

## qPCR(-)

### 一、实验目的

对正低、中、高耐药株T24-RC48的RNA进行逆转录获得cDNA后，通过实时荧光定量PCR检测特异性基因表达水平并进行定量分析，来鉴定差异。

### 二、实验内容

本实验通过实时荧光定量PCR技术，对T24野生型细胞株及低/中/高度耐药株cDNA和RNA进行逆转录及基因表达定量分析。

2.1 实验设计 首先，从-80°C冰箱取四种耐药细胞株(T24-RC48)冻存cDNA样本，室温解冻后瞬时离心，置于冰上备用；接着，从-20°C冰箱取ROX Reference Dye、RNase-free ddH<sub>2</sub>O及特异性基因(PD-L1、VEGF等)的正反引物，冰上缓慢解冻；然后，按照预设体系(每组合cDNA 15μl、ROX 7.5μl、正/反向引物各3μl、ddH<sub>2</sub>O 54μl)配制qPCR反应液，并分装；随后，按照预设96孔板布局，将反应液加入对应孔位；最后，将96孔板放入实时荧光定量PCR仪，设置变性(95°C 5s)、退火/延伸(60°C 3s)循环程序(40个)。

2.2 样本类型 T24野生型、低/中/高度耐药T24-RC48细胞株cDNA。

2.3 测定原理 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结合的荧光染料或特异

性荧光探针，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对应 $\text{Ct}$ 值与起始模板成反比。通过标准曲线法或相对定量法即能精算原始DNA浓度。

## 二、材料与试剂

### 3.1 材料

96孔国产光学反应板、光学封口膜(反转律)：均购自国产公司

RNAase Free 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CAPPN RNase-free ddH<sub>2</sub>O

## 四、实验仪器

移液器、台式低速低温离心机：购自Eppendorf 离心管：购自Corning.

实时定量PCR仪：ABI Quant Studio 5 1.5ml.

离心机(Cubee)：购自Genekreach

## 五、实验步骤

5.1 从-80℃冰箱取出上次冻存的四种cDNA EP管，撕去封口膜，室温放置5-10min充分融化；上下颠倒5-10次使之充分混匀，然后离心机离心至管底备用。

5.2 从-20℃冰箱取出ROX试剂、RNase-free ddH<sub>2</sub>O和特异性基因引物，冰上解冻。

5.3 设置一个引物基因有三个孔的组内对照，根据说明书计算出体积各试剂用量。

表 1 体系各试剂的加入量

	cDNA(μl)	ROX Reference Dye(μl)	正向引物(μl)	反向引物(μl)	RNase-free ddH <sub>2</sub> O (μl)
野生型	15 <sup>±2</sup>	75 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	
低度耐药	15 <sup>±2</sup>	75 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	54 <sup>±2</sup>
中度耐药	15 <sup>±2</sup>	75 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	54 <sup>±2</sup>
高度耐药	15 <sup>±2</sup>	75 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	3 <sup>±2</sup>	54 <sup>±2</sup>
					54 <sup>±2</sup>

上

5.4 使用量程为10μl和200μl的移液器，吸取上述量，分别加入“正”“低”“中”“高”新印管，轻混匀。

5.5 在板上编辑好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)：

| PDL1  | PDL1  | PDL1  | PDL1  | PDL1- | PDL1- | PDL1 <sup>±2</sup>  |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| VEGF  | VEGF  | VEGF  | VEGF  | VEGF  | VEGF  | VEGF <sup>±2</sup>  |
| RBPI  | RBPI  | RBPI  | RBPI  | RBPI  | RBPI  | RBPI <sup>±2</sup>  |
| ICAM1 <sup>±2</sup> |
DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP	DSP <sup>±2</sup>
IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B	IL1B <sup>±2</sup>
CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT	CAT <sup>±2</sup>
GAPDH <sup>±2</sup>						

