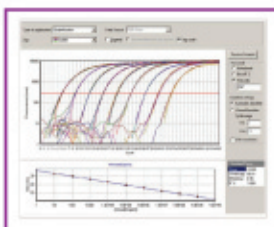


TIANGEN

实验技术手册

修订版

—— 从RNA提取到荧光定量完整解决方案



- RNA提取
- RT-PCR
- 荧光定量

TIANGEN专业品质，让您的研究更专业，更系统，更精确！

目 录

| | |
|----------------------------------|-----------|
| 总 论 | 1 |
| 1、从RNA提取到荧光定量经典流程 | 1 |
| 2、从RNA提取到荧光定量产品选择指南 | 2 |
| 3、“从RNA提取到qPCR完整解决方案”产品匹配评价 | 4 |
| 第一篇 RNA提取、RT-PCR、荧光定量理论部分 | 5 |
| 第一章 RNA提取原理与应用 | 5 |
| 第一节、RNA提取流程 | 5 |
| 第二节、RNA纯化及获得 | 7 |
| 第三节、一些特殊组织的RNA提取 | 8 |
| 第四节、RNA评价与鉴定 | 9 |
| 第五节、RNA的保护 | 11 |
| 第二章 RT-PCR原理与应用 | 13 |
| 第一节、RT-PCR反应体系 | 13 |
| 第二节、RT-PCR方法 | 15 |
| 第三节、提高RT-PCR反应的灵敏度与特异性 | 16 |
| 第四节、RT-PCR成功要素 | 16 |
| 第五节、RT-PCR常用内参引物 | 18 |
| 第三章 荧光定量PCR技术原理及数据分析 | 19 |
| 第一节、荧光定量PCR数学原理和基本概念 | 20 |
| 第二节、荧光定量PCR的化学原理 | 22 |
| 第三节、荧光定量引物及探针设计原则 | 25 |
| 第四节、荧光定量PCR的应用 | 27 |
| 第二篇 RNA提取、RT-PCR、荧光定量实践部分 | 28 |
| 第一章 不同样品RNA提取实验操作 | 28 |
| 第一节、RNA提取方案 | 28 |
| 第二节、RNA提取常见问题分析 | 38 |
| 第二章 RT-PCR实验操作 | 39 |
| 第一节、RT-PCR实验流程 | 39 |
| 第二节、RT-PCR常见问题分析 | 43 |
| 第三章 荧光定量PCR实验操作 | 44 |
| 第一节、应用SYBR Green法进行绝对定量分析 | 44 |
| 第二节、应用SYBR Green法进行Jun基因的表达差异分析 | 47 |
| 第三节、应用TaqMan法进行绝对定量分析 | 50 |
| 第四节、Real-time PCR常见问题分析 | 52 |
| 附录一：产品列表 | 54 |
| 附录二：2009新产品集锦 | 56 |
| 附录三：产品线概述 | 60 |
| 服务指南 | 63 |

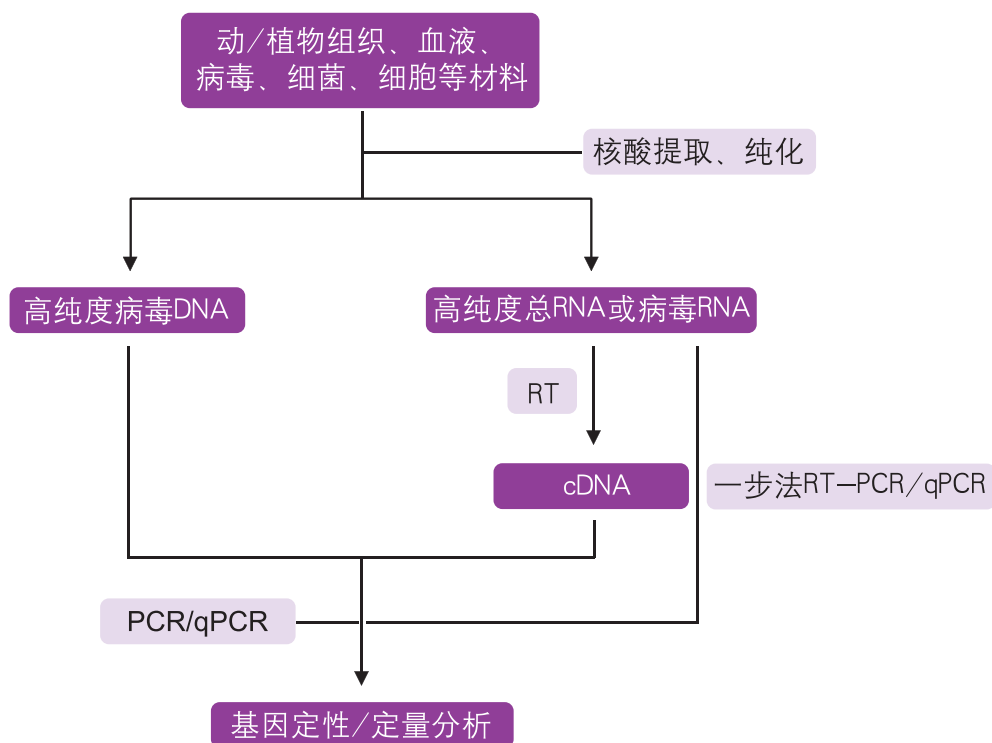
总 论

从 RNA 提取到荧光定量完整解决方案

1、从 RNA 提取到荧光定量经典流程

目前关于RNA的相关研究越来越多,其中从RNA开始到基因原始拷贝数的定量或表达研究,已经成为大多数实验的主流设计方案,也是RNA相关课题研究的首选思路。但由于RNA的特性以及荧光定量的灵敏度要求,这一方案对实验者的实验手段要求也越来越高,因此无论从实验试剂的选择还是实验的操作以及实验材料的准备等各个环节,各位科研工作者都应该进行慎重的选择和操作。

下图是从RNA开始至荧光定量PCR的一套完整解决方案。在这套方案中,天根公司从RNA提取到cDNA合成再到荧光定量PCR都配备有相应的核酸纯化、RT、PCR以及Real-time PCR相关试剂供大家选择。应用同一公司试剂的优势在于试剂间兼容性很强,对实验的顺利进行有一定保障;同时还能提供良好的服务,对实验中出现的问题可以进行更流畅的解决。



2、从 RNA 提取到荧光定量产品选择指南

2.1 RNA 提取系列产品选择指南

| 总RNA纯化 | 离心柱方式 | | | | | 溶液方式 | | | | |
|-----------|-------|---|---|---|---|------|---|---|---|---|
| 动物组织 | ■ | | | | | | | | | |
| 细菌 | | ■ | | | | | ■ | | | |
| 植物 | | | ■ | | | | ■ | ■ | | |
| 次生代谢物多的植物 | | | | | | | | □ | | |
| 细胞 | | | ■ | | | | ■ | ■ | | |
| 培养细胞 | | | ■ | | | | ■ | ■ | | |
| 酵母 | | ■ | | | | | ■ | | | |
| 全血 | | | | ■ | | | ■ | ■ | | |
| 血细胞 | | | | ■ | | | | | ■ | |
| 微量样本 | | | | | ■ | | | | ■ | |
| 血清、血浆、体液 | | | | | | | | | ■ | □ |
| 病毒 | | | | | | | | | | ■ |

RNAsprep pure 动物组织总RNA提取试剂盒
 RNAsprep pure 植物总RNA提取试剂盒
 RNAsprep pure 血液总RNA提取试剂盒/细菌总RNA提取试剂盒
 RNAsprep pure 培养细胞/细胞总RNA提取试剂盒
 RNAsprep pure 微量样品总RNA提取试剂盒
 RNAsprep pure 病毒总RNA提取试剂盒
 RNAsprep pure 基因组DNA/RNA提取试剂盒
 TIANamp 病毒基因组DNA/RNA提取试剂盒
 TIANzol-A+ 总RNA提取试剂盒
 TRIzol 检测用RNA提取试剂盒

■：推荐使用 □：兼用

2.2 RT-PCR/qPCR 系列产品选择指南

| RNA | RT 产品 | | | | 引物 | | | | PCR 产品 | | | | | | | | | |
|--------------|-------|---|---|---|----|---|---|---|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 高丰度RNA | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 低丰度RNA | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 复杂结构RNA | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 高GC含量RNA | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 原核生物RNA | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 真核生物RNA | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 已知序列 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 未知序列 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| DNA&cDNA | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 标准PCR | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 高保真度PCR | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 长片段扩增 | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 多重PCR | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| 巢式PCR | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Realtime PCR | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |

■: 推荐使用 □: 兼容使用

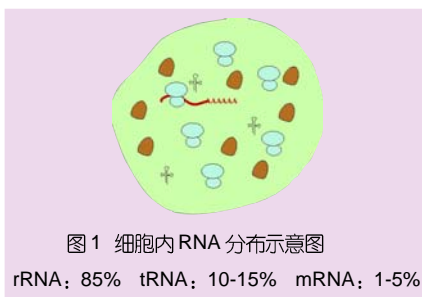
3、“从RNA提取到qPCR完整解决方案”产品匹配评价

| 组织、血液、病毒样本、微生物、细胞 | | | |
|--|---|-------|-------|
| 高纯度的总RNA → cDNA → qPCR/PCR 评价 | | | |
| 解决方案一： | RNAprep pure + Quant RT + Realmastermix 高质量RNA提取 + 高效率反转录，可应用于对RNA及反转录要求高的精密实验，下游荧光定量实验可用于低表达基因检测及表达分析，SNP分析，转基因动植物检测等 | ★★★★★ | ★★★★★ |
| 解决方案二： | RNAprep pure + TIANscript + Realmastermix 高质量RNA提取 + 超长反转录，可用于从一次反转中获得多个遗传信息，可用于基因表达分析，及基因检测等 | ★★★★★ | ★★★★★ |
| 解决方案三： | TRNzol-A ⁺ + Quant RT + Realmastermix 大量RNA提取 + 高效反转录，用于大量RNA及反转录要求高的检测实验，适用于cDNA文库构建、低拷贝基因检测、低表达基因差异分析等 | ★★★★★ | ★★★★★ |
| 解决方案四： | TRNzol-A ⁺ + TIANscript + Realmastermix 大量RNA提取 + 超长反转录，可用于大量cDNA的经济型实验，以及各种基础研究 | ★★★★★ | ★★★★★ |
| 解决方案五： | RNAprep pure + Quant One Step qRT-PCR(SYBR Green) 高质量RNA提取 + 高效灵敏的一步法荧光定量，适用于多种实验材料的一步法精确定量。 | ★★★★★ | ★★★★★ |
| 解决方案六： | TRAZol-A ⁺ + Quant One Step qRT-PCR(SYBR Green) 大量RNA提取 + 高效灵敏的一步法荧光定量，适用于微量样本的一步法定量实验。 | ★★★★★ | ★★★★★ |
| TIANGEN为您提供从“高质量的RNA提取、RT-PCR和高性能实时PCR”的完整解决方案，您可以自在选购先进的RNA提取系统、优质高效的反转录酶以及高灵敏度的qPCR超级混合系统(RealMasterMix)。TIANGEN公司强大的技术背景及完善的产品设计理念确保整个实验过程的一致性和可靠性。 | | | |

第一篇 RNA 提取、RT-PCR、荧光定量理论部分

第一章 RNA 提取原理和方法

细胞中的 RNA 可以分为信使 RNA(mRNA)、转运 RNA(tRNA)和核糖体 RNA(rRNA)三大类(见图 1),且各种 RNA 的含量也不相同,其中 rRNA 占细胞中 RNA 含量的 80-85%,构成了核糖体骨架; tRNA 含量约为 10-15%,是氨基酸运输的载体; mRNA 含量占 1-5%,是携带氨基酸编译的密码子。不同组织总 RNA 提取的实质就是将细胞裂解,释放出 RNA,并通过不同方式去除蛋白、DNA 等杂质,最终获得高纯 RNA 产物的过程。



第一节、RNA 提取流程

1、样品预处理

1.1、提取样品的要求

最好使用新鲜的样品或取样后立即在低温(-20℃或-70℃)冷冻保存的样品,避免反复冻融,因为这会导致提取的 RNA 降解和提取量下降。如有可能,请将样品存放于专门的样品保存液中(如 TIANGEN 公司的 RNAstore)

1.2、样品预处理方式

从各种不同来源样品(如细菌、酵母、血液、动物组织、植物组织和培养细胞),或同一样品的不同组织(如植物幼嫩叶片、成熟根、茎等)中提取高质量的 RNA,因细胞结构及所含的成分不同,样品预处理的方式也各有差异。

一般来说,常用的预处理方式如下:

- 植物材料—液氮研磨
- 动物材料—匀浆、液氮研磨
- 细菌—溶菌酶破壁
- 酵母—液氮研磨、玻璃珠处理

2、细胞裂解

2.1 异硫氰酸胍 / 苯酚法

此方法是一种传统的 RNA 提取方法,适用于大部分动植物材料,但对于次生代谢产物较多的植物材料, RNA 的提取效果较差。异硫氰酸胍能使核蛋白复合体解离,并将 RNA 释放到溶液中,采用酸性酚-氯仿混合液抽提,低 pH 值的酚将使 RNA 进入水相,而蛋白质和 DNA 仍留在

有机相中，从而可以方便的完成 RNA 的提取工作。

天根公司的 TRNzol-A⁺(DP421)、TRNzol(DP405)和 RNAsimple(DP419)就是基于异硫氰酸胍/苯酚法开发的总 RNA 提取试剂和试剂盒。TRNzol-A⁺ 和 TRNzol 应用非常广泛，适用于包括动物组织、培养细胞等在内的各类动物性材料，同时还适用于次生代谢物较少的植物性材料，如幼苗、幼叶等。而 RNAsimple 法主要应用在动物组织和培养细胞的 RNA 提取中，这种方法采用吸附性材料来纯化 RNA，因此与 TRNzol-A⁺ 和 TRNzol 相比，RNAsimple 提取 RNA 具有纯度更高的特点。

2.2 胍盐 / β - 巯基乙醇法

此方法适用于各种不同动物材料和次生代谢物少的植物材料。

在这种方法中，胍盐使细胞充分裂解， β - 巯基乙醇作为蛋白的变性剂在实验全程中可以抑制 RNase 的活性，保护 RNA 不被降解。

TIANGEN 公司的 RNAprep pure 系列总 RNA 提取试剂盒是基于这种方法开发的产品，分别适用于各类不同的材料，实验者可根据自己的需要进行选择。

第二节、RNA 纯化及获得

1、纯化原则

- 消除 RNA 样品中存在的对酶(如逆转录酶)有抑制效应的有机溶剂和高浓度的金属离子。
- 避免其它生物大分子如蛋白质、多糖和脂类分子的污染。
- 排除 DNA 分子的污染。

2、纯化方法

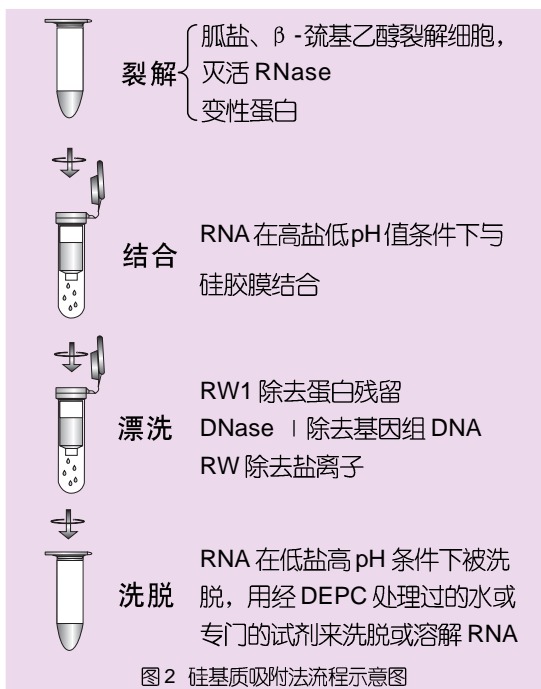
2.1、有机溶剂抽提法

- 1) 抽提: 在进行 RNA 提取时, 常使用氯仿进行抽提, 以去除蔗糖、蛋白等杂质, 并促进水相与有机相的分离, 从而达到纯化 RNA 的目的。在 TIANGEN 公司提取 RNA 的产品中, TRNzol 及 TRNzol-A⁺ 试剂和 RNAsimple 试剂盒均采用了这种方式。
- 2) 沉淀: 氯仿抽提 RNA 后, 一般采用异丙醇或乙醇来沉淀水相 RNA。加入 0.6 倍水相体积的无水乙醇或与水相等体积的异丙醇, 室温沉淀 20-30 分钟, 高速离心, 可获得 RNA 沉淀。
- 3) 洗涤: 加入无 RNase 的 75%乙醇, 将 RNA 沉淀振荡悬浮, 使 RNA 沉淀中的盐离子被充分溶解。然后再离心 10-30 分钟, 再次沉淀 RNA。离心后, 小心倒掉上清(注意不要倒出 RNA 沉淀), 随后快速离心 1-2 秒, 将残留在管壁上的乙醇收集到管底后, 用小枪头吸净, 超净台中风干 1-2 分钟(注意不要晾得太干, 否则 RNA 沉淀不易溶解)。
- D) 溶解: 加入适量的 RNase-free ddH₂O 溶解 RNA 沉淀。

2.2、硅基质吸附法

采用硅基质吸附达到 RNA 分离纯化的原理主要是利用核酸与硅基质材料在高盐条件下结合, 在低盐条件下脱离的特征, 其机理可能为高浓度盐离子破坏硅基质水分子结构, 形成阳离子桥, 核酸便容易与硅基质结合; 而当盐被清洗后, 硅石又可以重新水化, 再水化的硅石便会破坏基质和核酸之间的吸引力, 最后用 RNase-free ddH₂O 将 RNA 从硅胶膜上洗脱下来(见图 2)。

而蛋白、有机溶剂等杂质在高盐条件下不能结合到膜上而被首先洗脱下来, 因此用这种方法可以非常方便的得到高纯度的 RNA。



第三节、一些特殊组织的 RNA 提取

1、纤维组织

心脏/骨骼肌等纤维组织提取 RNA 的关键在于彻底破碎组织。这些组织细胞密度低，单位重量的组织中 RNA 含量较低，建议增加起始量。此外，一定要在液氮中将组织彻底磨碎。

2、蛋白 / 脂肪含量高的组织

脑或植物脂肪含量高，酚 / 氯仿抽提后，上清含白色絮状物。必须用氯仿再次对上清进行抽提。

3、DNA/RNase 含量高的组织

脾、胸腺等组织的 DNA 和 RNase 含量很高，在液氮中研磨，再快速匀浆，能有效灭活 RNase。如加入裂解液后过于粘稠，酚 / 氯仿抽提不能有效分层，则加入更多裂解液可以解决此问题。多次酚 / 氯仿抽提可以去除更多残留的 DNA。如果加入乙醇后马上有白色沉淀形成，表明可能有 DNA 污染，可以在核酸溶解后用酸性酚 / 氯仿再次抽提或者用 DNase I (RT411) 消化，去除 DNA 污染。

4、植物组织和真菌组织

植物组织和真菌组织比动物组织更为复杂，一般选择在液氮条件下对样品进行研磨，以避免内源 RNase 降解 RNA。如果 RNA 降解问题不能解决，大多数情况下是样品中含有的杂质所致。

许多植物和真菌中含有的杂质如多糖，多酚等很难去除，因为这些杂质分子与 RNA 有一些相似性，可与 RNA 同时沉淀或者吸附，因此在植物和真菌组织的提取中，需要用特别的步骤来去除多糖多酚等杂质的干扰和污染。

