

HaiGene mRNA定量整套解决方案

— RNA提取、反转录、RealTime PCR

货号	名称	规格	价格（元）
B0201	TRIzol Reagent	100 ml	500
D0301	Golden MLV Reverse Transcriptase	10,000 U/50,000 U	300/1250
D1101	Rnase inhibitor	2,000U	120
D0401	Golden 1st cDNA Synthesis Kit	100 T	1000
A2201	Golden HS SYBR Green qPCR Mix	100T/500T/5000T×20μl	300/1000/8500
A2301	Golden HS TaqMan qPCR Mix	100T/500T/5000T×20μl	300/1000/8500
A0302	dNTP Mixture (10 mM each)	1ml	220
A1001	20XOligo dT(25)&Random Primer	50ul/1ml	50/500
S0105	Rnase Free TE Buffer	1ml×10	50
S0176	Rnase Free H2O	1ml×10	50
P1507	GAPDH内参引物（人）	250T×20μl	免费
P1508	β-actin内参引物（人）	250T×20μl	免费
P1509	GAPDH内参引物（鼠）	250T×20μl	免费
P1510	β-actin内参引物（鼠）	250T×20μl	免费

总RNA提取.....	1-3
RNA反转录反应.....	4-5
SYBR Green qPCR反应.....	6-8
数据分析.....	9
英文撰写材料与方法.....	10



400-0470-600



info@haigene.cn



www.haigene.cn

应用RealTime PCR技术进行基因表达定量研究已有20多年的历史，与常规PCR相比，因其特异性更强、操作更加简便、自动化程度更高等优势而更加广泛的应用于分子生物学的各个领域。应用该方法获得的数据可靠性和重复性高，用于低拷贝基因的定量检测时通常可以获得理想的试验结果。Realtime PCR技术虽然操作简单，但有些细节如处理不好，缺乏标准操作流程，会造成试验结果不稳定、可靠性差等问题。在此，HaiGene为您推荐一套由实践经验总结的稳定的mRNA定量研究方案，希望有助于您的科学研究。

mRNA的RealTime PCR定量研究总体包括三个步骤：第一步，从样品中提取获得总RNA；第二步，由于真核系统mRNA具有多聚A尾巴，可采用Oligo dT引物进行反转录，从而获得第一链cDNA；第三步，设计特异性的上下游引物进行SYBR Green PCR扩增（特异性要求极高的可选择再增加一条TaqMan探针，进行探针法RealTime PCR扩增），并进行结果分析。

一、总RNA的提取

总RNA的提取推荐使用TRIZOL试剂，TRIZOL试剂采用沉淀的方法获得总RNA，这比离心柱型方法获取的总RNA产量更高，从而保证了提取样本中RNA的表达信息更接近组织中的真实情况，这对定量研究来讲至关重要。此外，TRIZOL试剂适用性广，包括动植物组织、血液、细菌、病毒等样本，绝大部分样本采用TRIZOL试剂提取均能获得高质量的总RNA。

1. 试验前准备

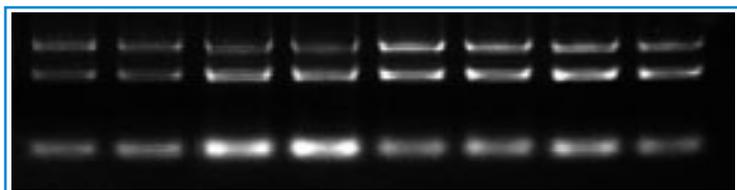
所有的器皿（剪刀、镊子、研钵）最好用0.1% DEPC水浸泡24h（不用DEPC处理问题也不大，但要高压灭菌），一次性EP管、枪头不用处理，可直接使用。组织样品要分装到多个EP管中，每管0.5g就可以了（可提取3~4次），每次取一管，避免样品反复冻融。每次取0.1~0.2g进行研磨。样品液氮下研磨效果最佳，电动组织研磨器（做好防护）室温研磨也可。细胞样品提取RNA用于RealTime PCR，通常6孔板的一孔细胞（~95%融合）就足够。通常可在培养板中直接加入TRIZOL试剂裂解提取总RNA，也可用胰酶消化后再加入Trizol试剂提取。