图 1 96 孔板布局示意图

5.6 准备好12排八联管，按照位置关系向每个孔轻轻加入40μl 96qPCR体系溶液。

5.7 加样完成后，盖上盖，将12排八联管两两放入高速离心机进行1000rpm /min 离心，离心底部。

5.8 取出96孔板和托板，将八联管按顺序放入托板中，不要用手碰96孔板中部、底部。

5.9 将96孔板放入9PCR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

反应阶段 <sup>±2</sup>	温度 <sup>±2</sup>	时间 <sup>±2</sup>	循环数 <sup>±2</sup>	备注 <sup>±2</sup>
预变性 <sup>±2</sup>	95°C <sup>±2</sup>	30 秒 <sup>±2</sup>	1 <sup>±2</sup>	激活热启动 DNA 聚合酶，消除冷启动效应 <sup>±2</sup>
扩增循环 <sup>±2</sup>	±2	±2	40 <sup>±2</sup>	荧光信号采集点：每循环退火/延伸结束 <sup>±2</sup>
变性 <sup>±2</sup>	95°C <sup>±2</sup>	5 秒 <sup>±2</sup>	±2	双链 DNA 解链 <sup>±2</sup>
退火/延伸 <sup>±2</sup>	60°C <sup>±2</sup>	30 秒 <sup>±2</sup>	±2	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 <sup>±2</sup>	65°C→95°C <sup>±2</sup>	连续升温 <sup>±2</sup>	1 <sup>±2</sup>	每升温 0.5°C 持续 5 秒，监测荧光信号（用于验证产物特异性） <sup>±2</sup>

5.10 启动设备，选择 SYBR Green 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 $\Delta CT$ 、 $\Delta\Delta CT$ 、 $2^{\Delta\Delta CT}$ 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，表明存在非常单一扩增产物。此外，扩增曲线平台期荧光信号高度不均一，部分的平台期信号显著高或低于其他样本，表明效率或起始量存在较大差异。

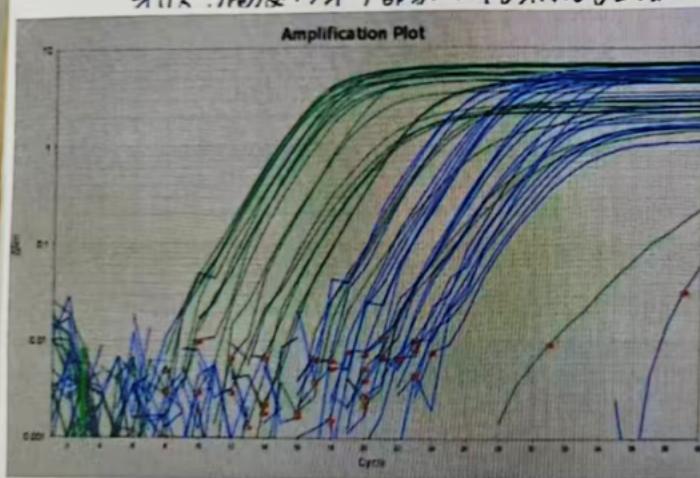


图2 部分样本扩增曲线

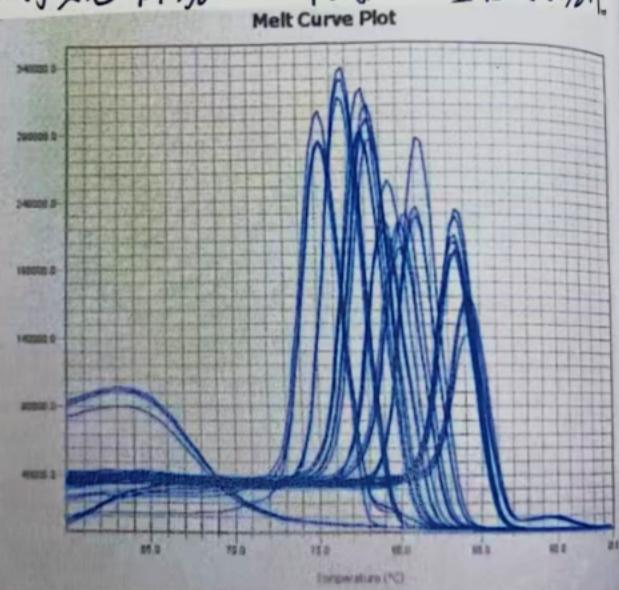


图3 部分样本熔解曲线

## 七、结果分析

熔解曲线多峰现象可能存在以下问题：(1)出现了引物二聚体；(2)引物特异性扩增；(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；(2)加样操作偏差（改用排枪加样）；(3)PCR抑制剂残留。

根据可能问题，我们做出以下调整：(1)对引物重用Primer-BLAST验证特异性；(2)重新铺板提取RNA；(3)梯度PCR(55-65°C)优化退火温度；(4)添加DMSO(2-5%)；(5)对cDNA模板进行1:5稀释实验抑制效应；(6)使用校准后的排枪进行三重复加样。