第四节、RNA 评价与鉴定

提取得到 RNA 溶液后，我们需要对 RNA 进行相关的质量检测，以确定它是否符合后续实验的要求。RNA 用于不同的后续实验，对其质量要求不尽相同。cDNA 文库构建要求 RNA 完整且无酶抑制物残留；Northern blot 实验对 RNA 完整性要求较高，对酶反应抑制物残留要求较低；RT-PCR 实验对 RNA 完整性要求不太高，但对酶反应抑制物残留要求严格。因此在进行不同的实验时应选择不同的方法纯化 RNA，以达到最佳的实验效果。

1、RNA 得率检测——分光光度计法

RNA 得率有很强的组织特异性，不同组织 RNA 的丰度和 RNA 提取的难易程度共同决定了该组织的 RNA 得率。一般来说，可通过分光光度计测定 RNA 溶液在 260nm 处的吸光值来计算 RNA 的含量。RNA 溶液在 260、320、230、280nm 下的吸光度分别代表了核酸、溶液浑浊度、杂质浓度和蛋白等有机物的吸收值。用标准样品测得在波长 260nm 处，1ug/ml RNA 钠盐吸光度为 0.025(光程为 1cm)，即 $OD_{260}=1$ 时，样品中 RNA 浓度为 40ug/ml。通常分光光度计 OD_{260} 的读数要介于 0.15-1.0 之间才是可靠的。因此 RNA 提取结束后，要根据实际得率稀释到适当浓度范围，再用分光光度计检测。按下面的公式计算总 RNA 浓度：

$$\text{总 RNA 浓度(ug/ml)} = OD_{260} \times \text{稀释倍数} \times 40 \text{ug/ml}$$

2、RNA 纯度检测——分光光度计法

通过 $OD_{260/280}$ 来检测 RNA 纯度， $OD_{260/230}$ 作为参考值。

$OD_{260/280}$ 在 1.9-2.1 之间，可以认为 RNA 的纯度较好；

$OD_{260/280}$ 值小于 1.8，则表明蛋白杂质较多；

$OD_{260/280}$ 值大于 2.2，则表明 RNA 已经降解；

$OD_{260/230}$ 值小于 2.0，则表明裂解液中有异硫氰酸胍和 β -巯基乙醇的残留。

注意：如果用 TE 溶解或洗脱 RNA，会使 $OD_{260/280}$ 值偏大。

3、RNA 完整性鉴定——琼脂糖凝胶电泳

3.1、变性电泳

一般地，我们可以通过 RNA 的变性电泳来鉴定 RNA 的完整性。方法如下：

A. 凝胶制备：

制备 1.2% 琼脂糖凝胶（电泳槽体积为 50ml）：

称取 0.6g 琼脂糖，加入 43.5ml 水，加热溶解并降温到 60℃。

加入 5ml 10 × 甲醛变性电泳缓冲液和 1.5ml 37% 的甲醛，混合均匀。

倒入电泳槽中制胶（甲醛有毒，制胶应在通风橱中进行）。

B. RNA 模板准备

| | |
|----------------|--------|
| 10 × 甲醛变性电泳缓冲液 | 1.25ul |
| 37% 甲醛 | 2.2ul |
| 甲胺 | 6.25ul |
| RNA | 2.8ul |
| 总体积 | 12.5ul |

混合后离心 5-10 秒(1000-2000rpm/min)

55℃加热 15 分钟

加入 2.5ul 甲醛凝胶加样缓冲液，混合离心 5 秒
将样品加入点样孔

在5v/cm的电压下电泳至溴酚蓝带跑到电泳槽中央(20cm 长电泳槽，用 95v 电压，1 小时左右)

rRNA 占总 RNA 的 80-85%，在琼脂糖凝胶上可以清晰地看到 28S(23S)和 18S(16S)rRNA。28SrRNA 的量约为 18SrRNA 的两倍，说明 RNA 的完整性较好(见图 3)。

3.2、常规琼脂糖凝胶电泳

RNA 的检测可以通过常规的琼脂糖凝胶电泳进行完整性和质量鉴定。一般应用 1%的凝胶电泳，上样 700-1000ng 的 RNA(一般 1-3ul)，5 V/cm 电泳 15-20 分钟即可。一般 rRNA 占总 RNA 的 80-85%，在琼脂糖凝胶上可以清晰地看到 28S(23S)和 18S(16S)rRNA。如 28S rRNA 的量约为 18S rRNA 的两倍，说明 RNA 完整性较好(见图 4)。做 RNA 电泳最好用新配的电泳缓冲液(如 0.5 × TBE)和干净的电泳槽，电泳槽可用 0.5M 的 NaOH 浸泡 20 分钟以除去 RNase。

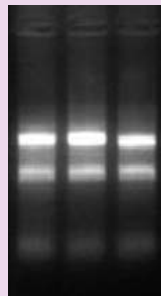


图 3 应用 TIANGEN TRNzol-A⁺ 提取大鼠肝脏总 RNA 的变性凝胶电泳检测图

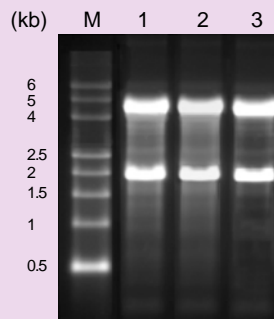


图 4 使用 TIANGEN 公司的 TRNzol 提取小鼠组织总 RNA (琼脂糖凝胶浓度为 0.8%)

1: 肝脏组织 RNA
2: 肾脏组织 RNA
3: 鼠尾组织 RNA

| 样品种类 | rRNA 种类 | 大小(kb) |
|-----------------|---------|--------|
| 人 | 18S | 1.9 |
| | 28S | 5.0 |
| 老鼠 | 18S | 1.9 |
| | 28S | 4.7 |
| 果蝇 | 18S | 2.0 |
| | 28S | 4.1 |
| 烟草叶片 | 16S | 1.5 |
| | 18S | 1.9 |
| | 23S | 2.9 |
| | 25S | 3.7 |
| 酵母 | 18S | 2.0 |
| | 26S | 3.8 |
| 大肠杆菌 | 16S | 1.5 |
| | 23S | 2.9 |
| 非洲爪蟾 | 18S | 4.0 |
| | 28S | 1.8 |
| 不同物种 rRNA 分子量大小 | | |

第五节、RNA 的保护

与 DNA 提取实验相比, RNA 的提取实验常常较为困难, 这主要是由于 RNA 非常容易降解。而造成 RNA 降解的原因来自内因和外因两个方面:

内因: RNA 核糖残基的 2' 和 3' 位置带有羟基, 易被水解;

外因: 生物体内和外部环境中存在大量 RNase, 并且 RNase 不易失活, 高温后仍然能够正确折叠恢复活性。

因此, 从样品的储存、RNA 的提取以及 RNA 提取完成后的保存, 我们都需要格外小心, 处处防范 RNase 对于 RNA 的降解作用。

1、提取前的 RNA 保护

1.1 材料样品中的 RNA 保护

一般而言, 在收集材料样品准备提取 RNA 时, 应该选择新鲜的材料, 取样后迅速用液氮研磨或匀浆处理, 以保证我们所要提取材料中的 RNA 本身是完整的。

如果收集好材料后, 不能马上进行 RNA 的提取工作, 就需要先将材料保存好, 冰冻材料保证低温储存, 以保证材料中的 RNA 在保存过程中不被降解。液氮低温保存法是一种常用的保存方法。先将材料在液氮中速冻后保存于 -80℃ 冰箱或直接保存在液氮中。

1.2 实验室中 RNA 提取工作区 RNase 的清除

自然界中的 RNase 含量非常丰富, 在空气中会有许多 RNase 存在。因此, 在 RNA 提取实验中应该辟出 RNA 提取专区, 该区域要进行 RNase 的清除处理, 同时要注意避免同其它实验区发生交叉污染。

1.3 实验耗材、玻璃器皿上的 RNase 清除

所有提取 RNA 所用到的耗材和器皿都要进行 RNase 清除处理。

使用无 RNase 的塑料制品, 枪头、移液器、电泳槽等避免交叉污染, 实验台面等要彻底处理。RNA 处在 TRNzol 试剂中是会被 RNase 降解的, 但提取后的继续处理过程中应使用不含 RNase 的塑料或玻璃器皿。玻璃器皿可在 150℃ 烘烤 4 小时, 塑料器皿可在 0.5M NaOH 中浸泡 10 分钟, 然后用水彻底清洗, 再灭菌, 即可彻底去除 RNase。实验所涉及的试剂或溶液, 尤其是水, 必须确保无 RNase。配制溶液应使用无 RNase 的水(将水加入到干净的玻璃瓶中, 加入 DEPC 至终浓度 0.1%(v/v), 振荡过夜, 高压灭菌)。

2、提取过程中的 RNA 保护

2.1 组织破碎过程中的 RNA 保护

选择合适的匀浆方法, 尽可能减少匀浆的时间, 保持低温匀浆。在进行细胞裂解之前, 一般要先将组织块破碎。破碎时所采用的方法主要有液氮研磨或匀浆处理。液氮研磨时注意不要让液氮挥发干净, 因为液氮可以充分抑制 RNase, 一旦液氮挥发干净, 就可能造成内源 RNase 对 RNA 的降解作用。

2.2 细胞裂解过程中的 RNA 保护

选择合适的裂解液，裂解液的量要足够，裂解要充分。在 TRNzol-A⁺、TRNzol、RNAsimple、RNAprep pure 等方法中，裂解液都有抑制 RNase 的作用。因此，在裂解液加量一定的情况下，所加入的提取材料的量就应该按说明书中的比例加入，如果材料太多，会造成裂解不充分和 RNase 抑制不充分的双重后果，从而使 RNA 的得率、完整性和纯度都受到影响。

2.3 实验人员的注意事项

在提取 RNA 的过程中，实验操作者本身也应该注意相关问题。因为我们的手上、唾液中都会有大量的 RNase 存在，所以在进行 RNA 提取实验时，应该戴上口罩，并及时更换手套。这不仅是对 RNA 的保护措施，同时也是对实验操作者自身的保护。

2.4 保存过程中的 RNA 保护

在经过从材料采集到 RNA 提取等一系列准备和实验之后，我们终于得到了高质量的 RNA，那么接下来的 RNA 保存就成为重点问题，而其中最关键的问题就是如何避免保存过程中的 RNA 降解。TIANGEN 的 RNAsafe 为解决这一问题提供了安全、简单的方案。

RNAsafe(DP409)是一种独特的化学试剂，可以用作 RNase 的抑制，能够高效去除溶液中可能存在的 RNase 污染，保证 RNA 完整性不受破坏。适合于各种缓冲液，包括不能由 DEPC 处理的 Tris 及 MOPS 缓冲液系统等。处理后不需灭菌。操作简单，使用安全。

RNAsafe 使用方法：在待处理的溶液或反应液中加入 1/20 体积的 RNAsafe。60℃处理 20 分钟使污染的 RNase 失活。冷却至室温即可使用或置于适当温度下保存。处理过的溶液可以再处理(60℃、10-20 分钟)，以去除任何的后续 RNase 污染。

3、后续实验中的 RNA 保护

RNA 的提取归根到底只是一个基础实验，这就意味着我们还要用 RNA 来完成许多后续实验，例如：RT-PCR，Northern blot，体外转录和翻译等。那么在这些后续实验中，也需要对 RNA 进行持续的保护，RNasin 就是在这类后续实验中的应用最广泛的 RNase 抑制剂。

RNasin 是人们在生物体内发现的特异性 RNase 抑制剂，它的本质是蛋白质，分子量为 51000kDa，等电点 pH 为 4.7。RNasin 可以特异的与 RNase 以共价键形成复合物从而彻底使 RNase 失活。

第二章 RT-PCR 原理与方法

RT-PCR 是将 RNA 的反转录 (RT) 和以反转录产物 cDNA 为模板的聚合酶链式扩增 (PCR) 相结合的技术。首先经反转录酶的作用从 RNA 合成 cDNA, 再以 cDNA 为模板, 扩增合成目的 DNA 片段。RT-PCR 技术灵敏而且用途广泛, 可用于检测细胞中基因的表达水平, 细胞中 RNA 病毒的含量和直接克隆特定基因 cDNA 序列等研究。

第一节、RT-PCR 反应体系

1、模板

作为模板的 RNA 可以是总 RNA、mRNA 或体外转录的 RNA 产物。模板 RNA 最常见的问题是 RNA 降解或混杂有基因组 DNA。使用较好的 RNA 分离方法, 如 TRNzol、RNAprep pure 系列 RNA 提取试剂盒, 可以抑制 RNA 酶活性, 并最大限度去除基因组 DNA。如果需要完全去除痕量 DNA, 则应在反转录前用 DNase I 进行处理。

2、引物

用于反转录的引物可视实验的具体情况选择随机引物、Oligo dT 及基因特异性引物(GSP)的一种。对于短的不具有发卡结构的真核细胞 mRNA, 三种引物都可采用。

Oligo dT 要求 RNA 必须有 Poly A, 所以适用于真核生物的 mRNA。Oligo dT 主要适合长链甚至全长 mRNA 的 RT, 对 RNA 样品的质量要求较高, 不要有明显的 DNA 污染, RNA 降解和 RNA 断裂(如电泳中出现多条非典型带而又明确不是 DNA 就可能是 RNA 出现断裂的情况), 通常有标准浓度可以参考。

随机引物适合各种 RNA 的 RT, 尤其适合丰度低的模板和具有复杂二级结构的模板。反转录前可用 RNAstructure 分析软件进行分析, 若发现模板具有复杂二级结构, 还可考虑做巢式 PCR 或者考虑做二步 PCR, 因为引物设计处若有连续复杂的二级结构, 设计时就比较困难; 如果引物退火处后面不远就出现连续复杂的二级结构, 那么不用二级结构分析软件是不容易发现的, 而且它也会影响 PCR 扩增。所以应该避免在引物退火后面较近处出现严重连续二级结构, 可考虑改用随机引物做 RT, 同时应在 PCR 阶段作出针对性的修改策略。

特异性引物(GSP) 常用于一步法 RT-PCR 实验中, 前提是知道模板的特异性序列。在一步法 RT-PCR 实验中, 对于特异性引物的设计质量以及操作人员的实验技能要求较高。

3、逆转录酶

3.1 Quant Reverse Transcriptase

Quant 是一种使用大肠杆菌工程菌进行重组表达的全新高效逆转录酶, 其反转录性能明显优于 AMV, M-MLV 系列的逆转录酶(见图 1)。该酶与 RNA 具有高亲合性, 可高效转录多种 RNA 模板, 更可通过读 GC 含量高、二级结构复杂的 RNA 模板, 适用范围非常广泛。

3.2 M-MLV

TIANScripT(源于 M-MLV)是由一个 71kDa 的单亚基组成的 DNA 逆转录聚合酶。可以催化以 RNA 或 DNA: RNA 杂交链为模板的互补 DNA 的聚合反应。酶经修饰, RNaseH 的活性比普通得要弱很多, 因此在合成第一链 cDNA 的过程中, RNA 的降解降低, 从而使得率和合成的 cDNA 长度有所提高(见图 2)。



图 1 不同来源反转录酶的灵敏度比较, 从中可以看出 Quant Reverse Transcriptase 反转录性能明显优于 AMV, M-MLV 系列的反转录酶。

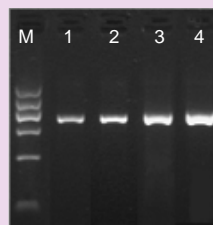


图 2 用 1μg 小鼠肝脏总 RNA 进行反转录, 得到的反转录产物取 1μl 做为模板, 扩增 β-actin 基因。
M: TIANGEN Marker I
1 进口同类产品, Oligo(dT)₁₅
2 进口同类产品, Oligo(dT)₁₅
3 M-MLV, Random
4 M-MLV, Oligo(dT)₁₅

第二节、RT-PCR 方法

1、一步法

一步法即反转录和 PCR 扩增在同一管内完成，cDNA 合成和扩增之间无需打开管盖，有助于减少污染。而且由于得到的所有 cDNA 样品都用来扩增，所以灵敏度更高，最低可以反转录 0.01pg 总 RNA。一步法 RT-PCR 一般使用基因特异性引物起始 cDNA 合成(见图 3)。

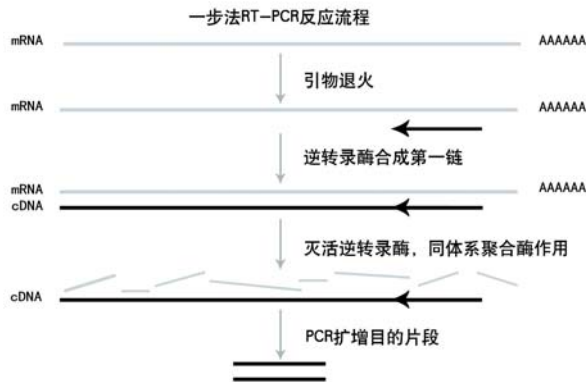


图3 一步法 RT-PCR 示意图

2、两步法

两步法即反转录和 PCR 扩增分两步进行，首先从 RNA 模板反转录得到 cDNA，得到的 cDNA 再进行一次或多次不同的 PCR 反应。两步法可以使用 oligo(dT) 或随机引物引导 cDNA 第一链的合成，因此，可以从一个特定的样品中反转录出所有的 mRNA 的信息(见图 4)。

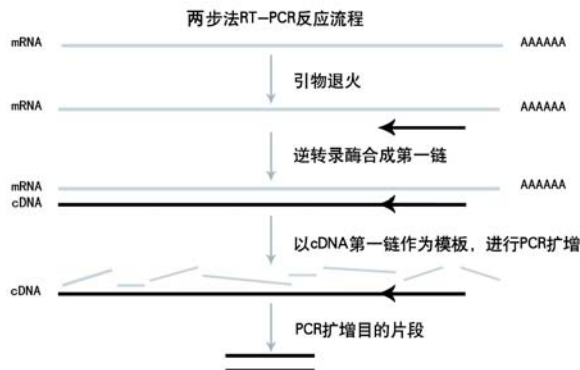


图4 两步法 RT-PCR 示意图

3、一步法与两步法区别

一步法更方便，且可防止在管与管之间转换过程中污染样品，可适用于大量样品分析或定量 PCR。两步法在选择聚合酶和引物时具有更大的灵活性，同时可由一次反转录样品获得多个遗传信息。

第三节、提高 RT-PCR 反应的灵敏度与特异性

- 首先应确定模板 RNA 完整性好，无 DNA 污染。样品取样后应立即提取或放在 RNastore 样品储存液中保存，以避免 RNA 降解。采用较好的 RNA 提取方法，如 TRNzol、RNAprep pure 提取试剂盒，可避免 RNA 降解并最大限度减少 DNA 污染。
- RNA 模板中不应含有扩增反应抑制剂。RNA 模板中若有乙醇、DMSO、SDS 和甲酰胺之类的试剂残留，都会抑制逆转录和 PCR 反应，如果怀疑污染了抑制剂，应先进行纯化。
- 为了防止模板降解，可以在反应体系中加入 RNase 抑制剂 RNasin(DP418)。
- 使用适量模板 RNA，模板量太多会降低特异性，太少会导致扩增不出条带或条带太弱。
- 如果由于模板有二级结构，导致扩增效果不好，可提高逆转录反应温度。
- 对于 < 50 ng 的 RNA 样品，可以在第一链 cDNA 合成中使用 0.1ug 到 0.5ug 乙酰 BSA。
- 镁离子浓度对反应结果影响很大。可从 1 mM 到 3 mM，间隔 0.5 mM 进行一系列反应，确定对于每个模板和引物对的最佳镁离子浓度。
- 设计引物时，避免在引物 3' 端含有互补序列。避免可以形成内部发卡结构的序列。另外，设计时应该考虑设计 Tm 值相近的引物。

