

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间：2025 年 6 月 21 日 13:30 — 2025 年 6 月 21 日 16:30

20. qRT-PCR（一）

一、实验目的

对正、低、中、高耐药细胞株 T24-RC48 的 RNA 进行逆转录获得 cDNA 后，通过实时荧光定量 PCR（SYBR Green 法）检测特异性基因（PDL1、VEGF、RBPJ、ICAM1、DSP、SOD2、CAT、GAPDH）的表达水平并进行定量分析，来鉴定其是否与对照组有明显差异。

二、实验内容

本实验通过实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术，对 T24 野生型细胞株及低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株 cDNA 的 RNA 进行逆转录及基因表达定量分析，具体内容包括：

2.1 实验设计

首先，从-80℃冰箱取出正、低、中、高四种耐药细胞株（T24-RC48）的冻存 cDNA 样本，室温解冻后瞬时离心，置于冰上备用；接着，从-20℃冰箱取出 ROX Reference Dye、RNase-free ddH₂O 及特异性基因（PDL1、VEGF 等）的正反引物，冰上缓慢解冻；然后，按预设体系（每组含 cDNA 15 μl、ROX 75 μl、正/反向引物各 3 μl、ddH₂O 54 μl）配制 qPCR 反应液，并分装至标记为“正、低、中、高”的 EP 管中；随后，根据预设的 96 孔板布局（红、橙、黄、绿分别对应四组浓度），将反应液加入对应孔位，确保无气泡且枪头不触碰孔壁；最后，将 96 孔板放入实时荧光定量 PCR 仪，设置变性（95℃ 5 秒）、退火/延伸（60℃ 30 秒）的循环程序（40 个循环），运行 SYBR Green 检测模式，采集荧光信号并导出数据。

2.2 样本类型

T24 野生型细胞株、低/中/高度耐药 T24-RC48 细胞株 cDNA（由前期 RNA 逆转录获得）。

2.3 测定原理

定量聚合酶链式反应（qPCR），又称实时定量 PCR，是一种通过荧光信号实时监测 DNA 扩增过程的技术。其原理基于 PCR 扩增过程中产生的荧光强度变化：在反应体系中加入能与双链 DNA 结合的荧光染料（如 SYBR Green）或特异性荧光探针（如 TaqMan 探针），当 DNA 每经过一次扩增循环，荧光信号随之增强。仪器通过实时检测荧光值生成扩增曲线，当信号达到设定阈值时对应的循环数（Ct 值）与起始模板量成反比。通过标准曲线或相对定量法，即可精确计算原始 DNA 模板的浓度，广泛应用于基因表达分析、病原体检测和基因拷贝数测定等领域。

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 21 日 13:30 — 2025 年 6 月 21 日 16:30

三、材料与试剂

3.1 材料

96 孔国产光学反应板、光学封口膜（泛特律）：均购自国产公司
RNAase Free 的 EP 管、八联管、 Tip 枪头：购自 AxyGen 公司
冰盒

3.2 试剂

cDNA（由前期 RNA 逆转录 PCR 反应制备）
ROX Reference Dye
引物基因
内参 GAPDH
RNase-free ddH₂O

四、实验仪器

移液器、台式低温低速离心机：购自 Eppendorf 公司
实时定量 PCR 仪：ABIQuantStudio5 1.5ml
离心管：购自 Corning 公司
Cube 离心机：购自 GeneReach 公司

五、实验步骤

本实验要求操作全过程及试剂，PCR 反应混合物的制备需在冰上操作，且保证无酶；实时定量 PCR 仪反应条件（设置引物、样品名称、变性和退火的温度梯度、时间等相关参数）按照要求设定。具体操作如下：

- 5.1** 从-80 度冰箱取出上次冻存的正、低、中、高四种 cDNA 的 EP 管，撕去封口膜，室温放置 5~10 分钟使之充分融化，上下颠倒 5~10 次使之充分混匀，然后使用离心机瞬离至管底，放在冰上备用。
- 5.2** 同时从-20 度冰箱取出 ROX 试剂、RNase-free ddH₂O 和特异性基因（PDL1、VEGF、RBPI、ICAM1、DSP、SOD2、CAT、GAPDH）的正反引物，置于冰上缓慢解冻。
- 5.3** 设置一个引物基因有三个小孔的组内对照，根据 qpcr 体系配置说明书，计算出体系各试剂的量：