2. 总RNA提取

步骤	细胞	全血	动植物组织
1. 样品预处理	选择对数期生长的细胞，弃除培养液，用1XPBS清洗一次，尽可能移除多余的溶液。 悬浮细胞直接离心收集底部细胞团块。	全血要使用淋巴细胞分离液，分离出100 μ l白细胞。	将样品转移至用液氮预冷的研钵中，用研杵研磨组织，其间不断加入液氮，直至研磨成粉末状。
2. 加入TRIzol	每10 cm ² 的细胞加入1ml TRIzol试剂，使裂解液均匀分布于细胞表面，然后使用移液枪吹打细胞使其脱落。将细胞的裂解液转移至1.5ml EP管中。	加入1ml TRIzol。	将研磨好的组织加入到装有1ml TRIzol的1.5ml EP管中。
3. 裂解样品	加入TRIzol后立即手腕用力上下颠倒至细胞、组织粉末等分散均匀，无肉眼可见块状物。室温静置5min，使核酸蛋白复合物完全分离。		
4. 加氯仿	加入0.2ml氯仿，手腕用力振荡15s，室温放置2min。		
5. 离心分层	13,000rpm离心10min，吸取600 μ l无色上清至新的1.5EP管中。		
6. 加异丙醇	向上述600 μ l上清液中加入600 μ l异丙醇，手腕用力上下颠倒数次，于-20 $^{\circ}$ C放置5min。		
7. 沉淀总RNA	13,000rpm离心10min，小心倒掉上清，留取底部总RNA沉淀。		
8 漂洗总RNA	向沉淀中每管加入1ml 70%乙醇，上下颠倒数次，13,000rpm离心5min，小心倒掉上清，留取底部RNA沉淀。		
9. 漂洗总RNA	重复步骤8再洗涤一次。		
10. 挥发乙醇	倒掉洗液，再次短离心10s后，用10 μ l Tip吸头吸掉剩余的洗液，置于室温使乙醇挥发干净（~20min）。		
13. 溶解RNA	每管加入50~100 μ l RNase Free TE Buffer或 RNase Free H ₂ O溶解总RNA。		

3.总RNA电泳

获取总RNA后，通常要进行电泳检测RNA是否完整或发生降解。RNA电泳一般采用甲醛变性琼脂糖电泳，这种方法相对比较麻烦。建议加入RNA Loading Buffer后，60℃加热5min，冷却至室温后直接进行普通琼脂糖电泳，完整的总RNA应该具有三条条带，真核生物的包括28s、18s和5s，其中第一条亮度为第二条的2倍左右，第三条相对前两条亮度要弱。如发生拖尾即RNA发生降解，第三条带亮度比前两条亮，表示RNA发生部分降解。

