

实时荧光定量 PCR 实验报告

一、实验材料

1. 细胞株

非小细胞肺癌细胞

2. 主要试剂

DMEM/F12 培养基（美国 Hyclone, SH30023.01/100 ml）

胎牛血清（美国 Hyclone, SH30070.03）

青霉素/链霉素（美国 Hyclone, SV30010/100 ml）

0.25%胰酶（美国 Hyclone, SH30042.01/100 ml）

SYBR® Premix Ex Taq（日本 Takara, RR820A）

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser（日本 Takara, RR047A）

Trizol（日本 Takara, 9108）

氯仿（上海阿拉丁生化, C128130）

异丙醇（上海阿拉丁生化, I112011）

乙醇（上海阿拉丁生化, E111989）

DEPC（上海阿拉丁生化, D105557）

3. 主要实验仪器

超纯水仪（美国密理博公司, Milli-Q synthesis）

高压灭菌锅（西安仪创公司, BXM-30R）

超净工作台（苏净集团安泰公司, SW-CJ-1F）

CO₂ 培养箱（美国 ThermoFisher, 3131）

离心机（美国 Eppendorf, 5417R）

-80°C超低温冰箱（澳柯玛 AUCMA, DW-86L500）

荧光定量 PCR 仪（美国 Applied Biosystems, ABI-7500）

PCR 仪（美国 ThermoFisher, S1000）

分光光度计（美国 ThermoFisher, Nanodrop 2000）

4. 引物序列

| 基因名称 | | 引物序列 (5'-3') |
|---------------------|---|-------------------------|
| Gene A | F | ACTTGATCGTGGTGACTGACG |
| | R | TGGCGATGATGCTTAGACG |
| Gene B | F | CCAGATGCGTTATGCCAGAC |
| | R | CATTCCATTCCACGGGAACAC |
| β -actin (内参) | F | ACCACAGCTGAGAGGGAAATCG |
| | R | AGAGGTCTTTACGGATGTCAACG |

二、实验方法

1. 细胞中总 RNA 的提取

- (1) 细胞按照分组处理后，弃掉培养液，并用 1×PBS 清洗 1 次。
- (2) 加入 1 ml 的 Trizol 试剂，充分混匀，室温下静置 5 min。
- (3) 向每个离心管中加入 200 μ l 的氯仿，盖紧盖子，将离心管剧烈震荡 30 s 后于室温放置 5 min。
- (4) 4°C、12,000 g 离心 15 min，可见混合物分层为上下两相，RNA 溶于上层液相中，将上清液转移到新的 2 ml 离心管中。
- (5) 向离心管中加入等体积的异丙醇（-20°C 预冷），盖紧盖子，上下颠倒混匀几次后于室温放置 10 min。
- (6) 将离心管 4°C、12,000 g 离心 15 min，我们可以在离心管壁上发现白色沉淀即为 RNA。
- (7) 去除上清液，向离心管中加入 800 μ l 的 75%乙醇（用 0.1% DEPC 处理水配制），盖紧盖子，震荡 15 s 后于室温放置 5 min。
- (8) 将离心管 4°C、12,000 g 离心 15 min，去除上清液。
- (9) 重复上一步，向离心管中加入 800 μ l 的 75%乙醇（用 0.1%DEPC 处理水配制），盖紧盖子，震荡 15 s 后于室温放置 5 min。
- (10) 将离心管 4°C、12,000 g 转离心 15 min，将上清液移去。
- (11) 将离心管放于干净的超净工作台中风干 30 min，待离心管中无明显的水珠时，向离心管中加入 10~15 μ l 的 0.1% DEPC 处理水溶解 RNA。
- (12) 使用分光光度计检测 RNA 浓度和纯度，当 A260/A280 在 1.8~2.0 之间，RNA 质量较好。另外可以通过琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性，如果 RNA 的 28S，18S 条带清晰，则说明 RNA 完整性较好。
- (13) 质量较好的 RNA 可以直接用于下一步实验，或者置于-80°C长期保存。

2. 逆转录

逆转录实验步骤按照逆转录试剂盒说明书进行操作，具体逆转录体系如下：

(1) 去除基因组 DNA

| 试剂 | 体积 |
|---|-----------|
| 提取的总 RNA | 6 μ l |
| 基因组 DNA 污染清除试剂 (gDNA Eraser) | 1 μ l |
| 基因组 DNA 污染清除缓冲液 (5 \times gDNA Eraser buffer) | 2 μ l |
| DEPC 水 | 1 μ l |

注：按照以上方法在冰上进行反应液的配制，然后放置于室温，反应 10 min。

(2) 逆转录 PCR 反应

| 试剂 | 体积 |
|---|------------|
| 第一步反应液 | 10 μ l |
| 反应缓冲液 5 \times Primescript Buffer | 4 μ l |
| 反转录酶 5 \times Primescript RT Enzyme Mix | 1 μ l |
| 反转录随机引物 RT Primer Mix | 4 μ l |
| DEPC 水 | 1 μ l |

