

qPCR实验SOP

1. 主要使用仪器

仪器名称	型号/厂家
BioRad荧光实时定量PCR仪	BIO-RAD CFX Connect
高速冷冻离心机	Neofuge 15R
细胞培养箱	Heal Force
微孔板离心机	MINIP-2500
旋涡混合器	AL-902
掌上离心机	D1008大龙Dragon

2. 主要使用试剂

试剂	品牌/公司	货号
Takara minibest universal RNA extraction kit	Takara	9767
light cycler 480 SYBR Green I Master	Roche	04 887 352 001
Primescript RT reagent kit with gDNA Eraser(perfect Real time)	Takara	AK3920
DEPC-Treated Water	AmBion	1506052
无水乙醇	国药	32061

3. 实验步骤

3.1 前期处理

细胞：吸去细胞原培养液，PBS洗一次，用胰酶消化细胞，1000rpm离心5min，PBS重悬细胞，1000rpm离心5min，去上清，细胞沉淀用于后续RNA提取；

动物组织：将新鲜的或超低温保存的动物组织样品迅速转移到装有液氮的研钵里，研磨组织样品，期间不断加入液氮，直至研磨成粉末状，将粉末转移到加了Buffer RL的1.5mlEP管中，涡旋混匀。将裂解液在12000rpm,4°C离心5min,吸取上清转移到一个新的EP管中。

植物组织：将新鲜的或超低温保存的植物组织样品迅速转移到装有液氮的研钵里，研磨组织样品，期间不断加入液氮，直至研磨成粉末状，将粉末转移到加了Buffer RL的1.5mlEP管中，涡旋混匀。将裂解液在12000rpm,4°C离心5min,吸取上清转移到一个新的EP管中。

3.2 RNA提取

采用TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (Cat.# 9767)进行RNA提取，具体操作如下：

- 1) 向沉淀中加入350μl 已加入50x DTT的Buffer RL；涡旋混匀。
- 2) 裂解液室温静置2min；
- 3) 将gDNA Eraser Spin Column安放到2ml的Collection Tube上；

- 4) 将裂解液转移到gDNA Eraser Spin Column中;
- 5) 12000rpm, 离心1min;
- 6) 保留滤液, 弃gDNA Eraser Spin Column;
- 7) 向步骤6中加入与滤液等体积的70%乙醇, 用枪混匀;
- 8) 将混合液全部转入RNA Spin Column中;
- 9) 12000rpm, 离心1min, 弃滤液;
- 10) 在RNA Spin Column中加入500ul Buffer RWA, 12000rpm, 离心30s-1min, 弃滤液;
- 11) 在RNA Spin Column中加入600ul Buffer RWB, 12000rpm, 离心30s-1min; 弃滤液。
- 12) 重复11;
- 13) 空转 2min;
- 14) 将RNA Spin Column安置于一个新的1.5ml的RNase Free Collection Tube, 打开盖子放置2min, 在膜中央加入30ul RNase Free DhH₂O, 室温静置5min;
- 15) 12000rpm, 离心2min洗脱RNA。
- 16) -80度保存。

3.3 去除基因组

gDNA Eraser	1ul	}	42°C 2min	→	4°C hold
5X gDNA Eraser buffer	2ul				
Total RNA	7ul				

取去除基因组后的RNA 1ul用紫外分光光度计测定OD₂₆₀、OD₂₈₀以及OD₂₆₀/OD₂₈₀值, 计算RNA的纯度和浓度。根据OD₂₆₀/OD₂₈₀比值, 估测RNA质量, 比值在1.8-2.0之间满足实验要求。

将总RNA放于-80°C冰箱内保存以备用。

3.4 逆转录

逆转录体系如下表:

成分	体积
primerscript enzyme mix	1ul
RT primer mix	1ul
5x primerscript buffer	4ul
RNA	X ug
Rnase free H ₂ O	Up to 20 ul

反应程序如下: 37°C 15min; 85°C 5s; 4°C hold。

3.5 qRT-PCR检测基因表达量

qRT-PCR反应体系如下:

成分	体积
primer F	1ul

primer R	1ul
2X mix	10ul
H ₂ O	7ul
cDNA	1ul
total volume	20ul

qRT-PCR反应程序如下:

40cycle {
95°C 10min
95°C 10s
60°C 15s
72°C 20s
65°C--95°C 0.5°C/5s

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

—— 武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台 ——