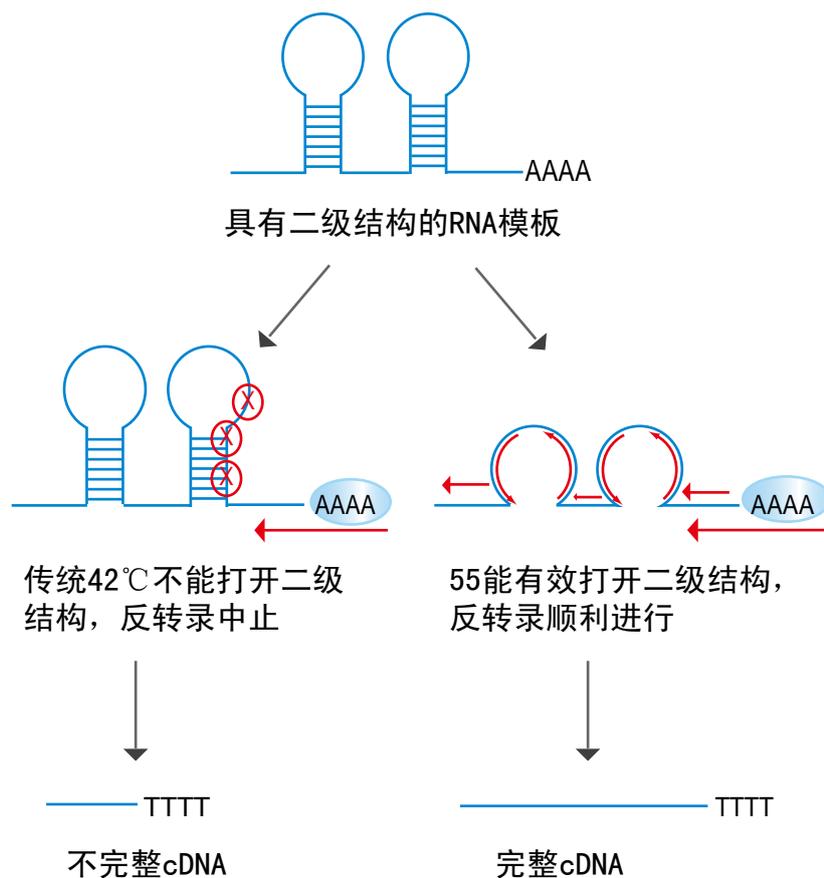


4.总RNA浓度测定

总RNA电泳检测后，可用RNase Free TE Buffer稀释10~50倍后，分光光度计测定OD260和OD280，然后计算RNA浓度。OD260/280比值在1.9~2.1表示RNA的纯度较好，使用TRIzol试剂提取的总RNA OD260/280比值有时会出现低于1.8，这种情况对后续反转录试验无明显影响，这是由于残留一些盐和多糖，还有一个原因是RNA的浓度过高（将样品再稀释5倍后，再测定会有改善）。根据OD260的数值和稀释倍数进行浓度计算。RNA浓度($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)= $0.04 \times \text{OD260值} \times \text{稀释倍数}$ ，如稀释50倍后，测定OD260=0.5，则RNA浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。测定完RNA浓度后取出部分RNA，用RNase Free TE Buffer将所有检测样品调整到相同的浓度（如调整到 $0.25\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 或 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，这个取决于所有样品中最低的那个样品浓度）。

二、RNA反转录

RNA分子的某些区域可以自身回折碱基配对形成发夹结构，即RNA的二级结构。RNA的二级结构的存 在使得反转录效率大大降低。RNA反转录的核心试剂即MLV反转录酶，成功的反转录反应应该不受 RNA二级结构的影响，但市面上大多数MLV反转录酶反应温度都在42℃进行，很难打开模板RNA的二级结构，而海基自主研发改良的第四代Golden MLV反转录酶可在55℃进行反转录反应，这样就最大程度地消除次级结构的负面影响，而获取完整的第一链cDNA，从而提高复杂RNA模板的扩增性能、提高反转录cDNA的长度和产量，进而提高了后续定量检测的真实性、重复性和可靠性。



根据实验需要选择合适的实验方案：

A. 对于不含基因组DNA污染(或含量很低)的样品、含基因组DNA污染但其不影响后续实验的情况，可不使用gDNA Remover处理样品，直接进行反转录反应。试验操作如下：

1. 按以下组分配制反转录反应液

Total RNA or Poly(A) RNA	0.1-2 μ g
5XGolden RT MasterMix	4 μ l
*20 \times Oligo dT(25)&Random Primer	1 μ l
Rnase Free H ₂ O	Up to 20 μ l

*注：反转录引物可根据需要改用特异性引物。

2. 在PCR仪上按以下条件进行反转录反应：

30°C	15min
55°C	30~60min
85°C	10min
4°C	

B. 对于含基因组DNA污染的样品，并且其影响后续实验的情况，可使用gDNA Remover去除基因组DNA污染后再进行反转录反应。试验操作如下：

1. 按以下组分去除gDNA污染

Total RNA or Poly(A) RNA	0.1-2 μg ($<4\mu\text{l}$)
5XgDNA Remover	1 μl
Rnase Free H ₂ O	Up to 5 μl

置于PCR仪上37°C孵育10min。

2. 孵育完毕后加入0.5 μl 10 \times RD Stop Buffer混合均匀后放于PCR仪上75°C 5min失活DNaseI。

3. 向上述5 μl RNA样品中加入反转录试剂进行反转录反应

Rnase Free H ₂ O	10 μl
5XGolden RT MasterMix	4 μl
*20 \times Oligo dT(25)&Random Primer	1 μl

