

## 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 μL 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 μL 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 μL 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 μg, 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 μL 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 μL)

反应试剂	体积
Total RNA	volume of 1 μg RNA
4×gDNA wiper Mix	4 μL
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	up to 16 μL

(2) 待去除基因组 DNA 反应结束后, 取出 PCR 管, 并向管中添加 4 μL 的 5×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 °C, 15 min; 85 °C, 5 s。反应结束后共获得 20 μL 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 °C冰箱, 长期需置于-20 °C保存。

表 逆转录反应体系 (20 μL)

反应试剂	体积
MIX I	10.0 μL
5×Evo M-MLV RT Reaction Mix Ver.2	4.0 μL
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	6.0 μL
Total volume	20.0 μL

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 μL, 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 °C, 30 s; 40 个循环: 95 °C, 15 s; 60 °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 (10μM)	0.4 μL
Reverse Primer (10μM)	0.4 μL
Template cDNA (5~50 ng/μL)	1 μL
RNase Free ddH <sub>2</sub> O	8.2 μL
2×Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix	10 μL
Total volume	20 μL