDNA 合成反应液。

Component	Volume
上一步的混合液	16 μL
10 × RT Mix	2 μL
HiScript II Enzyme Mix	2 μL

8、逆转录程序设置

Temperature	Time
50℃	15min
85℃	2min

9、荧光定量 PCR 实验步骤

9.1 引物的配制

9.1.1 将引物瞬时离心；

9.1.2 按照说明书加入去离子水，加盖混匀，配成 100uM/L 的贮存液；

9.1.3 另取一 EP 管，将上、下游引物稀释为 10.0uM/L 终浓度的工作液。

10、cDNA 的配置：将 cDNA 从冰箱中取出，加入适量的去离子水，稀释至合适的浓度。

11、反应体系：取 0.2ml PCR 管，配制如下反应体系，每个反转录产物配制 3 管。

湖北百奥斯 (Biossci) 生物科技有限公司
武汉长衍病理科技有限公司

Component	Volume
AceQ Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μ l
上游引物	0.4 μ L
下游引物	0.4 μ L
ddH ₂ O	6.7 μ l
DNA (适度稀释)	2.5 μ l
总体系	20 μ l

12、荧光定量 PCR 实验步骤

95°C 5min

(95°C 10s ; 60°C 30s) 40 次

熔解曲线 60°C→95°C, 每 15s 升温 0.3°C

三、结果处理

$\Delta\Delta CT$ 法:

A=CT(目的基因, 待测样本)- CT(内标基因, 待测样本)

B=CT(目的基因, 对照样本)- CT(内标基因, 对照样本)

K=A-B

表达倍数=2-K