*注：反转录引物可根据需要改用特异性引物。

4. 在PCR仪上按以下条件进行反转录反应：

30°C	15min
55°C	30~60min
85°C	10min
4°C	

三、SYBR Green PCR扩增

1. 引物设计

引物的设计对于RealTime PCR来讲至关重要，是整个试验的核心部分。引物设计的好，无论操作多么粗放，都能获得准确的试验结果。引物设计不好，后续需要做很多条件优化。设计引物这一步不要怕花费时间，要认真设计和分析，后续将会节约时间和试剂。设计引物时请注意以下事项：

- (1) 首先查阅参考文献，文献中报道使用的引物。
- (2) 内参基因常用有 β -actin、GAPDH，HaiGene有测试过的引物...，可以email免费索取。
- (3) 引物的纯化级别，RPC纯化级别的完全可以，PAGE纯化的要更好一些。
- (4) 进GenBank查询到mRNA全序列，注意是全序列，不是particle序列。没有全序列的也可用particle序列。将基因序列放置到BLAT (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) 中进行比较，从而判断出外显子的交界，用不同颜色区分并标记出来，这样将方便你判断引物是否横跨外显子。

(5) 引物的设计原则：引物长度18~30bp，产物长度100~250bp， T_M 值55~65°C，引物尽量靠近3'端、尽量避免二聚体、尽量横跨外显子，设计软件为Premier5。

(6) 特殊情况：

- ①如果基因本身GC含量很低 (<30%)，引物要增加长度（最长可到30bp），以保证 T_M 值和特异性。
- ②如果基因本身GC含量很高 (>70%)，此种情况下，往往会出现很多非特异性结合位点，引物不要太短（最长可到25bp），要保证特异性，不要担心 T_M 值过高，要控制好引物二聚体，可适当增加产物长度。也可以向HaiGene公司索取5XQ Solution试剂来解决高GC含量的问题。
- ③如果本身基因重复结构比较多，此种情况下，往往会出现很多非特异性结合位点，引物不要太短（最长可到30bp），要保证特异性。过多的重复结构，要使用探针法，以增强特异性。
- ④如果基因的3'端外显子过于庞大（这种情况比较常见），则首先要保证引物的扩增性能、特异性、无二聚体，然后再保证横跨外显子（这是最后考虑的因素，不要担心引物没有横跨外显子，反转录试剂盒里面有去除基因组影响的试剂）。
- ⑤总之，从参数的重要性来看，扩增效率>引物二聚体>非特性结合，你要是自己还是没有信心的话，可以将序列发给HaiGene公司，我们负责免费设计。
- ⑥每个基因最好一次合成3对，进行测试，最后选取1对用即可。引物工作液稀释：按照标签上的nmol数，用RnaseFree TE Buffer稀释到10 μ M浓度。

2. 反应体系配制和优化

HaiGene的Golden HS SYBR Green qPCR Mix（货号：A2201）采用化学封闭DNA聚合酶，低温下无任何扩增活性，只有95°C加热15min才能启动聚合反应，因此其能最大限度的提高扩增特异性和减少引物二聚体。

(1) 根据机型选择步骤A或B

A: 需要添加ROX染料进行反应孔间信号矫正的Real-Time PCR仪，包括：ABI PRISM7000/7700/7900HT, 7300/7500/7500 Fast Real-Time PCR (Applied Biosystems); Mx3000P (Stratagene)等。按照如下组分配制20 μ l PCR反应体系：

		终浓度
5XGolden HS SYBR Green qPCR Mix	4 μ l	1X
50XROX Reference Dye	0.4 μ l	1X
PCR Forward Primer(10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
cDNA 模板	0.5~2 μ l	
ddH ₂ O	Up to 20 μ l	

B:无需添加ROX染料进行反应孔间信号矫正的Real-Time PCR仪，包括：LightCycler (Roche Diagnostics); MiniOpticon、Opticon2、MyiQ 2、CFX96 Real-Time PCR(Bio-Rad & MJ); LineGene(Bioer, 杭州博日)等。按照如下组分配制20 μ l PCR反应体系：

		终浓度
5XGolden HS SYBR Green qPCR Mix	4 μ l	1X
PCR Forward Primer(10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
PCR Reverse Primer(10 μ M)	0.4 μ l	0.2 μ M
cDNA 模板	0.5~2 μ l	
ddH ₂ O	Up to 20 μ l	