第四节、RT-PCR 成功要素

1、高质量 RNA

成功的 cDNA 合成来自高质量的 RNA。高质量的 RNA 至少应保证全长并且不含逆转录酶的抑制剂，如 EDTA 或 SDS。RNA 的质量决定了能够转录到 cDNA 上的序列信息量的最大值。不管起始模板是总 RNA 还是 poly(A)⁺ RNA，都可以检测到扩增结果。为了防止痕量 RNase 的污染，从富含 RNase 的样品(如胰脏)中分离到的 RNA 需要贮存在甲醛中以保存高质量的 RNA，对于长期贮存更是如此。另外，长度大于 4kb 的转录样本对于痕量 RNase 的降解比小量转录样本更敏感。为了增加贮存 RNA 样品的稳定性，可以将 RNA 溶解在去离子的甲酰胺中，存于 -70℃。用于保存 RNA 的甲酰胺一定不能含有降解 RNA 的杂物。来源于胰脏的 RNA 至少可以在甲酰胺中保存一年。当准备使用 RNA 时，可以使用下列方法沉淀 RNA：加入 NaCl 至 0.2M 及 4 倍体积的乙醇，室温放置 3-5 分钟，10,000 × g 离心 5 分钟。也可以使用 RNA 保护试剂。在逆转录反应中经常加入 RNase 抑制剂以增加 cDNA 合成的长度和产量。RNase 抑制剂要在第一链合成反应中，在缓冲液和还原剂(如 DTT)存在的条件下加入，因为 cDNA 合成前的过程会使抑制剂变性，从而释放结合的可以降解 RNA 的 RNase。蛋白 RNase 抑制剂仅仅是防止 RNase A, B, C 对 RNA 的降解，并不能防止皮肤上的 RNase，因此尽管使用了这些抑制剂，也要防止外源 RNase 的污染。

2、使用无 RNaseH 活性(RNaseH⁻)的逆转录酶

逆转录酶催化 RNA 转化成 cDNA。不管是 M-MLV 还是 AMV，在本身的聚合酶活性之外，都具有内源 RNaseH 活性。RNaseH 活性同聚合酶活性相互竞争 RNA 模板与 DNA 引物，同时可

以降解杂合链中的 RNA 链。被 RNaseH 活性所降解的 RNA 模板不能再作为合成 cDNA 的有效底物，降低了 cDNA 合成的产量和长度。因此消除或大大降低逆转录酶的 RNaseH 活性将会大有裨益。而且降低逆转录酶的 RNaseH 活性会加大 RT 酶的热稳定性。

3、使用逆转录反应增强剂

包括甘油和 DMSO 在内的添加剂加到第一链合成反应中，可以降低核酸双链的稳定性并解开 RNA 二级结构，最多可以加入 20% 的甘油或 10% 的 DMSO 而不影响 M-MLV 的活性。AMV 也可以耐受最多 20% 的甘油而不降低活性。为了在逆转录反应中最大限度提高 RT-PCR 的灵敏度，可以加入 10% 的甘油并在 45℃ 保温。如果 1/10 的逆转录反应产物加入到 PCR 中，那甘油在扩增反应中的浓度为 0.4%，这不足以抑制 PCR 扩增。

第五节、RT-PCR 常用内参引物

1、常用 β -actin 引物

| 引物来源 | 引物名称 | 引物序列 | 扩增片段 |
|------|-----------|------------------------|-------|
| 大鼠 | R actin f | tcagggtcatcactatcggaat | 432bp |
| | R actin r | aaagaaaggggtgtaaacgca | |
| | R actin f | cccatctatgagggttacgc | 150bp |
| | R actin r | tttaatgtcacgcacgatttc | |
| 人 | h actin f | tgacgtggacatccgcaaag | 205bp |
| | h actin r | ctggaaggtggacagcgagg | |
| | h actin f | cgggaaatcgtgcgtgac | 434bp |
| | h actin r | tggagggtggacagcgagg | |
| 小鼠 | m actin f | gagaccttaacacccccagc | 263bp |
| | m actin r | atgtcacgcacgatttccc | |
| | m actin f | gagaccttaacacccccgc | 446bp |
| | m actin r | ccacaggattccatacccaa | |

2、常用内参基因引物名称

| 内参基因名称 | 引物名称 | 引物序列 | 引物位置 | 引物 Tm | 退火温度 | 扩增长度 |
|------------------|-------|------------------------|-----------|-------|-------|-------|
| Human actin beta | F305 | ctgggacgacataggagaaaa | 305-324 | 52.3℃ | 59.4℃ | 564bp |
| | R868 | aaggaaggctggaagagtgc | 868-849 | 52.6℃ | | |
| Rat actin beta | F18 | caccgcgcagtacaaccttc | 18-37 | 54.5℃ | 60.4℃ | 207bp |
| | R224 | cccataccacccatcacacc | 224-205 | 54.4℃ | | |
| Mouse actin beta | F91 | atatcgctgcgtggtcgtc | 91-110 | 57.5℃ | 60.4℃ | 517bp |
| | R607 | aggatggcgtgagggagagc | 607-588 | 57.8℃ | | |
| human GAPDH | F369 | agaaggctggggctcatttg | 369-388 | 55.6℃ | 57.5℃ | 266bp |
| | R626 | aggggcatccacagtcttc | 626-607 | 55.1℃ | | |
| Rat GAPDH | F50 | cagtgccagcctcgtctcat | 50-69 | 55℃ | 58.3℃ | 595bp |
| | R664 | aggggccatccacagtcttc | 644-625 | 55.1℃ | | |
| Mouse GAPDH | F306 | aggccgtgtcgtgagtatgtc | 306-325 | 54℃ | 58.7℃ | 530bp |
| | R835 | tgctgtcttcaccaccttct | 835-816 | 54.6℃ | | |
| Rat 18s rRNA | F1865 | tcggaaggatcattaacgga | 1865-1886 | 58.6℃ | 59.3℃ | 300bp |
| | R2164 | agtaggagaggagcgcgagacc | 2164-2143 | 59℃ | | |
| Human 18s rRNA | F1565 | cagccacccgagattgagca | 1565-1584 | 58.3℃ | 59℃ | 253bp |
| | R1816 | tagtagcgacggcggtgtgtg | 1816-1997 | 58.3℃ | | |
| Mouse 18s rRNA | F56 | aggggagagcgggtaagaga | 56-75 | 54.4℃ | 62℃ | 241bp |
| | R296 | ggacaggactaggcggaaca | 296-277 | 54℃ | | |

第三章 荧光定量 PCR 技术原理及数据分析

■ 定量 PCR 简介

定量 PCR (Real-time PCR) 技术, 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程, 最后通过特定数学原理对未知模板进行定量分析的方法。

在 Real-time PCR 技术的发展过程中, 两个重要的发现起着关键的作用:

(1) 在 90 年代早期, Taq DNA 多聚酶的 5' -3' 核酸外切酶活性的发现, 它能降解特异性荧光标记探针, 因此使得间接检测 PCR 产物成为可能。

(2) 此后荧光双标记探针的运用实现了在一密闭的反应管中能实时地监测反应全过程。

这两个发现的结合以及相应的仪器和试剂的商品化发展, 使得 real-time PCR 方法在研究工作中得到了广泛的运用。

实时荧光定量 PCR 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, 该技术实现了 PCR 从定性到定量的飞跃。与常规 PCR 相比, 荧光定量 PCR 具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点, 目前在不同的研究领域都得到广泛应用。

■ 终点法定量 PCR 的缺陷

理论上 PCR 是一个指数增长的过程, 但是实际的 PCR 扩增曲线并不是标准的指数曲线, 而是 S 形曲线(见图 1)。这是因为随着 PCR 循环的增多, 扩增规模迅速增大, Taq 酶、dNTP、引物, 甚至 DNA 模板等各种 PCR 要素逐渐不敷需求, PCR 的扩增效率越来越低, 产物增加的速度就逐渐减缓。当所有的 Taq 酶都被饱和以后, PCR 就进入了平台期。由于各种环境因素的复杂相互作用, 不同的 PCR 反应体系进入平台期的时机和平台期的高低都有很大变化, 难以精确控制。所以, 即使是重复实验, 各种条件基本一致, 最后得到的 DNA 拷贝数也是完全不一样的, 波动很大。

传统的定量方法, 如溴化乙锭染色或放射性核素掺入标记后的光密度扫描等, 测定的都是 PCR 的终产物, 而不是起始 DNA 拷贝数。由于 PCR 的终产物量与起始模板量之间没有线性关系, 所以根据最终的 PCR 产物量不能计算出起始 DNA 拷贝数。

■ 荧光定量 PCR 的优点

- A、特异性好(Taqman 法和分子信标法等): 使用特异性探针对待定量分子进行识别, 具有很高的准确性。同时, 靶序列由引物和探针双重控制, 特异性好、假阳性低。
- B、线性关系好、线性范围宽: 由于荧光信号的产生和每次扩增产物成——对应的关系, 通过荧光信号的检测可以直接对产物进行定量。
- C、操作简单、安全、自动化程度高。
- D、速度快、高通量: 可在 2 小时内完成 96 个样品的定量分析。

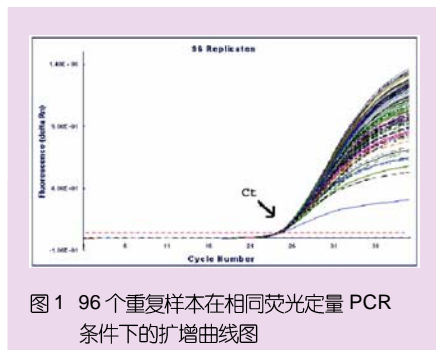


图 1 96 个重复样本在相同荧光定量 PCR 条件下的扩增曲线图

第一节、 荧光定量 PCR 数学原理和基本概念

1、 荧光定量 PCR 数学原理

对于某些实验，需要测定的是标本中的DNA原始拷贝数，在这种情况下不能采用终点定量，而要根据 Ct 值确定 DNA 起始拷贝的数量，荧光定量 PCR 技术便应运而生。荧光定量 PCR 原理如图 2 所示。

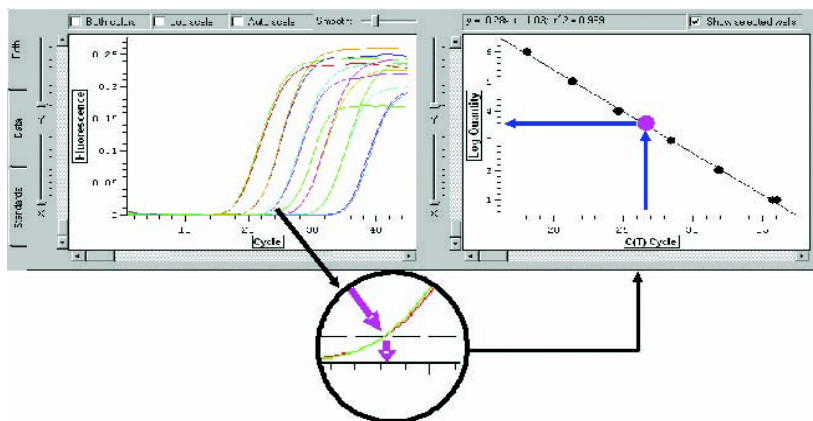


图 2 荧光定量 PCR 原理示意图(左: 扩增曲线; 右: 标准曲线)

理想的 PCR 反应是以 2^n 次方即对数增长的方式扩增

$$X_n = X_0 \times 2^n \quad (1)$$

但由于 PCR 反应体系是一个有限的体系，也就是我们加入到 PCR 反应体系中的物质是有限的，例如酶、引物、Buffer 等，只有在对数增长期，PCR 的扩增效率才等于 1，大部分时候扩增效率小于 1，有时甚至等于零。因此 PCR 扩增的真正情况是：

$$X_n = X_0 (1+Ex)^n \quad (2)$$

其中 n：扩增反应的循环次数，

X ：第 n 次循环后的产物量，

X_0 ：初始模板量，Ex：扩增效率

在扩增产物达到阈值线时所经历的循环数为 Ct 个循环，此时的产物量为：

$$X_{Ct} = X_0 (1+Ex)^{Ct} = M \quad (3)$$

其中 X_{Ct} ：荧光扩增信号达到阈值强度时扩增产物的量，在阈值线设定以后，它是一个常数，我们设为 M

对方程(3)两边同时取对数得：

$$\log M = \log X_0 (1+Ex)^{Ct} \quad (4)$$

我们对该方程式做简单的数学运算后得到：

$$\log X_0 = -Ct \log(1+Ex) + \log M \quad (5)$$

其中 M 为常数，Ex 为常变数，也就是说 Ex 在 PCR 反应中的某一个循环中是一个常数，但不同的循环数中，Ex 的数值会发生变化。

因此从上式可以推出： \log 起始浓度与循环数呈线性关系，根据样品扩增达到阈值的循环数即 C_t 值就可计算出样品中所含的模板量。

2、荧光定量 PCR 基本概念

2.1 扩增曲线

实时荧光定量 PCR 就是通过对 PCR 扩增反应中每一个循环产物荧光信号的实时检测从而实现对起始模板定量及定性的分析。在实时荧光定量 PCR 反应中，引入了一种荧光化学物质，随着 PCR 反应的进行，PCR 反应产物不断累积，荧光信号强度也等比例增加。每经过一个循环，收集一个荧光强度信号，这样我们就可以通过荧光强度变化监测产物量的变化，从而得到一条荧光扩增曲线(见图 3)。

一般而言，荧光扩增曲线可以分成三个阶段：荧光背景信号阶段，也就是基线期；荧光信号指数扩增阶段和平台期(见图 4)。在荧光背景信号阶段，扩增的荧光信号被荧光背景信号所掩盖，我们无法判断产物量的变化。而在平台期，扩增产物已不再呈指数级的增加，其终产物量与起始模板量之间没有线性关系，所以根据最终的 PCR 产物量不能计算出起始 DNA 拷贝数。PCR 理论方程只在指数期成立，只有在荧光信号指数扩增阶段，PCR 产物量的对数值与起始模板量之间定存在线性关系，我们可以选择在这个阶段进行定量分析。

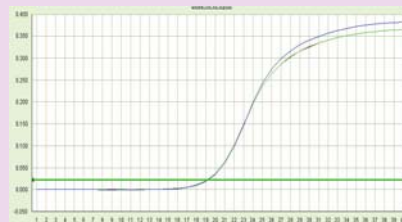


图 3 荧光定量 PCR 扩增曲线示意图

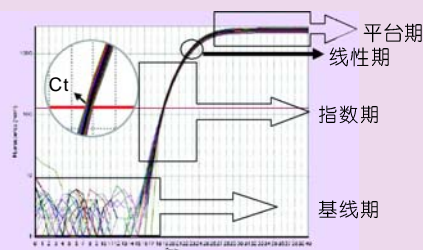


图 4 荧光定量 PCR 基础概念示意图

2.2 标准曲线

绝对定量中，未知样本的量(即拷贝数或单位数量)可以通过从已知量的标准品范围中推算得出。为了建立标准曲线，需要已知浓度的标准模板。模板稀释后，用这些稀释样品作为标准样品，将未知的待测样本和标准样品置于同一实验中进行反应，用稀释的标准样品构建标准曲线，通过推算来确定未知样本中目的基因的量。这与用分子量标记来判定琼脂糖凝胶上未知 DNA 条带分子量大小原理相似。

如图 5 所示，我们得到一组含有 1250-20000 个拷贝模板的标准品，标准品和样本在同一实验中运行，将得到的 C_t 值代入标准曲线的线型方程即可得出拷贝数。

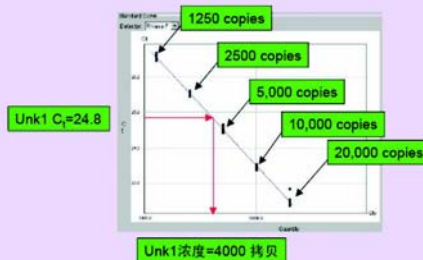


图 5 荧光定量 PCR 标准曲线示意图

2.3 荧光阈值

为了便于对所检测样本进行比较，在荧光定量 PCR 反应的指数期，首先需设定一定荧光信号的阈值(threshold)，一般这个阈值是以 PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号(baseline)，荧光阈值的缺省设置是 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。如果检测到荧光信号超过阈值被认为是真正的信号，它可用于定义样本的阈值循环数 Ct。

2.4 Ct 值

Ct 值的含义是：每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数。研究表明，每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系，起始拷贝数越多，Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可作出标准曲线，因此只要获得未知样品的 Ct 值，即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数。

2.5 扩增效率

扩增效率的确定方法：

将模板稀释成一系列浓度梯度进行 PCR 反应，用这个结果做标准曲线，利用递减的直线关系等式和相关系数(R)或可信度(R²)来计算扩增效率。

扩增效率计算 (E)：

扩增效率与标准曲线的斜率相关， $E=10^{-1/\text{斜率}}-1$ 。扩增效率的理论值应该为 1，即每增加一个循环 PCR 产物翻倍，那么 $10^{-1/\text{斜率}}=2$ ，优化的标准曲线斜率应该为 -3.32。

扩增效率接近 100%是优化的重复性好的实验的最好标志，实际操作时 PCR 反应的扩增效率应该在 90-105%之间，如果扩增效率低，可能的原因是引物设计不当或反应条件未优化；如果扩增效率大于 100%，可能的原因是系列稀释样品加样错误，或者有非特异性产物扩增，如引物二聚体产生。如果扩增效率小于 90%或大于 105%，建议重新设计引物或探针，引物和探针的设计原则请参考本章第三节内容。

第二节、荧光定量 PCR 的化学原理

1、非特异性荧光定量 PCR(以 SYBR Green 为例)

1.1 SYBR Green 染料介绍

SYBR Green 是荧光定量 PCR 最常用的 DNA 结合染料，可以与双链 DNA 结合并发出荧光(见图 6)。在游离状态下，SYBR Green 发出微弱的荧光，一旦与双链 DNA 结合后，其荧光增强

到游离状态的 1000 倍。所以，一个反应发出的全部荧光信号与出现的双链 DNA 量成正比，可以根据荧光信号检测出 PCR 体系存在的双链 DNA 数量，SYBR Green 的工作原理如图 7 所示。SYBR Green 的最大吸收波长约为 497nm，发射波长最大约为 520nm。在应用 SYBR Green 进行 Real-time PCR 反应时，选择的 PCR 扩增程序一般为变性(94℃)~退火(50-60



图 6 SYBR Green 与 DNA 双螺旋小沟区域结合示意图

°C)~ 延伸(68-72°C)三步法, 40-45 个循环。

● SYBR Green 的优点: 实验设计简单 (仅需 2 个引物, 不需要设计探针); 无需设计多个探针即可检测多个基因, 通用性好; 成本低; 且能够进行融解曲线分析检验扩增反应的特异性。

● SYBR Green 的不足: 由于 SYBR Green 与所有的双链 DNA 都可以结合, 因此不能进行多重 PCR 反应; 同时由引物二聚体、单链二级结构以及错误扩增产物的出现会增加荧光值, 从而影响定量的精确性; 通常本底较高, 所以临床上应用可能会有假阳性产生, 不过结合融解曲线来分析产物的均一性, 有助于增加 SYBR Green 定量结果的准确性。