表 1 体系各试剂的加入量

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 21 日 13:30 — 2025 年 6 月 21 日 16:30

	cDNA(μl)	ROX Reference Dye(μl)	正向引物(μl)	反向引物(μl)	RNase-free ddH2O (μl)
野生型	15	75	3	3	54
低度耐药	15	75	3	3	54
中度耐药	15	75	3	3	54
高度耐药	15	75	3	3	54

5.4 使用量程为 10 μl 和 200 μl 的移液器，吸取上述量，分别加入四个编号为“正”“低”“中”“高”的新 EP 管，轻柔混匀，注意过程中不要产生气泡

5.5 在 Excel 上编辑好 96 孔板上相应引物基因和“正”“低”“中”“高”四个浓度的位置关系（红、橙、黄、绿分别代表正、低、中、高浓度）：

PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1	PDL1
VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF	VEGF
RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ	RBPJ
ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1	ICAM1
DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP
IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B
CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT
GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH	GAPDH

图 1 96 孔板布局示意图

5.6 准备好 12 排八联管，按照位置关系图认真地向每个孔轻轻加入 40 μl 的 qPCR 体系溶液。注意：加样过程中枪头不要碰到孔壁；样本切换时务必更换枪头。

5.7 加样完成后，盖上盖子，将 12 排八联管两两放入高速迷你离心机进行机 1000rpm 离心 1 分钟，将液体离心至 qPCR 孔板底部，保证实验准确性。

5.8 取出 96 孔板和其配套的托板，将 12 排八联管按照顺序放入托板中，注意不要用手触碰 96 孔板的中部和底部，避免因污染影响检测精度。

5.9 将 96 孔板放入 qPCR 机器中，设定反应条件如下：

表 2 qPCR 扩增仪上的标准反应条件

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 21 日 13:30 — 2025 年 6 月 21 日 16:30

反应阶段	温度	时间	循环数	备注
预变性	95℃	30 秒	1	激活热启动 DNA 聚合酶，消除冷启动效应
扩增循环			40	荧光信号采集点：每循环退火/延伸结束
变性	95℃	5 秒		双链 DNA 解链
-退火/延伸	60℃	30 秒		引物结合与链延伸（退火温度根据引物 Tm 值调整）
熔解曲线分析	65℃→95℃	连续升温	1	每升温 0.5℃持续 5 秒，监测荧光信号（用于验证产物特异性）

5.10 启动设备，选择 SYBRGreen 程序，标注样本和引物，等待结果。

5.11 取出仪器中的 96 孔板，拷贝好数据。

5.12 分析处理数据，计算出 ΔCT 、 $\Delta\Delta CT$ 、 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值。

六、实验结果

qPCR 实验结果显示，熔解曲线出现多个峰，部分样本在主峰附近出现额外的次级峰或肩峰，表明存在非单一扩增产物。不同样本间的熔解峰 T_m 值存在差异，提示扩增产物可能不一致。此外，扩增曲线的平台期荧光信号高度不均一，部分样本的平台期信号显著高于或低于其他样本，表明扩增效率或起始模板量存在较大变异。

