

实时荧光定量 PCR操作步骤

以下实验步骤仅供参考：

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 DEPC₂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 μl 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。

2RNA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 μg RNA/ml 样品 RNA 浓度 (μg/ml) 计算公式为: $A_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 \mu\text{g/ml}$ 。具体计算如下:

RNA 溶于 40 μl DEPC 水中, 取 5 μl, 1:100 稀释至 495 μl 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 μl 用来测量以后, 剩余样品 RNA 为 35 μl, 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℃, 10ml 的 10×MOPS 电泳缓冲液和 18ml 的 37% 甲醛溶液 (12.3M)。

10×MOPS 电泳缓冲液

浓度??成分

0.4M??MOPS pH7.0

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 μ 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×MOPS 电泳缓冲液至覆盖胶面几个毫米。

②准备 RNA 样品

取 3 μ 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 μ g/ml。加热至 70℃ 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 μ l

2??上游引物??0.2 μ l

3??下游引物??0.2 μ l

4??dNTP??0.1 μ l

5??逆转录酶 MMLV??0.5 μ l

6??DEPC水??5 μ l

7??RNA模版??2 μ l

8??总体积??10 μ 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 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 0.5 μ l，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

① β -actin 阳性模板的标准梯度制备阳性模板的浓度为 10^{11} ，反应前取 3 μ l 按 10 倍稀释（加水 27 μ l 并充分混匀）为 10^{10} ，依次稀释至 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 ，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??SYBRGreen染料??10 μ l

2??阳性模板上游引物 F??0.5 μ l

3??阳性模板下游引物 R??0.5 μ l

4??dNTP??0.5 μ l

5??Taq 酶??1 μ l

6??阳性模板 DNA??5 μ l

7??ddH₂O??32.5 μ l

8??总体积??50 μ l

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??SYBRGreen染料??10 μ l

2??内参照上游引物 F??0.5 μ l

3??内参照下游引物 R??0.5 μ l

4??dNTP??0.5 μ l

5??Taq 酶??1 μ l

6??待测样品 cDNA??5 μ l

7??ddH₂O??32.5 μ l

8??总体积??50 μ l

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??2.5ul

2??MgCl₂溶液??1.5ul

3??上游引物 F??0.5ul

4??下游引物 R??0.5ul

5??dNTP混合液??3ul

6??Taq 聚合酶??1ul

7??cDNA?1ul

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 DNALadder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 1×10^{10} ，依次稀释至 10^9 、 10^8 、 10^7 、 10^6 、

10⁵、10⁴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??SYBRGreen 染料??10ul

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??ddH₂O??30ul

8??总体积??50ul

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 RealtimePCR 仪上进行 PCR 扩增反应。反应条件为：93℃ 2 分钟预变性，然后按 93℃ 1 分钟，55℃ 1 分钟，72℃ 1 分钟，共 40 做个循环，最后 72℃ 7 分钟延伸。

7 实时定量 PCR 使用引物列表

引物设计软件：PrimerPremier5.0 ，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 RealtimePCR 反应。PCR 产物与 DNALadder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。

实时荧光定量 PCR

组织RNA提取：

一般认为100mg肝组织提取RNA500ng 100mg肺提取RNA200ng 脑内的RNA丰度适中，100mg脑组织，提取RNA5-200ng 所以一个10mg的海马可匀出RNA约为20ng。

反转录反应

反转录反应参照TaKaRaRT-PCR说明书。

反转录反应条件如下。

37° C15min（反转录反应）

85° C5sec（反转录酶的失活反应）

RealTimePCR反应

选用脑源神经营养因子（BDNF 为目标基因，核糖体18SrRNA(18SrRNA做为内参。

基因		引物序列	扩增片段长度
NR2B	NR2B(+)	CCGCAGCACTATTGAGAACA	213bp
	NR2B(-)	ATCCATGTGTAGCCGTAGCC	
18srRNA	18srRNA(+)	TTTGTTGGTTTTCGGAACTGA	198bp
	18srRNA(-)	CGTTTATGGTCGGAACTACGA	

1) 按下列组份配制PCR反应液（反应液配制请在冰上进行）。

试剂	使用量	终浓度
SYBRPremixExTaq™（2×）	12.5 μl	1×
PCRForwardPrimer（10 μM）	1 μl	0.4 μM
PCRReversePrimer（10 μM）	1 μl	0.4 μM

模板（cDNA溶液）	0.5 μl
dH2O	10 μl
Total	25 μl

全班40人,分为5组,每组做8管。4管做BDNF,4管做18SrRNA。4管BDNF或者18SrRNA采用相应的正反PCR引物。每种基因做两个模板，一个模板采用原液浓度，一个模板采用稀释一倍浓度，体积均为0.5 μl。

2) 三步法PCR

首先95° C作用3min。

PCR进行 35 个循环。

步骤	温度	时间
变性	95° C	30 秒
退火	58° C	30 秒
延伸	72° C	30 秒

融解曲线

温度	时间	变温速度
95° C	0 秒	20° C/秒
55° C	15 秒	20° C/秒
95° C	0 秒	0.1° C/秒

PCR疑难解答

当 PCR结果不甚满意时，首先检查以下几方面并遵照执行：？

- 1 将 PCR反应的试管与反应板紧贴。？
- 2 当酶反应混合物以 70℃ “热启动” 开始循环时，切记在加入酶后稍 3 微振荡一下，因为在 0.2-ml 的 PCR管中不能均匀传热。？
- 4 不要随意减少 dNTP的用量，它是一个系统的因素，必须与其