1.2 融解曲线分析

由于在定量 PCR 分析中利用的是在低温复性后, 扩增产物会按碱基互补配对原则结合成 DNA 双链, 而染料在与双链 DNA 结合产生活化, 能产生荧光效应。通过逐渐增加温度同时监测每一步的荧光信号来产生融解曲线, 随着反应中双链 DNA 的变性解链, 荧光信号降低, 用荧光信号改变的负的一次导数与温度做图, 在扩增产物的解链温度上便会产生特征峰值(T_m , 双链 DNA 解链 50% 的温度)。但由于反应中存在少量的非特异聚合体 (如引物二聚体等), 能引起干扰, 非特异聚合体的融解温度较特异性结合低, 当扩增结束后, 再缓慢加温, 当 DNA 变性后, 染料被释放, 荧光减少, 而非特异性结合先于特异性结合减少, 对融解过程进行连续动态监测可得融解曲线, 通过曲线将非特异性信号和特异性信号区分出来, 同时在特异性信号区, 荧光减少的快慢与浓度的对数成正比。

融解曲线的设置是在整个 PCR 完成后进行, 从 60°C 升至 95°C, 每升高单位温度, 仪器会自动收集荧光信号, 得到的融解曲线是随着温度的升高, 双链 DNA 的解链, 荧光信号不断降低, 且在 T_m 值下降速度最快 (见图 8), 将温度与荧光强度的变化求导, 即得到单峰的融解曲线 (见图 9)。

融解曲线不但可以评价反应特异性, 同时还可作为引物与模板匹配程度, 引物设计评价等的参考, 同时还可利用融解曲线进行突变体的检测以及 SNPs 分析等。

2、特异性荧光定量 PCR (以 Taqman、Beacon 和 FRET 为例)

2.1 Taqman 法

Taqman 荧光定量 PCR 技术是以 Taqman 荧光探针为基础, Taqman 荧光探针为一寡核苷

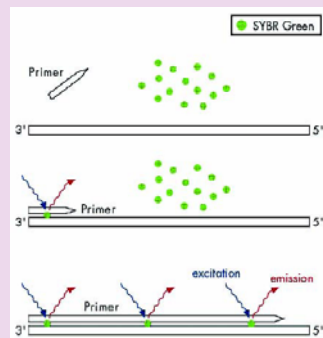


图 7 SYBR Green 工作原理示意图

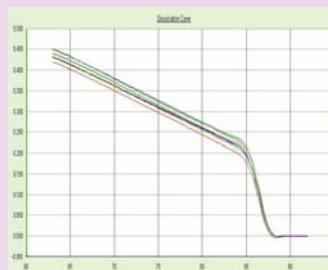


图 8 融解曲线原始图

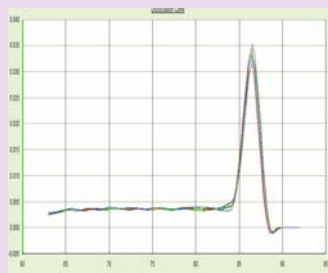


图 9 融解曲线单峰图

酸，两端分别标记一个荧光发射基团和一个荧光淬灭基团。探针完整时，发射基团发射的荧光信号被淬灭基团吸收，检测系统检测不到荧光信号。当 PCR 扩增时，Taq 酶的 5'-3' 外切酶活性将探针酶切降解，使荧光发射基团和荧光淬灭基团分离，从而荧光监测系统可接收到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物的形成完全同步，从而实现定量(见图 10)。常用的荧光基团有 FAM, TET, VIC, HEX 等。

2.2 Beacon 法

分子信标(Beacon)是一种呈发夹结构的茎环双标记寡核苷酸探针，两端的核酸序列互补配对，因此标记在一端的荧光基团与标记在另一端的淬灭基团紧紧靠近。分子信标的茎环结构中，环一般为 15-30 个核苷酸，并与目标序列互补，茎一般为 5-7 个核苷酸，并相互配对形成茎的结构。荧光基团标记在探针的一端，而淬灭基团则标记在另一端。加热变性时，互补配对的茎环双链解开，环序列与模板配对，分子信标将由发卡状变为链状，使得荧光基团与淬灭剂分开(见图 11)。当荧光基团被激发时，因淬灭作用被解除，发出激发光子。由于是酶切作用的存在，分子信标也是积累荧光。常用的荧光基团有 FAM、Texas Red。PCR 扩增程序通常是：变性(94℃)~退火(50-60℃)~延伸(68-72℃)三步法，40-45 个循环。

在分子信标设计时，最佳信标杆的设计是至关重要的，必须能够折叠成正确的结构。荧光基团如不能立即靠近淬灭基团，则会导致高背景信号。

如果信标杆杂交太强则会影响与目标序列的退火。因此，对于每一个分子信标都必须执行热变性步骤以确定他们的溶解特性。

随着循环的进行，背景信号可能会因探针的水解而增加。

2.3 FRET 法

FRET 探针又称双杂交探针，FRET 探针由两条相邻探针组成，在一条探针的 5' 端标记 FAM 荧光基团，另一探针的 3' 端标记 Red 640 荧光基团。当复性时，探针结合在模板上，FAM 基团和 Red640 基团相邻，激发 FAM 产生的荧光，作为 Red640 基团的激发光被吸收，使 Red640 发出 640nm 波长的荧光。当变性时，探针游离，两基团距离远，不能产生

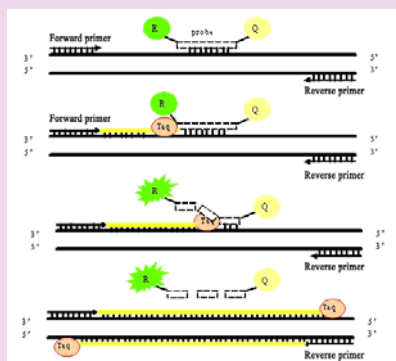


图 10 TaqMan 工作原理示意图

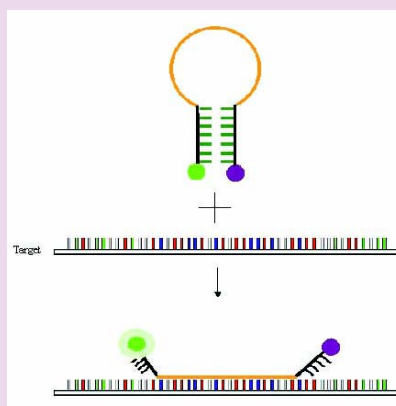


图 11 分子信标工作原理示意图

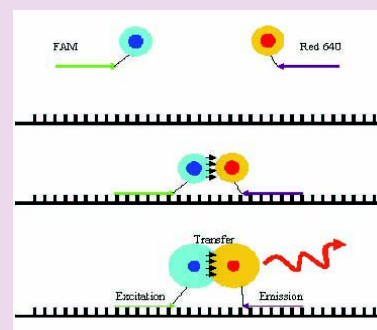


图 12 FRET 工作原理示意图

640nm 波长的荧光。由于 FRET 探针是靠近发光，所以检测信号是实时信号，非累积信号。常用的荧光基团有 LC-Red640，LC-Red705。

3、荧光定量方法比较

能用于实时荧光 PCR 定量的方法很多，各有优缺点，应根据实验的需要和当前的实验条件选择适合自己的方法。

| | SYBR Green | FRET 探针 | Taqman 探针 | 分子信标 |
|------|---------------------|----------|-----------|-------|
| 性质 | 可逆荧光 | 可逆荧光 | 积累荧光 | 积累荧光 |
| 融点分析 | 能 | 能 | 不能 | 不能 |
| 特异性 | 引物（非特异性扩增或引物二聚体有影响） | 引物+2 个探针 | 引物+探针 | 引物+探针 |
| 探针 | 不需要 | 需要 | 需要 | 需要 |
| 通用性 | 通用 | 专用 | 专用 | 专用 |

第三节、荧光定量引物及探针设计原则

1、总体原则

- ◆ 先选择好探针，然后设计引物使其尽可能的靠近探针。
- ◆ 所选序列应该高特异，尽量选择具有最小二级结构的扩增片段（二级结构会影响扩增效率，还会阻碍酶的扩增）。建议先进行二级结构检测，如不能避免二级结构，那么就要相应提高退火温度。
- ◆ 扩增片段长度不应超过 400bp，理想的最好在 100-150bp 内，扩增片段越短，有效扩增反应越容易实现，较短的扩增片段也可以保证分析的一致性。
- ◆ 保持 GC 含量在 20%-80%之间，GC 含量高，容易产生非特异扩增，从而导致目标片段扩增效率降低，以及出现非特异信号。
- ◆ 为保证扩增效率和重复性，应避免重复的核苷酸序列，尤其是 4 个 G 以上的连续。
- ◆ 将引物和探针进行配对检测，以避免二聚体和发夹结构的形成。

2、引物设计原则

- ◆ 引物与模板的序列要紧密互补。为了能够扩增出所需要的保守片段，必须对保守的 100-200bp 片段进行 PCR 扩增。所以引物的选取也要非常的保守，最好不要有不同的碱基，若不得不有时，也必须保证引物的 3' 端至少有 4 个碱基是完全保守才可。
- ◆ 在设计保守引物时，要在发表序列上分别找保守一致的区域，即在发表序列的 5' 端引物位置找的是 3' 端至少有 5 个 bp 保守，在发表序列的 3' 端引物位置找的是 5' 端至少有 5 个 bp 保守。

- ◆ 上下游引物的长度一般为 18-25bp 之间，且 T_m 值在 58-60°C 之间，并确保两条引物的 T_m 值尽量接近。确保引物中 GC 含量在 30-80%。应避免引物中多个重复的碱基出现，尤其是要避免 4 个或超过 4 个的 G 碱基出现。引物的 3' 端最好为 T, C, G, 不为 A。引物 3' 端的 5 个碱基不应出现 2 个 G 或 / 和 C。
- ◆ 上游引物应标记 F(forward)以及在基因组的位置及长度；下游引物应标记 R(reverse)以及在基因组的位置及长度。用 oligo 或 primer preierner 软件即可计算 T_m 值。上下游引物的 T_m 值相差最好不超过 2°C，长度相差最好不超过 4bp。
- ◆ 引物与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构。引物不能在模板的非目的位点引发 DNA 聚合反应(即错配)。为避免基因组的扩增，引物设计最好能跨两个外显子。

3、探针设计原则

- ◆ 探针序列的选择要保守，必须找一段 100-200bp 相对要保守的片段来设计探针。即 real-time PCR 的扩增片段是 50bp-150bp。当找不到 150bp 的保守片段时，必须确保探针的片段是保守的。
- ◆ 在设计探针时，要考虑在两条链中的一条上设计探针。但要注意的是：在哪条链上设计探针时，就应靠近在同一条链上设计的引物。这样，可保证在扩增时，即便没有完全扩增，也有荧光信号报告出来。两者的距离最好是探针的 5' 端离上游引物的 3' 有一个碱基。
- ◆ 若在原序列中找不到合适的探针时(①主要是探针和上游引物的距离太远，而离下游引物的距离却较近时；②突变位点要求在探针的 5' 端也能检测到荧光信号，但却是在 3' 端)，可在互补的序列中设计探针。
- ◆ 探针位置尽可能地靠近上游引物。探针长度通常在 20-30bp， T_m 值为 65-70°C，通常比引物高 5-10°C，GC 含量为 40%-70%。整条探针中，碱基 C 的含量要明显高于 G 的含量。
- ◆ 探针的 5' 端应避免使用碱基 G(因为 5' 端有 G 可能会淬灭荧光剂)。为确保引物探针的特异性，最好将设计好的序列在 Blast 中核实一次，如果发现有非特异性互补区，建议重新设计探针。
- ◆ 合成好的探针，最好用双蒸水稀释成 25pmol/ul 的浓度，然后于 -20°C 避光保存。如果是配成 25pmol/ul 的浓度，那么所加水的量是 (ul)：(OD 值 × 33) / 分子量 × 40000。

第四节、荧光定量 PCR 的应用

运用荧光定量 PCR 技术，我们可以对 DNA、RNA 样品进行定量和定性分析。定量分析包括绝对定量分析和相对定量分析。前者可以得到某个样本中基因的拷贝数和浓度；后者可以对不同方式处理的两个样本中的基因表达水平进行比较。除此之外我们还可以对 PCR 产物或样品进行定性分析：例如利用融解曲线分析识别扩增产物和引物二聚体，以区分非特异扩增；利用特异性探针进行基因型分析及 SNP 检测等。目前实时荧光 PCR 技术已经被广泛应用于基础科学研究、临床诊断、疾病研究及药物研发等领域。其中最主要的应用集中在以下几个层次：

1、临床、食品及环境应用

临床方面的应用主要包括病原微生物检测、病原体检测、基因病诊断、传染病检测和病变检测等。此外在食品检测、环境检测和 RNAi 基因失活率的检测等方面也有广泛应用。在这些领域内，定量 PCR 比传统 PCR 具有更高的灵敏度，而且耗时少，且可以从活的或死的病原菌中检测到定量核酸，从而体现了定量 PCR 灵敏度高，特异性强，无污染和准确性等特点。

2、分子生物学应用

在分子生物学上定量 PCR 的应用相当广泛，包括基因转录检测（同一基因在不同组织的表达差异，例如比较经过不同处理样本之间特定基因的表达差异，如药物处理、物理处理、化学处理等），特定基因在不同时期的表达差异等，利用定量 PCR 测定产物并进行融解曲线分析的方法对已知 cDNA 芯片的差显技术的结果进行确认。

3、遗传学，SNP 分析及深入应用

用不同的荧光报告基团标记的探针分别与野生型和突变基因杂交。杂交探针的效率和其后的切除与杂交有关。如果一种染料的信号明显高于另一种则说明它是纯合子，如果两种荧光信号都增加则表明是一个杂合子。

甲基化分析：GC 岛内胞嘧啶的甲基化形成 5'-甲基化胞嘧啶被认为和许多人类疾病特别是癌症有关，可以利用 Methylight 对其进行分析，此技术基于 Taqman 探针法，在扩增前处理 DNA，使得未甲基化的胞嘧啶变为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不受影响，然后用特异性的引物和探针来区分甲基化和非甲基化的 DNA。

SNP 分析：SNPs 即单核苷酸多态性，人类最常见的可遗传变异占据所有已知多态性的 90% 以上，SNP 分析从根本上来说是确定一对染色体的每种基因的两个拷贝，哪种突变在两个拷贝中存在，因此利用定量 PCR 可以快速灵敏的检测 SNP 结果。

第二篇 RNA 提取、RT-PCR、荧光定量实践部分

第一章 不同样品 RNA 提取实验操作

注意：RNA 提取总体原则

- 有效破碎样品细胞或组织
- 有效地将 RNA 从 DNA 和蛋白混合物中分离
- 有效抑制内源 RNA 酶活性
- 有效去除体系中杂质

第一节、RNA 提取方案

1、RNAprep pure 法提取总 RNA

1.1 实验准备

- 适用材料：动物组织、细菌、植物、真菌、培养细胞、血液、病毒材料等
- 仪器：恒温水浴锅、高速离心机、移液器
- 自备试剂：无水乙醇、 β -巯基乙醇
- 试剂盒内容：

| 目录号 | 产品名称 | 试剂盒内容 | |
|-------|--------------------------------------|------------------------|-------------------------------|
| DP431 | RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒 | 裂解液 RL | RNase-free ddH ₂ O |
| DP432 | RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒 | 去蛋白液 RW1 | 漂洗液 RW |
| | | RNase-free 离心管 | RNase-free 收集管 |
| DP430 | RNAprep pure 培养细胞 / 细菌总 RNA 提取试剂盒 | RNase-free 吸附柱 CR* | DNase I (1500u) |
| | | 蛋白酶 K/ 研磨杆(DP431 配备) | |
| DP433 | RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒 | RNase-free 过滤柱 CS | |
| | | (DP432、DP430、DP433 配备) | |
| DP420 | RNAprep pure 微量样本总 RNA 提取试剂盒 | 10 × 红细胞裂解液(DP433 配备) | |
| | | Carrier RNA(DP420 配备) | |

* 以上吸附柱统称 CR，其中 DP433 采用 CR2，DP420 采用 CR1，其余为 CR3

- 操作前注意事项：
 - 1) 操作前在 RL 中加入 β -巯基乙醇至终浓度 1%，如 1 ml RL 中加入 10 μ l β -巯基乙醇。此裂解液最好现用现配。配好的 RL 4℃ 可放置一个月，裂解液 RL 在储存时可能会形成沉淀，如果有沉淀出现，请加热溶解后使用。
 - 2) 第一次使用前应在漂洗液 RW 中加入无水乙醇，加入量请参见瓶上标签。
 - 3) 以下操作如非指明，均在室温下进行。

1.2 操作步骤

简易操作流程如图 1 所示。

样品前处理

■ 动物组织

每 10-30mg 组织加 300ul 裂解液 RL，用研磨杵将组织彻底研磨(如组织较难彻底研磨，可选用电动或玻璃匀浆器)。

■ 细 菌

4℃，12,000 rpm(~13,400)离心 2 分钟收集菌体(收集菌体的最大量不超过 1×10^9)，仔细去除所有培养基上清，以后的所有离心步骤均在室温 (20-25℃) 进行。

注：如果培养基上清去除不完全，将对第二步中的细胞壁消化过程产生抑制。

用含有溶菌酶的 100 ul TE 缓冲液(客户自己配制，配制方法见下表)彻底重悬菌体，孵育时间见下表。

| | TE 缓冲液中的溶菌酶终浓度 | 孵育时间(室温) |
|-------------------|----------------|----------|
| G ⁻ 细菌 | 400 ul/ ml | 3-5 min |
| G ⁺ 细菌 | 3 mg/ ml | 5-10 min |

■ 动物培养细胞

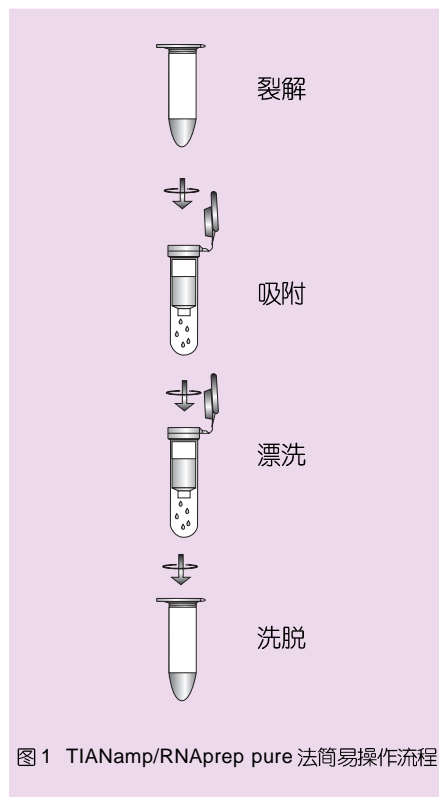
悬浮细胞的收集(收集细胞数量不要超过 1×10^7)：估计细胞数量， $300 \times g$ 离心 5 分钟，将细胞收集到离心管中，吸除所有培养基上清。

单层贴壁细胞的收集(收集细胞数量请不要超过 1×10^7)：可直接在培养容器中裂解(容器直径不超过 10cm)，或者使用胰蛋白酶处理后离心收集细胞沉淀(在摇瓶中培养的单层贴壁细胞通常采用胰蛋白酶处理的方法)。