通常20 μ l的反应体系加入0.4 μ l 10 μ M的引物，如果引物二聚体和非特异性扩增严重，减少引物用量到0.1~0.2 μ l；如果扩增效率差可将引物用量提高到0.8~1 μ l。

(2) 进行Real-Time PCR反应,通常采用两步法，程序如下：

Stage 1: 95 $^{\circ}$ C	15min*
Stage 2: 95 $^{\circ}$ C	10s
60 $^{\circ}$ C	30s 35~40 cycles
Stage 3: Dissociation analysis	

注意：由于该酶为化学修饰的热启动Taq DNA聚合酶，必须于95 $^{\circ}$ C加热15min才能恢复酶的活性，该热启动步骤不能缩短时间。

PCR的反应程序对试验还是有一定影响的，大部分引物采用厂家推荐的两步法都能获得不错的结果。首次引物测试试验就可以使用推荐的两步法条件（95℃ 10s； 60℃ 30s ;40个循环）。如果效果不好，则根据情况进行调整。

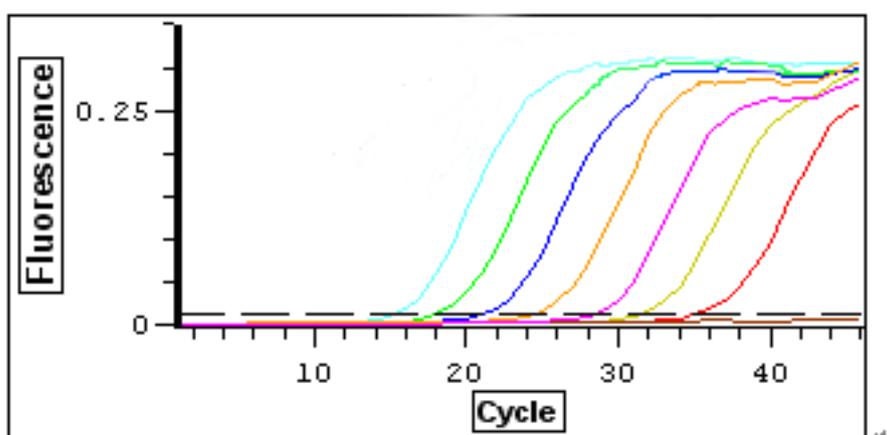
(1) 扩增效率差（信号弱）、引物比较短，则加大引物用量，采用3步法（95℃ 10s； 55℃ 10s ; 72℃ 40s； 40个循环）。