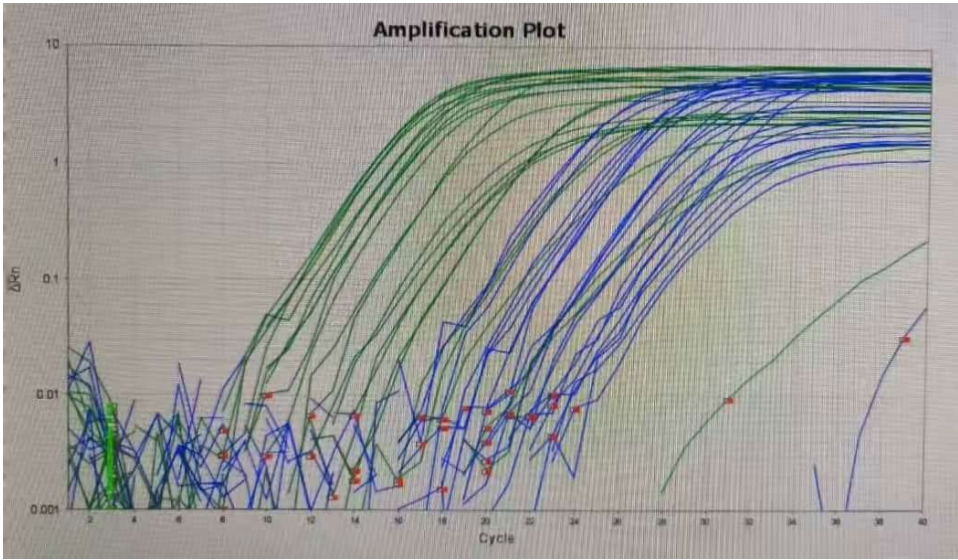


图 2 部分样本扩增曲线

2025 年国际定向进化大赛实验记录

实验时间： 2025 年 6 月 21 日 13:30 — 2025 年 6 月 21 日 16:30

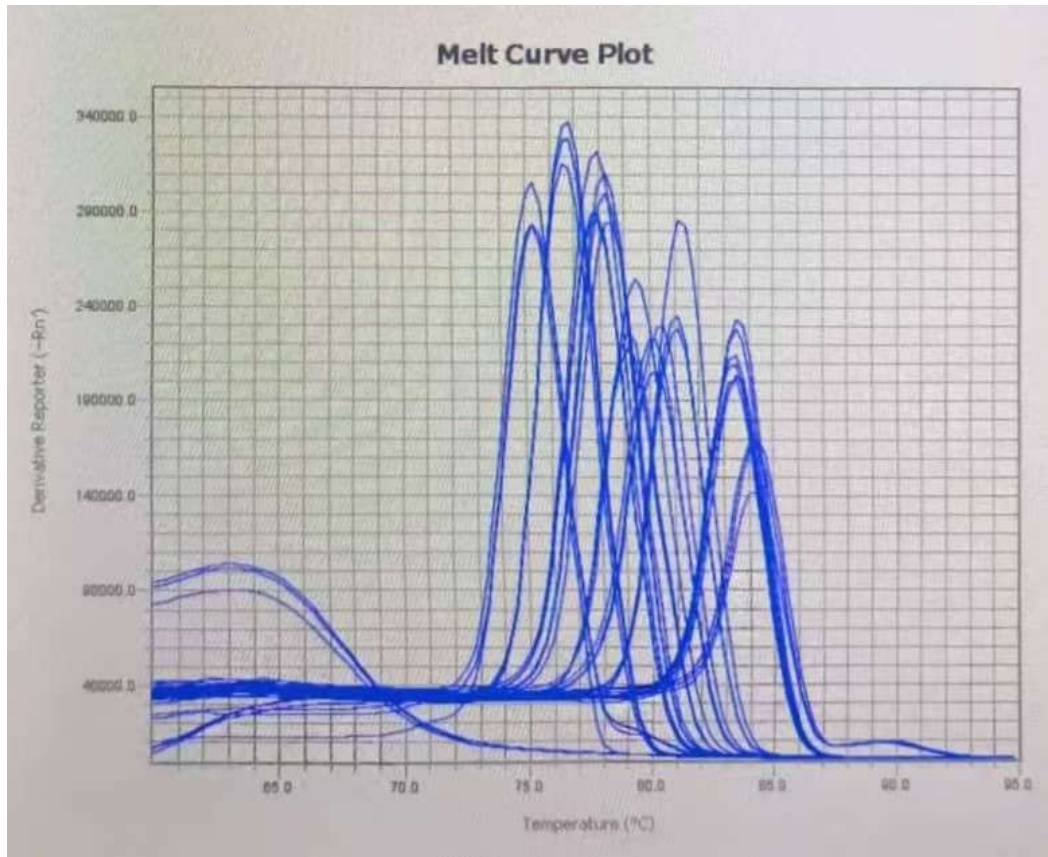


图 3 部分样本熔解曲线

七、结果分析

熔解曲线多峰现象提示可能存在以下问题：（1）出现了引物二聚体；（2）非特异性扩增（需结合扩增产物凝胶电泳验证）；（3）基因组 DNA 污染（设计跨内含子引物可规避）。

扩增曲线平台期差异显著可能源于：（1）模板浓度测定误差（可采用荧光定量仪重新测定）；（2）加样操作偏差（改用排枪加样）；（3）PCR 抑制剂残留（通过 1:5 模板稀释实验验证）。

根据可能的问题，我们对接下来的实验方案作出如下调整：（1）对所设计的引物重新用 Primer-BLAST 验证特异性；（2）重新铺板提取 RNA；（3）进行梯度 PCR（55-65℃）优化退火温度；（4）添加 DMSO（2-5%）改善高 GC 模板扩增；（5）对所有 cDNA 模板进行 1:5 稀释验证抑制效应；（6）使用校准后的排枪进行三重复加样；（7）若问题持续，改用 TaqMan 探针法提高特异性。通过上述调整，预期可显著提升 qPCR 结果质量，为后续分析基因表达与耐药性的关联提供可靠数据。