- 1) 直接裂解法：确定细胞数量，彻底吸除细胞培养基上清，立即进行裂解步骤。
- 2) 胰蛋白酶处理法：确定细胞数量，吸除培养基，用 PBS 洗涤细胞，吸除 PBS，向细胞中加入含有 0.10-0.25% 胰蛋白酶的 PBS 处理细胞，当细胞脱离容器壁时，加入含有血清的培养基失活胰蛋白酶，将细胞溶液转移至 RNase-free 的离心管中， $300 \times g$ 离心 5 分钟，收集细胞沉淀，仔细吸除所有上清。

注意：

收集细胞时一定要将细胞培养液去除干净，否则会导致裂解不完全，影响 RNA 与吸附柱的结合，造成 RNA 的产量降低。



■ 血 液

向 1 体积人类全血中加 5 倍体积 1 × 红细胞裂解液(需自备合适的干净管子)。

注意：

为获得最佳的混匀效果，血液和 1 × 红细胞裂解液的混合液体积不应超过管子体积的 3/4。如果血液中的白细胞含量较高，可按比例减小血液的使用体积，裂解步骤中的裂解液 RL 的使用体积也要进行相应调整。

在冰上孵育 10-15 分钟，在孵育过程中涡旋振荡混匀 2 次。

注意：

在孵育的过程中溶液将变成半透明状态，表明红细胞裂解。如果必要的话，孵育时间可延长至 20 分钟。

4℃ 2,100rpm (~400 × g)离心 10 分钟，将上清完全去除。

注意：

离心后白细胞可能会形成小球，确保完全去除上清，痕量红细胞的存在，会使白细胞小球呈现红色，而该现象会在随后的漂洗步骤中消失。

向白细胞沉淀中加入 1 × 红细胞裂解液(加入 1 × 红细胞裂解液的体积是第 1 步中全血用量的 2 倍)，重悬细胞。

■ 植物组织

取小于 0.1g 的新鲜或冷冻的植物组织，在液氮中研磨。

注意：

研磨时液氮不能挥发干净。液氮的环境中 RNase 的活性受到抑制，一旦液氮挥发干净，植物材料中的内源 RNase 会将 RNA 降解掉。

裂 解

■ 动物组织

向匀浆液中加入 590ul RNase-free ddH₂O 和 10ul 蛋白酶 K，混匀后 56℃处理 10-20 分钟。12,000 rpm(~13,400 × g)离心 2-5 分钟，取上清进行以下操作。

注意：

组织量一定不要超过 20mg，否则将导致 RNA 得率和质量下降。

■ 细 菌

加入 350 ul 裂解液 RL，涡旋振荡混匀，若出现不溶性沉淀，12000 rpm(~13,400 × g)离心 2 分钟，取上清进行一下操作。

■ 动物培养细胞

对于离心得到的细胞沉淀：轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液 RL，旋涡震荡。

| 沉淀细胞数量 | 裂解液 RL (ul) |
|---------------------------------|-------------|
| $<5 \times 10^6$ | 350 |
| $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ | 600 |

对于直接裂解的细胞：裂解液 RL 的加量如下表所示，将细胞裂解液转移至离心管中，涡旋震荡混匀。

| 容器直径 (cm) | 裂解液 RL (ul) |
|-----------|-------------|
| <6 | 350 |
| 6-10 | 600 |

■ 血液：

轻弹离心管底部，使细胞沉淀松散，加入适量裂解液 RL，旋涡震荡。

| 裂解液 RL(ul) | 健康人类全血(ml) | 白细胞数量 |
|------------|------------|-----------------------------------|
| 350 | 多至 0.5 | 多至 2×10^6 |
| 600 | 0.5-1.5 | 2×10^6 至 1×10^7 |

■ 植物组织

50-100mg 植物叶片在液氮中迅速研磨成粉末，加入 450ul RL，涡旋剧烈震荡混匀。

注意 1：

在 56°C 孵育 1-3 分钟将有助于植物组织裂解，但是对于某些富含淀粉的样品，请不要加热处理，防止因淀粉引起的样品膨胀现象。

注意 2：

由于植物多样性非常丰富，而且同种植物的不同生长发育阶段和不同组织的 RNA 含量都不相同，请根据具体实验情况选择合适的植物材料的用量。

吸 附

■ 动物组织

缓慢加入 0.5 倍上清体积无水乙醇（或等体积 70% 乙醇），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR 中（吸附柱放在收集管中）。

■ 其他材料

将所有溶液转移至过滤柱 CS 上（过滤柱 CS 放在收集管中），12,000 rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 2 分钟，收集滤液。

向滤液中加入 1 倍体积 70% 乙醇（通常为 350ul 或 600ul），混匀（此时可能会出现沉淀），得到的溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR 中（吸附柱 CR 放入收集管中），12,000rpm ($\sim 13,400 \times g$) 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CR 放回收集管中。

注意：

配制 70% 乙醇时请使用 RNase-free ddH₂O，如果滤液体积有所损失，请相应减少 70% 乙醇用量。将溶液和沉淀转移至吸附柱 CR 时，如果体积大于吸附柱容量，可以分两次完成。

12,000rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 30-60 秒, 弃掉收集管中的废液, 将吸附柱放回收集管中。

漂 洗

DNase I 储存液的配制: 将 DNase I 干粉 (1500 U) 溶解在 550ul RNase-free ddH₂O 中, 轻柔混匀, 分装后 -20℃ 贮存 (可保存 9 个月)。

注意:

从 -20℃ 融化后的 DNase I 储存液保存于 4℃ (可保存 6 周), 不要再次冻存。

DNase I 工作液的配制: 取 10 ul DNase I 储存液, 加入 70 ul RDD 溶液, 轻柔混匀。

向吸附柱 CR 中加入 350 ul 去蛋白液 RW1, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 30-60 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

向吸附柱 CR 中央加入 80 ul 的 DNase I 工作液, 室温放置 15 分钟。

向吸附柱 CR 中加入 350 ul 去蛋白液 RW1, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 30-60 秒, 弃废液, 将吸附柱放回收集管中。

向吸附柱 CR 中加入 500 ul 漂洗液 RW(使用前请先检查是否已加入乙醇), 室温静置 2 分钟, 12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 30-60 秒, 弃废液, 将吸附柱 CR 放回收集管中。

重复上一步操作。

洗 脱

12,000 rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 2 分钟, 倒掉废液。将吸附柱 CR 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

注意:

此步骤目的是将吸附柱 CR 中残余的漂洗液去除, 漂洗液的残留, 可能会影响后续的 RT 等实验。

将吸附柱 CR 转入一个新的 RNase-free 离心管中, 向吸附膜的中间部位悬空滴加 30-100ul RNase-free ddH₂O, 室温放置 2 分钟, 12,000rpm($\sim 13,400 \times g$)离心 2 分钟, 得到 RNA 溶液。

注意:

洗脱缓冲液体积不应少于 30 ul, 体积过小影响回收效率。RNA 溶液于 -70℃ 保存。

2、TRNzol/TRNzol-A⁺/RNAsimple 法提取总 RNA

2.1 试验准备

- 适用材料：动物组织、植物组织、真菌、培养细胞、血液等
- 仪器：冷冻高速离心机
- 自备试剂：氯仿，异丙醇或无水乙醇，75%乙醇，RNase free ddH₂O，0.05% 焦碳酸二乙酯(DEPC)，DEPC 处理的 Eppendorf 管，无菌手套等
- 试剂盒内容：

| 目录号 | 产品名称 | 试剂盒内容 | |
|-------|----------------------------------|---|--|
| DP405 | TRNzol 总 RNA 提取试剂 | TRNzol | |
| DP421 | TRNzol-A ⁺ 总 RNA 提取试剂 | TRNzol-A ⁺ | |
| DP419 | RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒 | 裂解液 RZ* 漂洗液 RW RNase-free 离心管 RNase-free 吸附柱 CR3 | RNase-free ddH ₂ O 去蛋白液 RD RNase-free 收集管 |

* 裂解液 RZ 成分与 TRNzol-A⁺ 相同

● 操作前注意事项：

- 1) 本试剂有腐蚀性，请勿直接接触皮肤或吞咽；
- 2) 操作时请穿戴实验服、防护镜和手套；
- 3) 如果接触皮肤，应立即用洗涤剂和大量水冲洗。

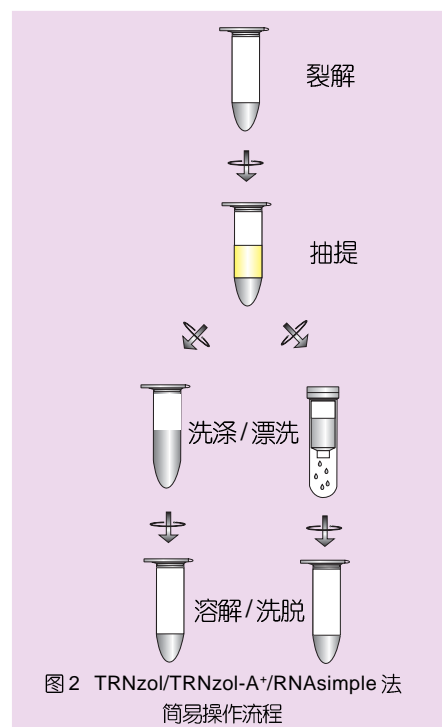
2.2 操作步骤

简易操作流程如图 2 所示。

样品前处理

■ 动物组织

新鲜组织是提取 RNA 极好的材料，离开活体后，立刻在低温状态下迅速分成 1cm³ 左右的小块，每块湿重约 30-100mg 左右，小量提取时一般取 30-100mg 组织，可以直接在液氮中磨碎后加入 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺(DP405/DP421)，也可用匀浆仪在冰上进行匀浆处理，样品体积不应超过 TRNzol/TRNzol-A⁺ 体积的 10%。



1) 富含内源酶的样品

如肝脏，胸腺，胰腺，脾脏等，即使使用电动匀浆器匀浆也不能避免 RNA 的降解。最好的方法是在液氮条件下将组织碾碎，然后再匀浆且匀浆时使用更多裂解液。

2) 不易匀浆的样品

脑，脂肪，肌肉组织等，请直接用液氮研磨，再匀浆。如果是大量提取 RNA，可按 1cm^3 组织与 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺(DP405/DP421)的比例放大整个实验系统。

注意 1：

抽提总 RNA 往往都是需要其 mRNA，而 mRNA 的表达量和细胞或者组织的生长状态息息相关，取组织块应该避免取到坏死组织，尽量取生长旺盛的组织部位；如果是临床标本，请准确挑取目标组织。

注意 2：

在研磨中，边研磨边加液氮，保持样品不融化，保证内源 RNase 不发挥作用。

3) 冷冻样品

新鲜组织取下来，如果没有条件立刻进行 RNA 的提取，快速用手术刀或剪刀切将组织切成 1cm^3 左右，约 30-100mg 左右的小块，1 分内就放入液氮或者 TIANGEN 的 RNAstore 样品储存液(DP408)中。

冷冻组织取出来后，请立刻投入液氮中研磨，样品在与裂解液充分接触前决不能出现融化，所以碾磨用具必须预冷，在碾磨过程中要及时补充液氮。样品碾碎后，在液氮刚刚挥发完时，将

样品迅速转移到含裂解液的容器中，立即混匀匀浆，小量提取时一般取 30-100mg 组织，加入 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺(DP405/DP421)。如果是大量提取 RNA，可每立方厘米组织与 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺(DP405/DP421)的比例放大整个实验系统。

注意：

研磨中需要边研磨边加液氮，使样品不被冻融，冻融过程破坏了细胞内的结构，使内源酶更容易与 RNA 直接接触。

■ 血 液

直接取新鲜的血液，加入 3 倍体积 TRNzol 或 TRNzol-A⁺(推荐 0.25ml 全血加入 0.75ml TRNzol)，充分振荡混匀。

■ 培养细胞

选择细胞处于生长旺盛的时期收集，细胞老化后，RNA 含量较少。

1) 单层贴壁培养细胞

倒掉培养基后，直接在培养板中加入 TRNzol/TRNzol-A⁺ 裂解细胞，每 10cm^2 面积加 1ml，细胞会迅速裂解。

2) 悬浮培养细胞

迅速离心细胞。每 5×10^6 - 10^7 动物细胞加 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺。加 TRNzol/TRNzol-A⁺ 前不要洗涤细胞，以免降解 mRNA，用取样器抽打几次，使细胞充分裂解。

注意：

离心收集细胞后，留约 50ul 上清，将细胞悬浮后再加入 TRNzol/TRNzol-A⁺，以防止 TRNzol/TRNzol-A⁺ 再瞬间裂解表面的细胞，导致无法完全裂解里面的细胞。

■ 酵 母

酵母中 RNA 含量丰富，但是由于酵母外被一层较厚的细胞壁，给酵母 RNA 提取带来一些不便，因此，去除这层细胞壁就成为酵母 RNA 的提取的首要问题。目前，酵母破壁的方法主要有以下两种：

1) 酶解法

(1) 破壁酶(lyticase)液配制：

1M 山梨醇

0.1M EDTA, pH 7.4

使用前加入：

0.1% β -mercaptoethanol

50U lyticase/ 1×10^7 cells

(2) 处理方法：收集不多于 2×10^7 的酵母培养细胞，4℃ 1000rpm 离心 5 分钟集菌，除净培养基。加入 100ul 新鲜配制的破壁酶(lyticase)液，30℃ 孵育 10-30 分钟 300rpm 离心 5 分钟收集酵母原生质体。轻柔地除净上清，加入 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺。

注意：

根据菌株的不同，孵育的时间和破壁酶液中 lyticase 的加入量要适当调整。Lyticase 处理过程中，动作要轻柔，以免破坏酵母细胞原生质体。

2) 玻璃珠法

(1) 玻璃珠的准备：准备直径 0.45-0.55mm 的玻璃珠，在浓硝酸中浸泡 1 小时，用 DEPC 处理过的离子水冲洗干净，烘干。

(2) 处理方法：在 1.5ml Eppendorf 管中收集不多于 5×10^7 的酵母培养细胞，4℃ 1000rpm 离心 5 分钟集菌，除净培养基。轻弹管壁使细胞松散，加入 500ul TRNzol/TRNzol-A⁺，重悬菌体。加入 300ul 酸洗玻璃珠。以最大的速度涡旋振荡，在振荡过程中需要不断将 Eppendorf 管放在冰上冷却直到细胞被彻底破碎。12000rpm 离心 2 分钟，取上清。

注意：

涡旋振荡的时间、频率以及冷却时间都需要根据菌株进行调整。

裂 解

将处理好的材料与 TRNzol/TRNzol-A⁺ 充分混匀，15-30℃ 放置 5 分钟

注意：

材料的量与所加入的 TRNzol/TRNzol-A⁺ 的量要相对应。植物材料小于 0.1g 时，加入 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺，如果植物材料增多，TRNzol/TRNzol-A⁺ 的量也应该适当加大，以保证细胞裂解的效果。

可选步骤：12000rpm 离心 5 分钟，取上清，转入一个新的无 RNase 的离心管。如果样品中含有较多蛋白、脂肪、多糖或肌肉部分等，可加此步骤离心去除。离心得到的沉淀中包括细胞外膜、多糖、高分子量 DNA，上清中含有 RNA。

纯 化

4℃ 12,000 rpm 离心 10 分钟，取上清。转移到新的无 RNase 的离心管中。每使用 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺ 加 0.2 ml 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡 15 秒，室温放置 3 分钟。

注意：

要使氯仿与上清液充分混匀。如不能旋涡混匀，可手动颠倒混匀 2 分钟代替。

分 层

4℃ 12,000rpm 离心 10-15 分钟。样品会分成三层：黄色的有机相，中间层和上层无色的水相，RNA 主要在水相中，把水相（约 600ul）转移到新管中。

注意：

在吸取上层水相时，一定要注意不要吸到中间层和最下层的有机相，也不要试图将所有的水相都吸出，以避免 DNA 或其它杂质的污染。

下游实验操作，不同的试剂选择的方法不同：

方法 1（适用于 TRNzol 和 TRNzol-A⁺）

沉 淀

在得到的水相溶液中加入等体积异丙醇，混匀，室温放置 20-30 分钟。4℃ 12,000rpm 离心 10 分钟，去上清。

注意：

异丙醇应该是新开封的，或者是实验室 RNA 提取专用的。

洗 涤

加入 1 ml 75% 乙醇洗涤沉淀。每使用 1ml TRNzol/TRNzol-A⁺ 至少 1ml 75% 乙醇洗涤。将 75% 乙醇吸弃，室温放置晾干或超净台中吹干 5 分钟左右。

注意：

75% 乙醇要用 DEPC 处理过的水配制。洗涤的要充分，要将沉淀悬起洗涤，然后再次离心沉淀。残留乙醇一定要去除干净，离心管壁上的乙醇可快速离心到管底，用小枪头吸弃，然后再晾干。溶解沉淀的水需要用 DEPC 处理。

溶 解

加入适量 RNase-free ddH₂O，混匀，使 RNA 充分溶解。

方法 2 (适用于 RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒)

吸 附

将上清层缓慢加入 0.5 倍体积无水乙醇，混匀（此时可能会出现沉淀）。将得到溶液和沉淀一起转入吸附柱 CR3 中，4℃ 12,000 rpm (~13,400 × g)离心 30 秒，若一次不能将全部溶液和混合物加入吸附柱 CR3，请分两次转入吸附柱 CR3 中，4℃ 12,000 rpm (~13,400 × g)离心 30 秒，弃掉收集管中的废液。

漂 洗

- 1) 向吸附柱 CR3 中加入 0.5 ml 去蛋白液 RD（使用前请先检查是否已加入乙醇），4℃ 12,000 rpm (~13,400 × g)离心 30 秒，弃废液。
- 2) 向吸附柱 CR3 中加入 0.7 ml 漂洗液 RW（请先检查是否已加入乙醇），室温静置 2 分钟，4℃ 12,000 rpm (~13,400 × g)离心 30 秒，弃废液。
- 3) 向吸附柱 CR3 中加入 0.5 ml 漂洗液 RW，室温静置 2 分钟，4℃ 12,000 rpm (~13,400 × g)离心 30 秒，去除残余液体。
- 4) 将吸附柱放入 2ml 收集管中，4℃ 12,000rpm (~13,400 × g)离心 2 分钟，去除残余液体。

注意：

此步骤目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，离心后将吸附柱 CR 在室温放置片刻，或置于超净工作台上通风片刻，以充分晾干。如果有漂洗液残留，可能会影响后续的 RT 等实验操作。

洗 脱

将吸附柱 CR3 转入一个新的离心管中，加 30-100ul RNase-free ddH₂O，室温放置 2 分钟，4℃ 12,000 rpm (~13,400 × g)离心 2 分钟。

洗脱缓冲液体积不应少于 30ul，体积过小影响回收效率。RNA 应保存在 -70℃，以防降解。

注意：

如果想提高 RNA 得率，可重复上步操作一次，合并两次得到的溶液。

第二节、RNA 提取常见问题分析

Q-1: RNA 降解

- A1: **新鲜细胞**: 如果试剂没有问题, 外源性污染也可以排除, 降解是来自裂解液的用量不足。如果将裂解液直接加入培养皿中裂解细胞的话, 一定要使裂解液能盖住细胞。
- A2: **新鲜组织**: 某些富含内源酶的样品 (如肝脏, 胸腺等), 即使使用电动匀浆器匀浆也不能避免 RNA 的降解。更可靠的方法是: 在液氮条件下将组织碾碎, 并且匀浆时使用更多裂解液。这些样品使用玻璃匀浆器匀浆更不可靠。
- A3: **冷冻样品**: 样品取材后应立即置于液氮中速冻, 然后可以移至 -70°C 冰箱保存。样品不能不经液氮速冻而直接保存于 -70°C 冰箱中。即使是冷冻细胞, 如果不在液氮条件下碾磨碎, 而直接加入裂解液中匀浆, RNA 比新鲜样品更容易降解, 碾磨必须预冷, 以保证样品在与裂解液充分接触前不融化, 在碾磨过程中要及时补充液氮。样品碾碎后, 在液氮刚刚挥发完时, 将样品迅速转移到含裂解液的容器中, 立即混匀匀浆。
- A4: **外源 RNA 的污染**: 试剂, 器械及实验环境中的 RNA 酶进入实验系统。
- A5: **内源 RNA 的污染**: 抑制剂失效或者不够, 实验样品过多; 匀浆时温度过高。