5 对于有问题的 PCR反应，例如模板的量少，模板不纯和环状模板等，先尝试加 Taq 酶前的体系进行预变性，后加模板进行正常 PCR扩增。？

没有扩增产物：？

1 在提供 MgCl₂缓冲液中，以 0.25mmol/L 为梯度增加 MgCl₂浓度；无 MgCl₂的缓冲液以 0.5mmol/L 为梯度增加 MgCl₂浓度。？

2 泳道中出现模糊条带，如果 DNA模板中存在 RNA 则按上述提示浓度补加 MgCl₂ 因为在 PCR反应中可能缺少游离的 Mg²⁺ ？

3 检查退火温度和变性条件，如果有需要的话，可降低退火温度。？

4 检查模板和引物的用量。？

5 增加循环次数和/或模板 DNA的用量。？

泳道中出现模糊条带：？

1 减少循环次数或模板 DNA的用量。？

2 提高退火温度，但不要超过 68℃。？

3 重新设计引物或设计更长的引物。？

其他值得注意的条件：？

1 建议使用 0.2-ml 薄壁管。厚壁管在 92℃时不能有效地使模板变性。？

2 最佳反应体积为 50μl，推荐用 30μl 矿物油覆盖（对盖子加热的 PCR仪可以不加）。？

3 大多数反应中，0.75μl（0.5~1μl）的酶量在大多数情况下可

4 建议使用 1.75mmol/LMgCl₂ : 350mmol/LdNTP 或 2.25mmol/LMgCl₂: 500mmol/LdNTP组合的混合物。然而要得到最佳结果，优化 Mg²⁺的浓度是必需的。？

5 基因组 DNA模板的质量显著影响 PCR反应。因此推荐使用琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA的长度。DNA片段长度可以超过 50kb，传统的基因组 DNA能扩增片段至 10kb。？

6 要扩增更长的片段应使用超纯或高分子量的 DNA 请查阅高分子量 DNA提取操作过程相关文献。？

7 降低二级结构和引物二聚物形成的可能性。进行长片段 PCR扩增时，引物长度一般为 24~34 个核苷酸，溶点在 60~68℃ 间。使用这类引物可提高 PCR反应的退火温度来增加反应的特异性。这点非常重要，长片段扩增的效果往往受到非特异性短片段优先扩增的影响。？

8 变性：第一步变性在 94℃ 下进行 2 分钟。在循环过程中尽可能缩短变性时间（94℃ 下进行 20--30 秒），除非模板中富含 GC 则 95℃ 下变性 30 秒。这可以防止 DNA脱嘌呤和链断裂，对于所需扩增的基因组 DNA片段终长度超过 12kb 时，应该尽可能的降低变性温度。？

9 延伸：68--72℃ 下进行延伸操作。？

10 循环延伸：尽量采用循环延伸的条件，若 PCR仪无此功能，则必须增加延伸的时间，例如在扩增 10kb 片断时，延伸时间用

8 分钟。？

11 长片断 PCR系统扩增的片断其 3' -末端带有一个突出的 A, 因此建议采用 T/A 克隆。若要进行平端可隆, 可用 Klenow 酶和 T4DNA多聚酶将 PCR产物补平后再进行。？

12 测序时因酶的混合物带有 3' →5' 外切酶活性, 用 Sanger 方法进行测序不能产生均一的 (染色体) 带型。 ？

13 在无菌的 0.5ml 或 0.2ml 离心管中按下列操作程序加样:

14 反应物加样顺序体积 (μl) 终浓度

去离子水 129.4

10×BufferB251 ×

10×PCRBuffer 成分:

Tris-HClpH8.5100mM

KCl500mM

MgCl15mM

4×dNTP混合物 35 各 200 μmol/L?

MgCl₂431.5mmol/L

有义引物 52.60.25 μmol/L

反义引物 62.60.25 μmol/L

模板 720.1 μg

80.41unit

2. ??用微量可调加样器和一次性 Tip 向每一管中加 50 μ l 矿物油。每加一管换一次 Tip。

3. ??振荡每只管，然后短暂离心。

4. ??将管放到预热的热循环中，按下列程序开始循环：

预变性 94℃4 分钟 1 次

变性 94℃1 分钟

退火 37-65℃1 分钟

延伸 72℃1 分钟

循环 30 次

终延伸 72℃7 分钟 1 次

保存 4℃?

讨论

1. 假阴性，不出现扩增条带

PCR反应的关键环节有①模板核酸的制备，②引物的质量与特异性，③酶的质量，④PCR循环条件。寻找原因亦应针对上述环节进行分析研究。

模板：①模板中含有 Taq 酶抑制剂，②在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚。③模板核酸变性不彻底。在酶和引物质量好

用阳性对照的 模板配合检查模板质量。

酶失活：需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。

引物：引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，对策为：①选定一个好的引物合成单位。②引物的浓度不仅要看 OD值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏，导致引物变质降解失效。④引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

Mg²⁺浓度：Mg²⁺离子浓度对 PCR扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR扩增产量甚至使 PCR扩增失败而不出扩增条带。

反应体积的改变：通常进行 PCR扩增采用的体积为 20ul、30ul、50ul、或 100ul，应用多大体积进行 PCR扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如 20ul 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

PCR扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过低，可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率，退火温度过高影响引物与模板的结合而降低PCR扩增效率。有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是PCR失败的原因之一。

靶序列变异：如靶序列发生突变或缺失，影响引物与模板特异性结合，或因靶序列某段缺失使引物与模板失去互补序列，其PCR扩增是不会成功的。

2. 假阳性

出现的PCR扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高。

引物设计不合适：选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行PCR扩增时，扩增出的PCR产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。需重新设计引物。

靶序列或扩增产物的交叉污染：这种污染有两种原因：一是整个基因组或大片段的交叉污染，导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决：①操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。②除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。③必要时，在加标本前，反应管和试剂用紫外线照射，以破坏存在的

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/085033204342011321>