注：(1) 按照以上方法混合后，置于 PCR 仪中进行反转录，条件为 37 $^{\circ}$ C、15 min，85 $^{\circ}$ C、5 s。

上述去除基因组 DNA 和逆转录反应，是 TAKARA PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒中的试剂，根据试剂盒操作即可，就是将 RNA 同上述反应体系的试剂混匀后，放入 PCR 中根据所需的温度反应即可。

3. 荧光定量 PCR

(1) 反应体系

| 试剂 | 体积 |
|-----------------------|-------------|
| cDNA | 2 μ l |
| PCR 上游引物 (10 μ M) | 0.4 μ l |
| PCR 下游引物 (10 μ M) | 0.4 μ l |
| SYBR Green solution | 10 μ l |
| 灭菌双蒸水 | 7.2 μ l |
| 总量 | 20 μ l |

(2) 反应条件

| 反应步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |
|------|------|------|----|
| 预变性 | 95°C | 30 s | 1 |
| 变性 | 95°C | 5 s | 40 |
| 退火 | 55°C | 30 s | |
| 延伸 | 72°C | 30 s | |
| 溶链曲线 | 95°C | 15 s | 1 |
| | 60°C | 15 s | |
| | 95°C | 15 s | |

反应结束后，由溶解曲线判断 PCR 反应的特异性。所得各样品 Ct 值利用下列公式计算出各样品 mRNA 的相对表达量，其中 E_{target} 为目的基因的扩增效率， E_{ref} 为内参基因的扩增效率， ΔCt 为对照组 Ct 值与样品 Ct 值的差。

计算公式：

$$ratio = \frac{(1 + E_{\text{target}})^{\Delta Ct_{\text{target}}(\text{control-sample})}}{(1 + E_{\text{ref}})^{\Delta Ct_{\text{ref}}(\text{control-sample})}}$$

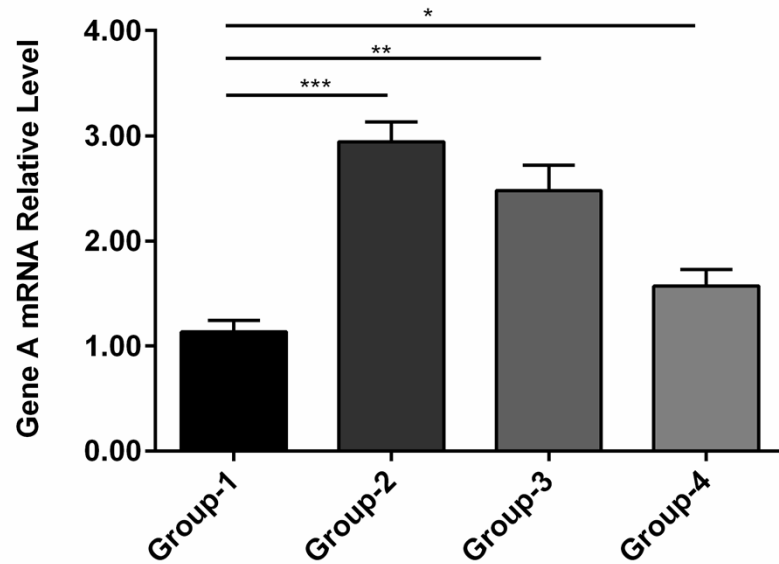
4. 数据处理及统计学方法

实验所得数据采用平均数 \pm 标准误 (Mean \pm SEM) 表示，所有的数据均使用 GraphPad Prism 6 处理及统计分析。两组样本均值之间的比较采用 t 检验，多组样本均值之间的比较采用 ANOVA 检验， $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

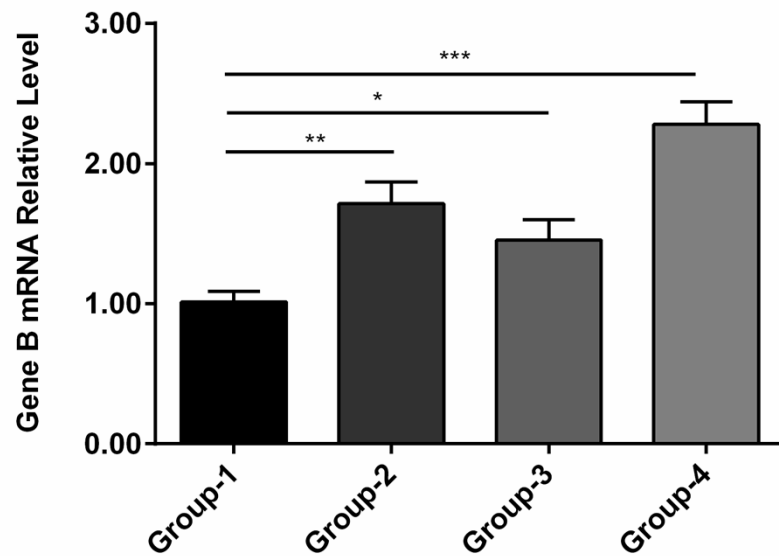
三、实验结果

实时荧光定量 PCR 实验结果（图 1）所示。

A



B



A: Gene A 的 mRNA 表达水平; B: Gene B 的表达水平

图 1 各组细胞中 Gene A、Gene B 蛋白表达水平比较

(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs. Group-1, $n=3$)