Q-2: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值低

- A1: **蛋白质污染**: 确保不要吸入中间层及有机相。减少起始样品量, 确保裂解完全、彻底。加入氯仿后首先要充分混匀, 并且离心分层的离心力和时间要足够。
- A2: **苯酚残留**: 确保不要吸入中间层及有机相。加入氯仿后首先要充分混匀, 并且离心分层的离心力和时间要足够。解决办法是再沉淀一次后, 溶解。
- A3: **多糖或多酚的残留**: 一些植物和特殊的组织中多糖和多酚含量较多, 有残留。
- A4: **设备限制**: 测定 OD_{260} 及 OD_{280} 数值时, 要使 OD_{260} 读数在 0.1-0.5 之间。此范围线性最好。

Q-3: $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{230}$ 比值低

- A1: **抽提试剂残留**: 确保洗涤时要彻底悬浮 RNA, 并且彻底去掉 75% 乙醇。解决办法是再沉淀一次后, 溶解。
- A2: **组织内杂质残留**: 一般为多糖类杂质。解决办法是改用其它办法, 如 LiCl 沉淀。
- A3: **设备限制**: 测定 OD_{260} 及 OD_{230} 数值时, 要使 OD_{260} 读数在 0.1-0.5 之间。此范围线性最好。

Q-4: RNA 量少

- A1: 该组织或者细胞中 RNA 含量偏低, 不同细胞和组织中 RNA 的丰度不同, 如肝脏, 胰腺, 心脏等是高丰度 (2-4ug/mg) 组织, 脑, 胚胎, 肾脏, 肺, 胸腺, 卵巢等是中丰度 (0.05-2ug/mg) 组织, 膀胱, 骨, 脂肪等是低丰度 ($<0.05\text{ug/mg}$) 组织。
- A2: 细胞或者组织状态中 RNA 含量很高, 可能由于组织起始量太少或者太多, 一般样品的量超过裂解液的裂解能力时, 裂解不完全, 容易导致样品量多, 而 RNA 得率低。

第二章 RT-PCR 实验操作

注意：提高 RT – PCR 特异性及灵敏度的关键点

- 分离高质量 RNA
- 使用无 RNaseH 活性的逆转录酶
- 提高逆转录酶保温温度或使用 Quant 等高效反转录酶
- 减少基因组 DNA 污染

第一节、RT-PCR 实验流程

1、材料准备

- 仪器：PCR 仪、高速离心机、紫外分光光度计、移液器、电泳仪、电泳槽
- 实验材料：10ng-5ug total RNA
- 试剂盒内容：

| 目录号 | 产品名称 | 试剂盒内容 | |
|-------|-----------------------------|---|---|
| ER103 | Quant Reverse Transcriptase | Quant RT | 第一链试剂盒配备： RNase-free ddH ₂ O oligo(dT) ₁₅ Random dNTP |
| KR103 | Quant cDNA 第一链合成试剂盒 | 10 × RT Buffer | |
| ER104 | TIANScrip M-MLV | TIANScrip M-MLV | |
| KR104 | TIANScrip cDNA 第一链合成试剂盒 | First-Strand Buffer | |
| KR113 | Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒 | Quant RTase (for one step) 10 × RT-PCR Buffer 5 × RT-PCR enhancer RNasin | dNTP Mixture RNase-free ddH ₂ O Hotmaster Taq polymerase |

- 操作前注意事项：
 - 1) 用于 cDNA 合成反应的溶液试剂尽可能用 DEPC 进行处理，并在高压灭菌后使用。有些试剂不能高压灭菌时，首先用经过灭菌的器具、水等配制溶液后，再将溶液进行过滤除菌处理。
 - 2) RNA 样品要避免基因组 DNA 污染。
 - 3) 避免多次反复冻融 RNA。
 - 4) 试剂盒的各组成成分应在 -20℃ 保存。
 - 5) cDNA 产物应置于 -20℃ 保存。

2、操作步骤

2.1 二步法 RT-PCR

2.1.1 二步法 RT 反应

方案一：Quant cDNA 第一链合成

1) 将模板 RNA 在冰上解冻；引物、10 × RT mix（其中包含 RNasin 和 DTT）、dNTP 混合液、RNase-free ddH₂O 在室温(15-25℃)解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体。

2) 按照表 1 的逆转录体系配制混合液，彻底混匀，涡旋振荡时间不超过 5s，简短离心，并置于冰上。

3) 如果要做多个逆转录反应，可以将配制好的混合液分装在单个反应管中，置于冰上。

4) 将模板 RNA 加入到混合液中，彻底混匀，涡旋振荡时间不超过 5s，简短离心以收集管壁残留的液体。

5) 37℃ 孵育 60 分钟。

| 内容 | 体积 | | 终浓度 |
|--|-------|--------|------------------|
| 10 × RT mix | 2 ul | 1 ul | 1 × |
| dNTP 混合液 (2.5mM each) | 2 ul | 1 ul | 0.25mM each dNTP |
| Oligo-dT ₁₅ 或 Random (10uM) * | 2 ul | 1 ul | 1uM |
| Quant Reverse Transcriptase | 1 ul | 0.5 ul | (20ul 反应体系) |
| RNase-free 水 | X ul | X ul | |
| 模板 RNA，在第 4 步加入 | X ul | X ul | |
| 总体积 | 20 ul | 10 ul | |

方案二：TIANscript M-MLV

1) 在冰浴的无核酸酶的离心管中加入如下反应混合物：

1-5 ug 总 RNA 或 50-500ng mRNA；

2 ul oligo (dT)₁₅ 或 2ul Random 或 2 pmole 基因特异引物；

2 ul dNTP (2.5 mM each)；

补 RNase-free ddH₂O 定容至 13.5ul。

2) 70℃ 加热 5 分钟后迅速在冰上冷却 2 分钟。简短离心收集反应液后加入以下各组分：

4 ul 5 × First-Strand Buffer；

1 ul 0.1 M DTT；

0.5 ul RNasin。

3) 加 1 ul(200U)TIANScript M-MLV，轻轻用移液器混匀。如果用随机引物，请将离心管置 25℃ 温浴 10 分钟。

4) 42℃ 温浴 50 分钟。

5) 95℃ 加热 5 分钟终止反应，置冰上进行后续实验或冷冻保存。

如果需要用 RNase H 处理，进行步骤 6。否则，进行步骤 7。

- 6) 加 RNase H 1 ul (2U), 37°C 温浴 20 分钟以降解 RNA。然后 95°C 加热 5 分钟使酶失活。
- 7) 用 RNase-free ddH₂O 将反应体系稀释到 50ul, 取 2-5ul 进行 PCR 扩增反应。

2.1.2 二步法 PCR 反应

反应体系:

以 RT 体系为模板, 配制 20ul 反应, 体系按照下表加入各组分。

反应条件:

按照下表设置 PCR 条件。

2.1.3 电泳检测

2%琼脂糖, 5v/cm, 15-20min, 上样 6ul, 同时上样 6ul Marker I 参照(见图 2)。

| 反应成分 | 用量 |
|--------------------|---------------|
| Taq PCR Master Mix | 10 ul |
| 上游引物 | 0.5-1ul(10uM) |
| 下游引物 | 0.5-1ul(10uM) |
| cDNA 模版 | 2 ul |
| ddH ₂ O | 6-7 ul |

PCR 反应体系

| 反应过程 | 温度 | 时间 |
|------|------|-------|
| 预变性 | 95°C | 2min |
| 变性 | 94°C | 15sec |
| 退火 | 55°C | 15sec |
| 延伸 | 72°C | 15sec |
| 延伸 | 72°C | 2min |

PCR 反应条件

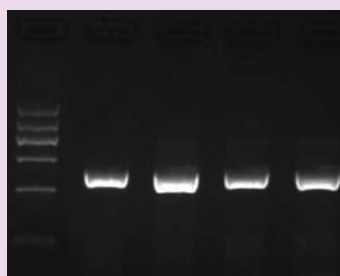


图 2 应用 Quant RT 第一链合成试剂盒及 Taq PCR MasterMix 扩增 jun 基因 (252bp), Marker I 作为参照

2. 2 一步法 RT-PCR

方案: 使用 Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒

1) 经实验证明: 针对复杂模板低丰度的基因, 50ul 体系加入终浓度为 0.5uM oligo dT 能够适当提高扩增效率; 针对某些复杂模板或高 GC 含量低丰度的基因片段的扩增可以通过调整反转录温度来达到很好的扩增效果。

2) Quant RTase、RNasin 和 Hotmaster Taq 聚合酶在取用之前应短暂离心收集溶液后再吸取, 吸取时动作要慢, 使用后应尽快放回 -20°C。dNTP 应避免反复冻融以免失效。

3) 本试剂盒必须使用特异性引物, 引物的选择可根据具体实验来选择。引物设计的好坏直接影响到 RT-PCR 反应的结果, 设计引物时需考虑 GC 含量, 引物长度, 引物位置等因素, 建议采用专业的引物设计软件来设计。

4) 为避免非特异扩增,一步法反应液的配制应始终在冰浴中进行,待 PCR 仪器温度达 50℃时再将反应管放到仪器中。

5) 完全融化模板 RNA, 特异性引物, dNTP mix, 10 × RT-PCR Buffer, RNase-free H₂O 和 5 × RT-PCR enhancer, 短暂离心后置于冰浴上。

6) 按下表在冰浴条件下配制反应液:

| 反应成分 | 体积 / 反应 |
|-----------------------------------|--------------------|
| 10 × RT Buffer | 5 ul |
| dNTP Mixture(10mM each) | 2 ul |
| 5 × RT-PCR enhancer | 10 ul |
| RNasin (40U/ul) | 0.5 ul |
| Hotmaster Taq polymerase(2.5U/ul) | 2.5 ul |
| Quant RTase(for one step) | 0.5 ul |
| 上游特异性引物 (10uM) | 3 ul |
| 下游特异性引物 (10uM) | 3 ul |
| RNA 模板 | 10ng-1ug total RNA |
| RNase-free H ₂ O | 补水至 50ul |
| 总体系 | 50ul |

注意:

当同时需要进行多次 RT-PCR 反应时, 将各组分加倍混合后再分装到每个反应管中, 可以减少实验操作产生的误差, 使所取的试剂体积更准确, 减少试剂损失。

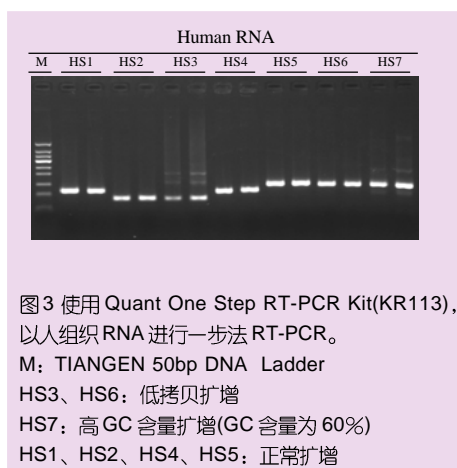
7) 启动 PCR 仪器直到温度上升至 50℃时, 将反应管放入 PCR 仪器中。

8) 按下表设置 PCR 反应条件:

| 步骤 | 反应 | 时间 | 温度 |
|----|---------------------|-----------|--------|
| 1 | 反转录反应 | 30 min | 50℃ |
| 2 | PCR 初始变性 | 2 min | 94℃ |
| 3 | 变性 | 0.5-1 min | 94℃ |
| 4 | 退火 | 0.5-1 min | 50-60℃ |
| 5 | 延伸 | 0.5-2 min | 65℃ |
| 6 | 从 3-5 步进行 30-40 个循环 | | |
| 7 | 最终延伸 | 30 min | 65℃ |

9) 电泳检测

2%琼脂糖, 5v/cm, 15-20min, 上样 6ul, 同时上样 6ul MarkerI 参照(见图 3)。



第二节、RT – PCR 常见问题分析

Q-1：少量或没有 RT-PCR 产物

- A1: RNA 被降解, 分离无污染、高质量的 RNA: 提取 RNA 的材料要尽量新鲜, 防止 RNA 降解; RT 反应前, 在变性胶上分析 RNA 的完整性。RNA 提取后, 应储存在 100% 甲酰胺中, 如果使用 RNase 抑制剂, 加热时小于 45°C; pH 小于 8.0, 否则抑制剂会释放所有结合的 RNase。而且, 在 $\geq 0.8\text{mM}$ DTT 时加入 RNase 抑制剂, 一定要存在 DTT。
- A2: RNA 中包含逆转录反应的抑制剂: 逆转录抑制剂包括 SDS, EDTA, 甘油, 焦磷酸钠, 亚精胺, 甲酰胺和胍盐等。将对照 RNA 和样品混合, 与对照 RNA 反应比较产量, 以检验是否有抑制剂。通过 70% (v/v) 乙醇对 RNA 沉淀进行清洗, 除去抑制剂。
- A3: 用于合成 cDNA 第一链合成的引物退火不充分: 确定退火温度适合实验中所用的引物。对于随机六聚体, 建议在反应温度保温之前先在 25°C 保温 10 分钟。对于基因特异性引物 (GSP), 可以试一下其他 GSP, 或换用 oligo(dT) 或随机六聚体确定 GSP 是反义序列。A4 起始 RNA 量较少: 增加 RNA 量, 对于小于 50ng 的 RNA 样品, 可以在第一链 cDNA 和车工中使用 0.1-0.5ug 的乙酰 BSA。
- A4: 目的序列在分析的组织中不表达: 尝试其他组织。
- A5: PCR 反应失败: 两步法 RT-PCR, 在 PCR 步骤中的 cDNA 模板不能超过反应体积的 1/5。

Q-2：产物有非特异性条带

- A1: 引物和模板的非特异性退火: 避免引物 3' 端含有 2 到 3 个 dG 或 dC。在第一链合成中使用基因特异性引物, 而不是随机引物或 oligo dT。在开始几个循环使用较高的退火温度, 然后使用较低的退火温度。使用热启动 Taq DNA 酶进行 PCR, 提高反应的特异性。
- A2: 基因特异性引物设计较差: 遵循用于扩增引物设计的同样原则。
- A3: RNA 中有基因组 DNA 的污染: 使用扩增级 DNase I 处理 RNA。设置没有逆转录的对照反应检测 DNA 污染。
- A4: 形成引物二聚体: 设计在 3' 端没有互补序列的引物。
- A5: 镁离子浓度太高: 对于每一个模板和引物组合优化镁离子浓度。
- A6: 沾染外源 DNA: 使用抗气雾剂的吸头和 UDG 酶。

Q-3：产生弥散(smear)条带

- A1: 第一链产物的含量过高: 常规 PCR 反应步骤中减少第一链产物的量。
- A2: PCR 反应中引物过多: 减少引物的用量。
- A3: 循环数过多或退火温度过低: 优化 PCR 反应条件, 减少 PCR 的循环次数, 提高退火温度防止非特异性的起始和延伸。
- A4: DNase 降解 DNA 是产生的寡核苷酸片段产生的非特异性扩增: 提取高质量 RNA, 防止被 DNA 污染。

第三章 荧光定量 PCR 实验操作

第一节、应用 SYBR Green 法进行绝对定量分析

1、材料与方法

1.1 标准质粒的建立流程(见图 1)

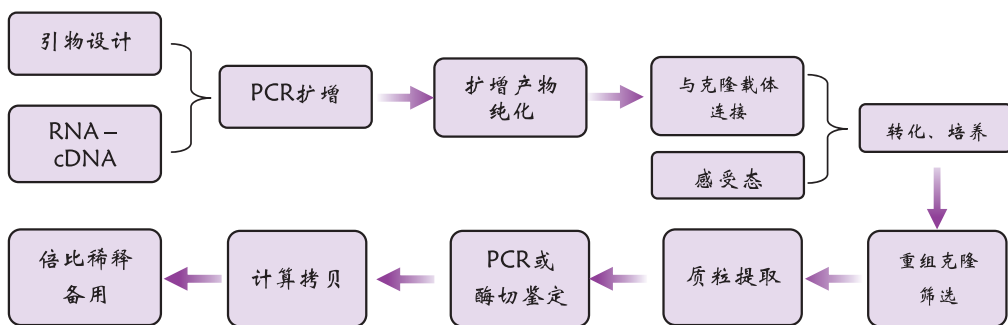


图 1 标准质粒的建立流程

1.2 拷贝数的计算

待测样本浓度 (ng/ul) = $OD_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数}$

样本分子量 = 碱基数 $\times 324$

待测样本拷贝数 (copies/ul) = 待测样本浓度 / 样本分子量 $\times 6 \times 10^{14}$

1.3 标准品与待测样品的准备

将计算好拷贝数的含 Jun 基因的标准品质粒做系列浓度稀释, 分别含有 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 拷贝, 使用 RealMasterMix(SYBR Green)建立 20ul 反应体系, 3 次重复;

取 2ul 待测样品(约 50-100ng)逆转录产物建立 20ul 反应体系, 每个样品 3 个重复。

1.4 荧光定量 PCR 反应体系及反应程序设置(见下表)

| 组成成分 | 20ul 体系 |
|----------------------------|---------|
| 2.5 \times realMasterMix | 9ul |
| 20 \times SYBR solution | |
| 正向引物(10uM) | 0.5ul |
| 反向引物(10uM) | 0.5ul |
| cDNA 模板 | 2ul |
| ddH ₂ O | 至 20ul |

| 反应过程 | 温度 | 时间 | |
|-----------|--------|-------|-------|
| 预变性 | 95℃ | 2min | |
| 变性 | 94℃ | 15sec | 40 循环 |
| 退火 | 55℃ | 15sec | |
| 延伸 (收集荧光) | 68℃ | 31sec | |
| 融解曲线制备 | 65-95℃ | | |

1.6 荧光定量 PCR 仪器操作流程

目前市面上的荧光定量仪器种类繁多，操作软件也各有不同，但基本的设置都是相同的。一般包括以下几个方面：

- 1) 选择定量实验类型：如绝对定量，相对定量，校对等。
- 2) 选择荧光基团：常用荧光基团有 FAM，TET，VIC，HEX 等(见右表)。
- 3) 编辑样本：包括标准品，未知样本，阴阳性对照的设置，样本放置位置和样本名称的设置等。
- 4) 编辑反应循环参数：

反应程序设置：可进行两步法或三步法的设置，如 95℃, 2min; 95℃, 15s; 55℃, 15s; 68℃, 31s(收集荧光); 40cycles。

选择荧光收集点：选择所要收集荧光的步骤，一般为延伸温度；同时还可以设置反应体积等参数。

融解曲线设置：可在循环结束后添加融解曲线。

| 报告基团 | 对应的淬灭基团 |
|-----------|------------------------|
| FAM | BHQ1, DABCYL*, TAMRA** |
| TET | BHQ1, DABCYL* |
| HEX | BHQ1, BHQ2, DABCYL* |
| TAMRA | BHQ2, DABCYL* |
| Texas Red | BHQ2, BHQ3, DABCYL* |
| ROX | BHQ2, BHQ3, DABCYL* |
| Cy5 | BHQ2, BHQ3 |

