

提 RNA，逆转录，RT-qPCR（孙师姐整理）

1. 细胞总 RNA 的提取

（1）吸弃培养皿中原有培养基，添加 1 mL PBS，充分润洗培养皿后吸弃，重复一次，完全洗去原有培养基后，加入 1 mL Trizol，轻轻摇晃培养皿使其均匀覆盖整个底面，静置 5 min 后，将混合液转移至离心管中，如不立即提取 RNA，可做好标记液氮速冻后置于-80 °C 冰箱长期保存。

（2）如立即提取 RNA，则打开离心机降温至 4 °C，再向 Trizol 和细胞的混合液中添加 200 μ L 的氯仿，轻轻颠倒混匀 10~20 次，使氯仿和 Trizol 充分混匀，室温静置 5 min，结束后放入 4 °C 离心机 13000 rpm 离心 15 min。

（3）离心结束后，小心吸取上清液，尽量不要吸到下层的 Trizol 和中间的蛋白层，将上清液转移至新的无酶离心管中，再添加 450 μ L 异丙醇，立即上下颠倒离心管，使其混合均匀，室温静置 5 min 或 4 °C 静置 2 h。

（4）静置结束后，置于 4 °C 离心机 13000 rpm 离心 15 min，在离心管底部出现小沉淀团块，弃上清，每管加入 750 μ L 新鲜配制的 75%乙醇，轻弹离心管，将其置于 4 °C 离心机 13000 rpm 离心 5 min，重复该步骤，使用 75%乙醇清洗沉淀两次。

（5）吸弃 75%乙醇，置于通风橱内吹风 5 min 吹干，避免乙醇污染。

（6）视沉淀大小加入适量 DEPC 水溶解，充分混匀后使用 Nanodrop 测定浓度，置于冰上备用或液氮速冻后置于-80 °C 冰箱长期保存。

2. 逆转录反应

（1）一般取 RNA 质量 1 μ g，根据上面所测浓度进行计算，计算 RNA 所需体积。取出所需试剂，依次加入 200 μ L 的 PCR 管中，反应体系见下表

2.12。设置 PCR 程序：42 °C , 2 min。

表 去总 RNA 中基因组 DNA 反应体系 (10 μ L)

反应试剂	体积
Total RNA	volume of 1 μ g RNA
4 \times gDNA wiper Mix	4 μ L
RNase Free ddH ₂ O	up to 16 μ L

(2) 待去除基因组 DNA 反应结束后, 取出 PCR 管, 并向管中添加 4 μ L 的 5 \times HiScript III qRT Super Mix, 涡旋混匀后, 瞬离至管底并于 PCR 仪中进行第二步反应, 具体程序设置为: 37 $^{\circ}$ C, 15 min; 85 $^{\circ}$ C, 5 s。反应结束后共获得 20 μ L 体积的 cDNA, 视实验需要对其进行稀释或冻存, 短期保存可置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱, 长期需置于 -20 $^{\circ}$ C 保存。

表 逆转录反应体系 (20 μ L)

反应试剂	体积
MIX I	10.0 μ L
5 \times Evo M-MLV RT Reaction Mix Ver.2	4.0 μ L
RNase Free ddH ₂ O	6.0 μ L
Total volume	20.0 μ L

3. 逆转录实时荧光定量 PCR (Reverse Transcription Real-Time Quantitative PCR, RT-qPCR)

可使用 NCBI 或 Primer Bank, 针对所检测的基因设计引物, 进行 qPCR 前, 需设计引物及 cDNA 的排布方式。实验室常用的 qPCR 体系为 20 μ L, 每个 cDNA 的每种引物做三个复孔保证准确度。qPCR 仪条件设置为: 1 个循环: 95 $^{\circ}$ C, 30 s; 40 个循环: 95 $^{\circ}$ C, 15 s; 60 $^{\circ}$ C, 30 s。具体反应体系如表 2.20 所示。

表 qPCR 反应体系 (20 μL)

反应试剂	体积
Forward Primer (10 μM)	0.4 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.4 μL
Template cDNA (5~50 ng/ μL)	1 μL
RNase Free ddH ₂ O	8.2 μL
2 \times Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μL
Total volume	20 μL