*DABCYL 是机械的淬灭基团，仅适用于分子信标

** 不建议使用 TAMRA 作为淬灭基团，但是当进行单色 FAM 实验时 TAMRA 可以作为淬灭基团，TAMRA 在分子信标实验中作为淬灭基团效果差。

2、结果与分析

2.1 标准曲线绘制与分析及未知样本定量分析

绝对定量中，未知样本的量(即拷贝数)可以通过标准品构建标准曲线得出。为了建立标准曲线，需要已知浓度的标准品模板。将标准品级别稀释后与待测样本置于同一实验中进行反应。

如图所示，我们得到一组含有 10^3 - 10^6 个拷贝模版的标准品，标准品和样本在同一实验中运行，可得到标准曲线方程： $y = -3.42x + 35.82$ ($R^2 = 0.992$)

将得到的 Ct 值代入线型方程即可得出拷贝数。以确定未知样本的量，如，未知样本 Ct 值为 18.6，即：

$$18.6 = -3.42x + 35.82, x = 5.04$$

$$\text{Quantity}_{\text{Unknown}} = 10^{5.04} = 109648 \text{ copies}$$

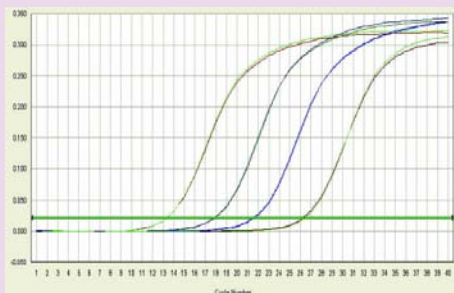


图2 荧光定量 PCR 扩增曲线图

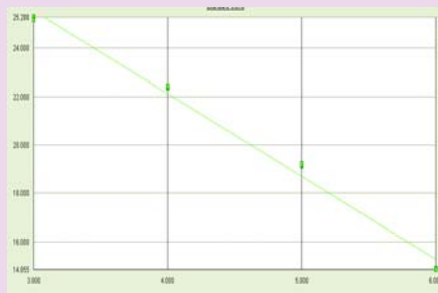


图3 荧光定量 PCR 标准曲线图

2.2 融解曲线绘制与分析

融解曲线的设置是在整个PCR完成后进行，从60℃升至95℃，每升高单位温度仪器会自动收集荧光信号，得到的融解曲线是逐渐下降的过程，且在T_m值下降最快，为方便分析，我们将温度与荧光强度的变化求导，即得到单峰的融解曲线。证明反应特异性良好，无非特异扩增和引物二聚体等干扰实验结果因素。



图4 融解曲线原始图

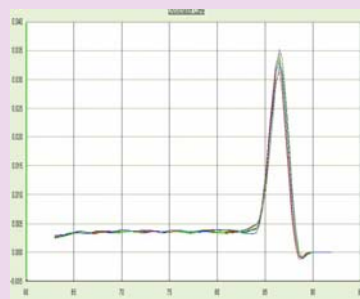


图5 融解曲线单峰图

第二节 应用 SYBR Green 法进行 Jun 基因的表达差异分析

1、相对定量方法简介

所谓相对定量，即我们不用得到绝对的拷贝数，而只需计算表达的差异即可，即我们得到的结果只是某基因表达水平升高了或降低了多少倍。明确这个概念，按照我们不同的实验需求，我们可以采用不同的方法进行实验设计和数据分析，一般常用的方法有双标准曲线法、 ΔCt 法、 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 、用参照基因的 ΔCt 法和 Pfaffi 法。

■ 双标准曲线法

$$F = \frac{\frac{\text{待测样品目的基因浓度}}{\text{待测样品看家基因浓度}}}{\frac{\text{参照样品目的基因浓度}}{\text{参照样品看家基因浓度}}}$$

其中所测的待测基因浓度和参照基因浓度都是应用目的基因和参照基因的标准曲线来确定的，故为双标准曲线法，由于已经计算出实际的基因浓度，所以不受扩增效率差异的干扰。同时对每一个基因，每一轮实验都必需做标准曲线；必需有固定的标准品做标准曲线；这些标准品并不代表样品扩增的真实状态。

■ 其他方法

假设检测 A 基因在某因子干预下的表达，得到一组数据见下表：

| | 待测基因 (Ct) | 参照基因 (Ct) | 待测基因扩增效率 (E) | 参照基因扩增效率 (E) |
|-----|-----------|-----------|--------------|--------------|
| 干预前 | A | B | C | D |
| 干预后 | E | F | C | D |

根据实验要求我们可以选择相应的方法，如下表：

| 实验方法 | 参考条件 | 计算方法 |
|------------------------------|--|---|
| ΔCt 法 | 扩增效率为 100%，仅需目标基因即可 | 表达水平 = $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(E-A)}$ |
| $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ | 目的基因和参照基因扩增效率都接近 100%，且相对偏差不超过 5%，需要目标基因和参照基因。 | 表达水平 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ = $2^{-[(E-F)-(A-B)]}$ |
| 参照基因的 ΔCt | 同 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ | 表达水平 = $2^{(F-B)-(E-A)}$ |
| Pfaffi 法 | 目标基因和参照基因扩增效率不同，但目标基因间的扩增效率相同，需目标基因和参照基因，以及扩增效率。 | 表达水平 = $C^{(A-E)}/D^{(B-F)}$ |

2、应用 SYBR Green 方法对不同样本中 Jun 基因表达进行分析

2.1 材料与方法

取 2ul 逆转录产物(约 50-100ng)建立 20ul 反应体系，每个样品 3 个重复，对 Jun 和 GAPDH 进行扩增。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

2.2 融解曲线绘制与分析

融解曲线如图4所示：其中83度为 GAPDH 融解曲线，87 度为 Jun 的融解曲线

2.3 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对 Jun 基因表达差异分析

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法举例：测定 Jun 基因在某因子作用前后的表达变化

我们以 GAPDH 为参照基因，检测待测样品中的 Jun 基因的表达水平差异，以 1 号样本数据为校准样本，2-6 号样本为待测样本，比较待测样本相对校准样本的表达差异，利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对其进行分析：

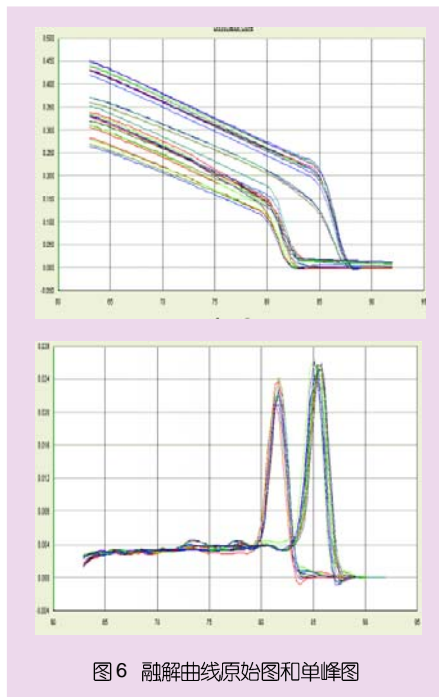


图 6 融解曲线原始图和单峰图

| 样本名称 | JUN Mean (Ct) | GAPDH Mean (Ct) | ΔCt | $\Delta\Delta Ct$ | $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|------|---------------|-----------------|-------------|-------------------|------------------------|
| 1 | 27.35 | 16.98 | 10.37 | 0 | 1 |
| 2 | 27.52 | 16.86 | 10.66 | 0.29 | 0.82 |
| 3 | 27.65 | 17.38 | 10.27 | -0.1 | 1.07 |
| 4 | 27.33 | 17.25 | 10.08 | -0.29 | 1.22 |
| 5 | 27.17 | 17.05 | 10.12 | -0.25 | 1.19 |
| 6 | 27.67 | 17.34 | 10.33 | -0.04 | 1.03 |

以 1 号样本为校准样本，2 号样本为待测样本，应用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行分析：

第一步，应用参照基因对校准样本和待测样本进行校正：

$$\begin{aligned}
 \Delta Ct_{\text{(校准样本)}} &= JUN(\text{Mean Ct})_1 - \text{参照基因 GAPDH}(\text{Mean Ct})_1 \\
 &= 27.35 - 16.98 \\
 &= 10.37
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \Delta Ct_{\text{(待测样本)}} &= JUN(\text{Mean Ct})_2 - \text{参照基因 GAPDH}(\text{Mean Ct})_2 \\
 &= 27.52 - 16.86 \\
 &= 10.66
 \end{aligned}$$

第二步，校准样本和待测样本的 ΔCt 进行归一化：

$$\begin{aligned}\Delta\Delta Ct &= \Delta Ct_{\text{(待测样本)}} - \Delta Ct_{\text{(校准样本)}} \\ &= 10.66 - 10.37 \\ &= 0.29\end{aligned}$$

第三步，表达差异的计算：

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-0.29} = 0.82$$

因此 2 号样本的 Jun 基因的表达水平是 1 号样本的 0.82 倍。

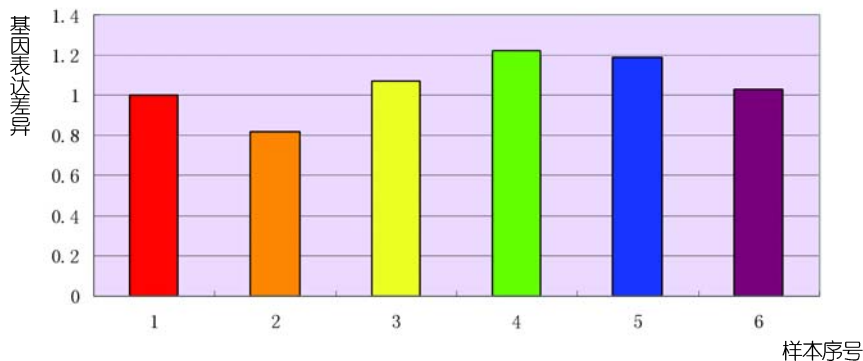


图 7 Jun 基因相对表达分析

此结果是通过参照基因表达水平校正的待测样本中的目标基因相对于校准样本，用参照基因校准目标基因表达的目的是弥补样本组织量的差异。

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法的修正：

如果目标基因可参照基因有相同的扩增效率，但扩增效率不等于 2，那么， $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法的公式可以修正为用实际扩增效率值代替等式中的 2。例如，如果目标基因和参照基因的扩增效率都为 1.95，计算公式可以修正为 $1.95^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

第三节、应用 TaqMan 法进行绝对定量分析

1、实验目的

利用 TaqMan 法检测病人血液中 HBV 病毒的拷贝数。

2、实验准备和试剂

使用 TIANGEN 公司试剂 RealMasterMix(Probe)(目录号 FP203)、HBV 检测用探针、HBV 检测用引物、HBV 系列标准品 (浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3)、病人血清 HBV 病毒的提取 (应用 TIANGEN 公司 TIANamp 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒进行提取)

3、荧光定量 PCR 反应

以 20ul 体系进行荧光检测, 设标准品, 设阴性对照。每个样品 3 个重复。荧光定量 PCR 具体反应体系及反应程序设置见下表。

| 组成成分 | 20ul 体系 |
|------------------------------|---------|
| 2.5 × Real Master Mix | 8 ul |
| 正向引物 | 0.5 ul |
| 反向引物 | 0.5 ul |
| 探针 | 0.25 ul |
| 20 × Probe Enhancer Solution | 1 ul |
| DNA 模板 | 1 ul |
| dd H ₂ O | 至 20 ul |

| 反应过程 | 温度 | 时间 |
|-----------|------|--------|
| 预变性 | 95°C | 2min |
| 变性 | 94°C | 15 sec |
| 退火 | 55°C | 15 sec |
| 延伸 (收集荧光) | 68°C | 30 sec |

4、实验结果分析

| copies/ml | Ct1 | Ct2 | Mean Ct | STD |
|-----------------|-------|-------|---------|------|
| 1×10^3 | 28.18 | 28.64 | 28.41 | 0.16 |
| 1×10^4 | 25.25 | 25.14 | 25.19 | 0.04 |
| 1×10^5 | 22.11 | 22.46 | 22.28 | 0.12 |
| 1×10^6 | 18.63 | 18.92 | 18.77 | 0.10 |
| BLANK | None | None | | |

未知样品平均 Ct 为 20.5

标准曲线制作：利用 MeanCt 作图可得到标准曲线（见下图）

标准曲线方程： $y = -3.17x + 37.52$ $R^2 = 0.9988$

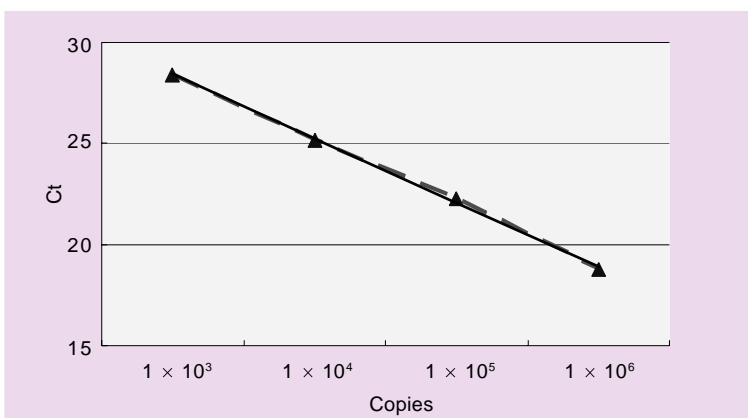
将未知样品平均 Ct 带入标准曲线方程

$20.5 = -3.1726 X + 37.52$

$X = 5.36$

$\text{Quantity}_{\text{Unknown}} = 10^{5.36}$

$= 2.3 \times 10^5 \text{ copies}$



第四节、Real-time PCR 常见问题分析

Q-1. 无 Ct 值 (信号) 出现

- A1. 反应循环数不够: 一般都要在 35 个循环以上, 可根据实验情况增加循环 (如至 45 cycles), 但高于 45 个循环会增加过多的背景信号。
- A2. 检测荧光信号的步骤有误: 一般采用 72℃ 延伸时采集, Taqman 法则一般在退火结束时或延伸结束采集信号。
- A3. 引物或探针降解: 可通过 PAGE 电泳检测其完整性。
- A4. 引物或探针的设计, 如探针高于引物的温度不够, 造成探针未杂交上而产物已延伸的情况。
- A5. 模板量不足: 对未知浓度的样品应从系列稀释样本的最高浓度做起。
- A6. 模板降解: 避免样品制备中杂质的引入及反复冻融的情况。

Q-2. Ct 值出现过晚

- A1. 扩增效率低, 反应条件不够优化: 设计更好的引物或探针; 改用三步法进行反应; 适当降低退火温度; 增加镁离子浓度等。
- A2. PCR 各种反应成分的降解或加样量的不足。
- A3. PCR 产物太长: 一般采用 80-150bp 的产物长度。

Q-3. 标准曲线的线性关系不佳

- A1. 加样存在误差, 使得标准品不呈梯度。
- A2. 标准品出现降解: 应避免标准品反复冻融, 或重新制备并稀释标准品。
- A3. 引物或探针不佳: 重新设计更好的引物和探针。
- A4. 模板中存在抑制物, 或模板浓度过高。

Q-4. 阴性对照也出现明显的扩增

- A1. 应 mix 或水被污染。
- A2. 引物二聚体的出现: 在 35 cycles 以后阴性出现扩增属正常情况, 可配合熔解曲线进行分析。
- A3. 反应过程中探针的降解: 用 PAGE 电泳对探针进行检测。
- A4. 如果使用了 ROX 校正, 则可能是 ROX 的降解所造成。

Q-5. 融解曲线不止一个主峰

- A1. 引物设计不够优化: 应避免引物二聚体和发夹结构的出现。
- A2. 引物浓度不佳: 适当降低引物的浓度, 并注意上下游引物的浓度配比。
- A3. 镁离子浓度过高: 适当降低镁离子浓度, 或选择更合适的 mix 试剂盒。
- A4. 模板有基因组的污染: RNA 提取过程中避免基因组 DNA 的引入, 或通过引物设计避免非特异扩增。

Q-6. 扩增效率低

- A1. 反应试剂中部分成分特别是荧光染料降解。
- A2. 反应条件不够优化，可适当降低退火温度或改为三步扩增法。
- A3. 反应体系中有 PCR 反应抑制物：一般是加入模板时所引入，应先把模板适度稀释，再加入反应体系中，减少抑制物的影响。

Q-7. 实验重复性不好

- A1. 加样不准确。
- A2. 仪器在样品上温度条件有差异，即温度均一性不好。
- A3. 模板浓度低：样品初始浓度越低，重复性越差，应减少样品的稀释倍数。

Q-8. 变性温度和时间是否合适

- A1. 大部分的双链 DNA 在 95℃ 就开始解链了，在有些情况下在 90 至 94℃ 都不能很好地变性 DNA。由于部分变性，参加反应的探针和引物相应的减少了，因此反应效率会下降。
- A2. 15 到 20 秒对于变性扩增子是足够了，然而，长一点的产物，可能会需要 30 秒，60 秒的变性时间通常是不需要的。

Q-9. 退火温度和时间是否合适

- A1. 检查引物和探针的 T_m 值，SYBR Green 的退火时间大约 20 到 35 秒，双标记探针通常是两步法，退火和延伸合并为一步，时间大约是 45 到 60 秒，温度通常在 60℃，对于 FRET 探针退火步骤大约 20 到 30 秒。

Q-10. 在哪一步骤采集信号

- A1. SYBR Green 应当在 72℃，此时绝大部分的 DNA 是双链状态，如上所述，双标记探针通常是两步检测，因此信号采集应该在退火延伸的整合步骤。对于 FRET 检测，数据应该在退火步骤检测。如果对于信号采集点不确定，可以多点采集作对比。如果监控屏幕检测不到信号，检查程序设定是否存在至少一个的信号采集点。

RNA 提取相关产品

| 目录号 | 产品名称 | 包 装 | 价 格 |
|----------|----------------------------------|-------|------|
| DP430 | RNAprep pure 培养细胞/细菌总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1280 |
| DP431 | RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1380 |
| DP432 | RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1280 |
| DP433 | RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1380 |
| DP420 | RNAprep pure 微量样品总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1580 |
| DP405-01 | TRNzol 总 RNA 提取试剂 | 20ml | 180 |
| DP405-02 | | 100ml | 600 |
| DP421 | TRNzol-A ⁺ 总 RNA 提取试剂 | 100ml | 880 |
| DP419 | RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 680 |
| DP315 | TIANamp 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 960 |
| DP315-R | TIANamp 病毒 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 960 |
| SD101 | 病毒检测用 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1280 |
| DP412 | RNAclean RNA 纯化试剂盒 | 20 次 | 360 |
| DP409 | RNAsafe (RNase 抑制剂) | 1ml | 190 |
| DP418 | RNasin (RNase 抑制剂) | 30ul | 200 |
| RT411 | DNase I | 1500U | 800 |
| DP408-01 | RNAstore 样本保存液 | 20ml | 120 |
| DP408-02 | | 100ml | 480 |

RT 相关产品

| 目录号 | 产品名称 | 包 装 | 价 格 |
|----------|-----------------------------|--------|------|
| ER103-02 | Quant Reverse Transcriptase | 25 次 | 850 |
| ER103-03 | | 50 次 | 1500 |
| ER103-04 | | 100 次 | 2800 |
| KR103-03 | Quant cDNA 第一链合成试剂盒 | 25 次 | 1000 |
| KR103-04 | | 100 次 | 3000 |
| KR113 | Quant 一步法 RT-PCR 试剂盒 | 50 次 | 1400 |
| SD102 | 病毒检测用一步法 RT-PCR 试剂盒 | 50 次 | 1800 |
| ER104-03 | TIANScript M-MLV | 5000U | 250 |
| ER104-04 | | 20000U | 850 |
| KR104-01 | TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒 | 25 次 | 400 |
| KR104-02 | | 100 次 | 1380 |

荧光定量 PCR 相关产品

| 目录号 | 产品名称 | 包 装 | 价 格 |
|----------|---|-----------------|------|
| FP202-01 | RealMasterMix (SYBR Green) | 50 次 × 50ul 体系 | 500 |
| FP202-02 | | 200 次 × 50ul 体系 | 1700 |
| FP302-01 | Quant qRT-PCR (SYBR Green) Kit | 50 次 × 50ul 体系 | 1280 |
| FP302-02 | | 200 次 × 50ul 体系 | 3680 |
| FP203-01 | RealMasterMix (Probe) | 50 次 × 50ul 体系 | 500 |
| FP203-02 | | 200 次 × 50ul 体系 | 1700 |
| FP303-01 | Quant One Step qRT-PCR (SYBR Green) Kit | 50 次 × 50ul 体系 | 1500 |
| FP304-01 | Quant One Step qRT-PCR (PROBE) Kit | 50 次 × 50ul 体系 | 1500 |

Quant One Step qRT-PCR (Probe) Kit

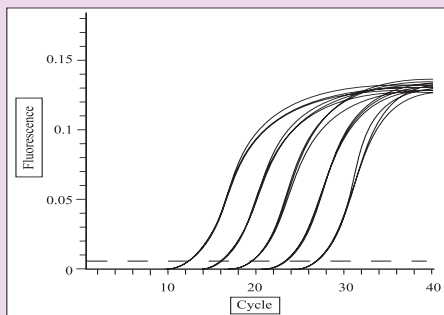
——使用 Probe 进行一步法 Real Time RT-PCR 专用产品

| 目录号 | 规格 | 目录价(元) |
|----------|-----------------|--------|
| FP304-01 | 50 次 × 50 μl 体系 | 1500 元 |

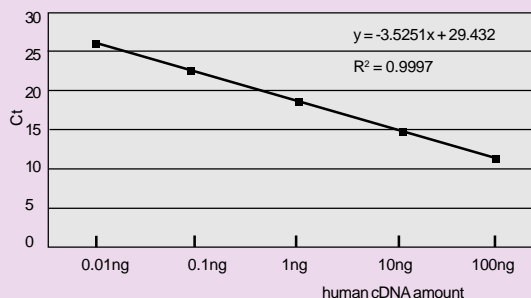
产品优势：

- 可以快速、准确地对 RNA 病毒等微量 RNA 进行分析。
- 在一管内连续完成反转录和定量 PCR 扩增，减少了多重操作污染的可能性。
- 高效的反转录酶和热启动聚合酶保证扩增的高效率和高特异性。
- 操作简便快速，减少加样过程中的体积损耗，保证结果的可信性。
- 实验结果稳定、重复性好。

实验举例：



扩增曲线



标准曲线

实验材料：Human Jurkat Cells total RNA；目的基因：β-actin 基因；模板稀释：将得到的 cDNA 按照 10 的倍数稀释，将相当于模板为 0.01ng -100ng 总 RNA 量的 cDNA 作为模板；结果说明：在实验浓度范围内，可以得到准确的定量结果。

病毒检测用 RNA 提取试剂盒

——使用分离柱方法从血浆，血清和无细胞体液中

同时纯化病毒 RNA

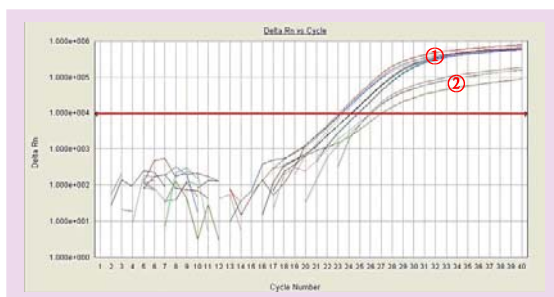
| 目录号 | 规格 | 目录价(元) |
|-------|------|--------|
| SD101 | 50 次 | 1280 元 |

产品优势：

- 专业：专项研发用于病毒检测的 RNA 提取试剂盒，被全国各级 CDC 及医疗机构广泛应用；
- 高效：采用特异结合病毒核酸的离心吸附柱和独特的缓冲液系统，更加高效、特异地纯化病毒 RNA；
- 灵敏：试剂盒配备了 Carrier RNA 用于充分收集样本中微量病毒 RNA；
- 安全、便捷：离心柱式操作，全过程只需 30-40 分钟。

实验举例一：

取已知浓度的 HCV (1×10^6) 临床样本用阴性血浆稀释至 2×10^3 ，分别用 TIANamp RNA Kit for Virus detection 和 Invitrogen 公司的 Trizol 进行 RNA 提取后，用荧光定量进行检测病毒 RNA 的提取情况。为保障荧光定量检测 TIANamp RNA Kit for Virus detection 的上样量为 140ul，洗脱体积为 84ul，上荧光定量的体积为 15ul，Trizol 的提取样品量为 50ul，洗脱体积为 30ul，上荧光定量的体积为 15ul。实验结果显示 TIANamp RNA Kit for Virus detection 提取获得的病毒 RNA 浓度整体高于 Trizol 提取所得。



- ①：使用 TIANGEN 的 TIANamp RNA Kit for Virus Detection 得到的实验结果
②：使用 TRizol 得到的实验结果

实验举例二：

选取携带 HEV(戊型肝炎病毒)的猪粪便样本，按照 10 倍进行梯度稀释，样本量分别为 50ul、100ul 和 150ul，用国外知名品牌和 TIANamp RNA Kit for Virus detection 进行比较。结果显示，TIANamp RNA Kit for Virus detection 和国外知名品牌在粪便样本的分离上无显著差异。

| 粪便样本 稀释倍数 | TIANamp RNA Kit for Virus detection | | | 国外知名品牌 | | |
|--------------|-------------------------------------|----------|----------|---------|----------|----------|
| | 50ul 上样 | 100ul 上样 | 150ul 上样 | 50ul 上样 | 100ul 上样 | 150ul 上样 |
| 10^0 | 18.40 | 16.75 | 16.57 | 18.96 | 17.63 | 17.38 |
| 10^1 | 22.04 | 21.11 | 21.20 | 22.47 | 21.83 | 20.34 |
| 10^2 | 25.75 | 25.97 | 24.38 | 25.39 | 25.05 | 24.91 |
| 10^3 | 30.08 | 28.17 | 26.72 | 29.88 | 27.61 | 26.71 |

病毒检测用一步法 RT-PCR 试剂盒

——一种高效灵敏的一步法 RT-PCR 专用试剂盒

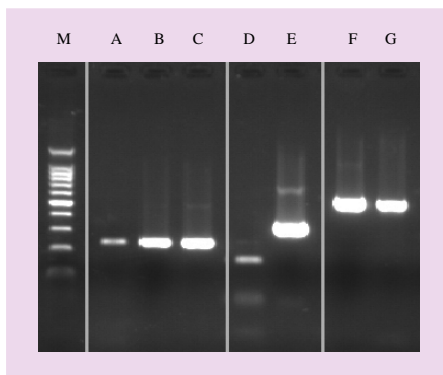
| 目录号 | 规格 | 目录价(元) |
|-------|------|--------|
| SD102 | 50 次 | 1800 元 |

产品优势：

- 专业：专项研发用于病毒检测的一步法 RT-PCR 试剂盒，被全国各级 CDC 及医疗机构广泛应用；
- 灵敏：试剂盒使用高效的 Quant 反转录酶，特别适用于病毒 RNA 等低含量模板的反转；
- 安全、可靠：整个反应在一管中完成，实验过程中无需添加任何试剂，降低外源污染的可能性。

实验举例：

取新甲型 H1N1 病毒 RNA、季节性 H3N2 病毒 RNA 和季节性 H1N1 病毒 RNA 临床样本，用 One Step RT-PCR Kit for Virus Detection 进行 RT-PCR 检测，PCR 引物分别为 FluA, SWH1, H1, HuSWH1 和 FluB，反应体系为 25ul，取 8ul 进行电泳检测。检测结果显示 One Step RT-PCR Kit for Virus Detection 可对这些样本进行有效的鉴定。



M:TIANGEN 100bp ladder

A:模板为新甲型 H1N1 病毒 RNA,引物为 FluA

B:模板为季节性 H3N2 病毒 RNA,引物为 FluA

C:模板为季节性 H1N1 病毒 RNA,引物为 FluA

D:模板为新甲型 H1N1 病毒 RNA,引物为 SWH1

E:模板为季节性 H1N1 病毒 RNA,引物为 H1

F:模板为季节性 H1N1 病毒 RNA,引物为 HuSWH1

G:模板为 B 型流感病毒 RNA,引物为 FluB

DNA/RNA 共提取试剂盒

——从一种样本中同时提取 DNA 和 RNA

| 目录号 | 规格 | 目录价(元) |
|-------|------|--------|
| DP422 | 50 次 | 1400 元 |

产品简介：

本试剂盒可从培养的动物细胞或者组织中快速同步提取 DNA 和总 RNA，可同时处理大量不同样品。40-50 分钟内即可完成反应，提取的 DNA 和总 RNA 纯度较高，可用于 PCR 和 RT-PCR 等多种分子生物学下游实验。

产品特点：

- 方便：从同一样本中同时得到 DNA 和 RNA
- 快速：40-50 分钟即可完成一次抽提
- 安全：提取过程无需酚氯仿有机物
- 可靠：可用于下游实验

DNA/RNA /Protein 共提取试剂盒

——从一种样本中同时提取 DNA、RNA 和总蛋白

| 目录号 | 规格 | 目录价(元) |
|-------|------|--------|
| DP423 | 50 次 | 2800 元 |

产品简介：

本试剂盒可从培养的动物细胞或者组织中快速同步提取 DNA、总 RNA 和总蛋白，可同时处理大量不同样品。1 小时左右可完成反应。

产品特点：

- 方便：从同一样本中同时得到 DNA、RNA 和总蛋白
- 快速：1 小时左右可完成一次抽提
- 安全：提取过程无需酚氯仿有机物
- 可靠：可用于下游实验

RNA 提取

硅基质膜吸附法

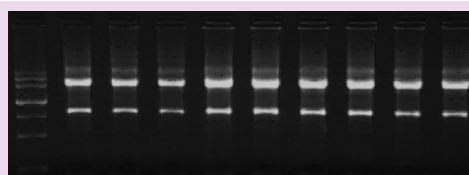
RNAprep pure 系列总 RNA 提取试剂盒

| 目录号 | 产品名称 | 包装 | 价格 (元) |
|-------|-----------------------------------|------|--------|
| DP430 | RNAprep pure 培养细胞 / 细菌总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1280 |
| DP431 | RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1380 |
| DP432 | RNAprep pure 植物总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1280 |
| DP433 | RNAprep pure 血液总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1380 |
| DP420 | RNAprep pure 微量样品总 RNA 提取试剂盒 | 50 次 | 1580 |

产品优势：

- 与 RNA 模板具有高亲合性，反转录效率高；
- 可通读 GC 含量高、二级结构复杂的模板；
- 具有更高的灵敏度与更宽广的动态检测范围；
- 耐热性好。

实验举例：



使用 RNAprep pure 动物组织总 RNA 提取试剂盒 (DP431) 提取大鼠不同组织 RNA 电泳图
M: TIANGEN Marker III 1、2: 胚胎 (13 天); 3: 肾脏; 4、5、6: 肝脏; 7: 脾; 8: 胸腺; 9: 肺

溶液沉淀法

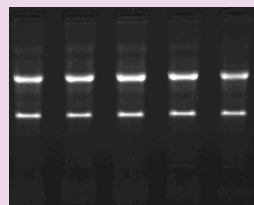
TRNzol/TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂

| 目录号 | 产品名称 | 包装 | 价格 (元) |
|-------------|----------------------------------|------------|---------|
| DP405-01/02 | TRNzol 总 RNA 提取试剂 | 20ml/100ml | 180/600 |
| DP421 | TRNzol-A ⁺ 总 RNA 提取试剂 | 100ml | 880 |

产品优势：

- 与 RNA 模板具有高亲合性，反转录效率高；
- 可通读 GC 含量高、二级结构复杂的模板；
- 具有更高的灵敏度与更宽广的动态检测范围；
- 耐热性好。

实验举例：



使用 TRNzol-A⁺ 总 RNA 提取试剂 (DP421) 提取 HeLa cell 总 RNA 电泳图

RT 产品

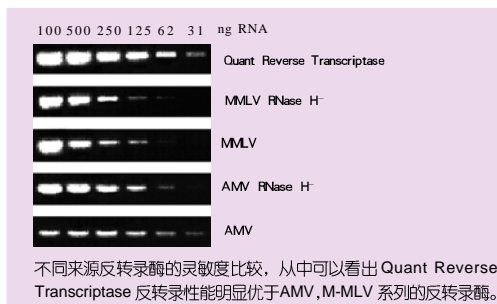
Quant RT /cDNA 第一链合成试剂盒

| 目录号 | 产品名称 | 包装 | 价格 (元) |
|----------------|-----------------------------|-----------------|---------------|
| ER103-02/03/04 | Quant Reverse Transcriptase | 25 次/50 次/100 次 | 850/1500/2800 |
| KR103-03/04 | Quant cDNA 第一链合成试剂盒 | 25 次/100 次 | 1000/3000 |

产品优势：

- 与 RNA 模板具有高亲合性，反转录效率高；
- 可通读 GC 含量高、二级结构复杂的模板；
- 具有更高的灵敏度与更宽广的动态检测范围；
- 操作简单。

实验举例：



TIANScript MMLV /cDNA 第一链合成试剂盒

| 目录号 | 产品名称 | 包装 | 价格 (元) |
|-------------|--------------------------|--------------|----------|
| ER104-03/04 | TIANScript MMLV | 5000U/20000U | 250/850 |
| KR104-01/02 | TIANScript cDNA 第一链合成试剂盒 | 25 次/100 次 | 400/1380 |

产品优势：

- RNaseH 活性弱化，可最大限度保护 RNA 模板；
- 可反转录更长的 RNA 模板，cDNA 产量更高；
- 对后继 PCR 或荧光定量 PCR 实验兼容性好。

荧光定量 PCR 产品

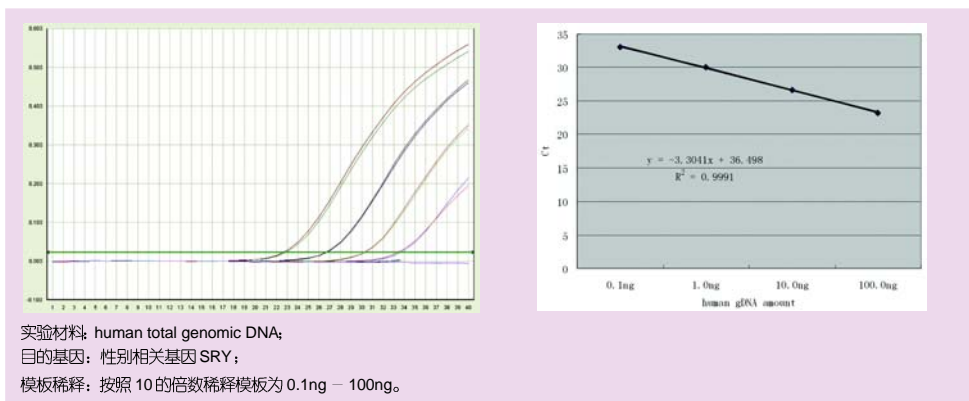
RealMasterMix 荧光定量 PCR 试剂盒

| 目录号 | 产品名称 | 包装 | 价格 (元) |
|---------------|----------------------------|------------|----------|
| FP202 – 01/02 | RealMasterMix (SYBR Green) | 50 次/200 次 | 500/1700 |
| FP203 – 01/02 | RealMasterMix (Probe) | 50 次/200 次 | 500/1700 |

产品优势：

- 全新的 Hotmaster Taq DNA 聚合酶，具有高扩增效率，高扩增灵敏度，高扩增特异性的特点。
- 独特的 Mg^{2+} 自动调节系统，能够随时保证为 PCR 提供最佳的 Mg^{2+} 浓度。
- 独特配制的 SYBR Solution，Probe Solution 可满足染料法或者探针法荧光定量实验需求！

实验举例：



服务指南

※客户可通过电话、传真、E-mail 等方式订购产品或咨询我公司产品和服务

订货电话: 010-59822688

技术支持: 010-59822661 / 2665

技术服务: 010-59822664

测序服务: 010-59822696

传 真: 010-59822788

E-mail: order@tiangen.com

(订 货)

people@tiangen.com

(技术支持)

service@tiangen.com

(技术服务)

sequence@tiangen.com

(测序服务)

网 址: <http://www.tiagen.com>

注: 北京地区以外的客户可以通过 T I A N G E N 公司在各个地区的代理商订购我公司产品和服务
(各地代理商详细信息请登陆我公司网站)

※订货时请注明产品目录号、产品名称、数量、到货时间要求、订货人姓名、付款凭证及付款单位名称、地址、联系电话、E-mail、收货地点等详细信息。

※付款信息

公司名称: 天根生化科技(北京)有限公司

开户银行: 招商银行北京清华园支行

账 号: 866780522910001

税 号: 110108777650264

单位地址: 北京市海淀区成府路35号

联系电话: 010-59822608

※货物发送与验收

客户收到产品后请即刻验收名称、包装、数量和状态是否正确, 内外包装是否完好。如有疑问请不要签收, 并立即联系公司总部或当地代理商, 经证实公司将负责免费调换。

※质量投诉处理

如产品有任何缺漏或破损, 可在收到产品24小时内通知我们。如果产品外包装未破坏, 我们会尽快予以更换, 更换时间: 北京客户一个工作日, 外地客户根据运送的最快速度。收到的产品正常保存条件下, 如果对产品质量有疑问, 我们会在接到投诉后24小时给予答复。

产品概况介绍

天根生化科技（北京）有限公司为广大客户提供一系列的国际化标准生物学产品和服务，产品情况如下：

产品的框架：

- 核酸提取与纯化
- PCR、RT-PCR
- 荧光定量PCR
- 各类检测用试剂盒
- DNA分子量标准
- 克隆系统
- 蛋白相关产品
- 转染试剂
- 生化试剂与耗材
- 技术服务

产品总体特点：

- 产品设计理念先进，全面考虑客户的对效率、安全及后继实验的要求。
- 实验操作简便、省时；流程易懂、合理。
- 原料选购精良，严格恪守原料采购标准。
- 严格遵守原材料、半成品及成品的规范检测流程。
- 产品质量稳定、实验结果均一、与后继实验衔接流畅便捷。
- 规范的物流网络及库房设施充分保证产品的运输条件及保存环境。
- 为产品选购和实验全程提供全方位的技术支持和售前售后服务。





公司联系方式

北京

地址：北京海淀区成府路35号北陆楼
邮编：100083
电话：010-59822688
传真：010-59822788

技术支持：010-59822661/2665
免费咨询：800-990-6057
E-mail: people@tiangen.com

上海

地址：上海市漕溪路258弄27号 航星商务楼1号楼606室
邮编：200235
电话：021-38653846
传真：021-64074836