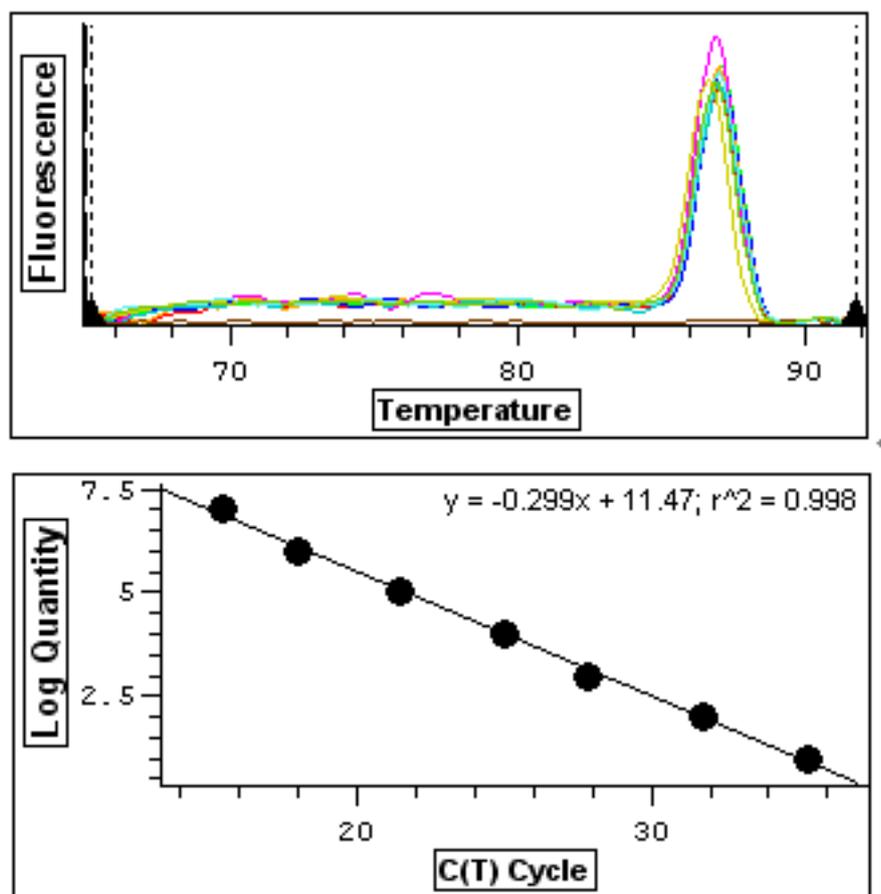
(2) 引物二聚体严重（这种情况比较多），则减少引物用量，采用2步法（95℃ 10s； 65℃ 30s； 40个循环）或者3步法（95℃ 10s； 55℃ 10s ; 72℃ 30s； 40个循环）。尽管做了很多优化，引物二聚体在某些情况下还是很难避免的，此时就要分析这种引物二聚体对试验结果有无影响，如果最后阳性样品溶解曲线里面没有双峰，空白样品—阳性样品的Ct值>5，这时引物二聚体影响在3%左右，对定量试验来讲就可以忽略不计。还有一种常见现象是引物刚开始使用时没有二聚体形成，用一段时间后，逐渐出现引物二聚体，这主要是引物自身形成聚合体，一旦形成聚合体就很难打开。针对这种情况，可以使用去离子甲酰胺溶解引物，这样能很好的减少二聚体的形成（引物很容易溶解在去离子甲酰胺中，也非常稳定）。

(3) 有非特异性产物（双峰），则减少引物用量，采用3步法（95℃ 10s； 55℃ 10s ; 72℃ 30s； 40个循环）。

(4) 对于GC含量高的基因，通常问题比较多，引物二聚体、非特异性扩增、扩增效率都会有问题，可在反应体系里面加入5%DMSO或使用HaiGene试剂盒里的5×Q-Solution，通常采用3步法（95℃ 10s； 55℃ 10s ; 72℃ 30s； 40个循环）。

3、反应结束后确认Real-Time PCR的扩增曲线、融解曲线和标准曲线。





4. 数据处理

定量结束后根据目的基因X的Ct值和内参基因的Ct值进行半定量分析，采用标准 $2^{-(\Delta \Delta Ct)}$ 法。

样品编号	1	2	3	4	5	6
X基因Ct值	X-Ct1	X-Ct2	X-Ct3	X-Ct4	X-Ct5	X-Ct6
GAPDH基因Ct值	GAPDH-Ct1	GAPDH-Ct2	GAPDH-Ct3	GAPDH-Ct4	GAPDH-Ct5	GAPDH-Ct6
$2^{-(X-GAPDH)}$ 基因表达值 (A值)	6个样品，每一个单独计算出来，如 $2^{-(X-Ct1-GAPDH-Ct1)}=0.000234\dots$					
总体均值 (B值)	6个样品表达A值的均值，由于大部分A值在0.001以下，所以再进行一步均值矫正，如均值为0.000185					
表达矫正值 (C值) A值/B值	6个样品表达A值与均值比较矫正，1号样品 $=0.000234/0.000185=1.26$ ，这样所有6个样品的表达值都会在1上下附近，便于不同基因之间进行做图。以上处理的数据可全部在Excel中完成。最后利用C值进行ANOVA统计数据处理。					

英文文章材料与方法撰写

Material and Methods for RealTime PCR

Briefly, tissues were homogenized with a Mortar under liquid nitrogen. Total RNA was isolated using TRIzol Reagent (HaiGene, Harbin, China) according to the manual. cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA at 30°C of 15min; 55°C of 60min; 85°C of 10min with Golden 1st cDNA Synthesis Kit (HaiGene, Harbin, China). Real-time PCR of HGF and CDH2 mRNA was performed in a LightCycler 480 (Roche Diagnostics) by using the Golden HS SYBR Green qPCR Mix (HaiGene, Harbin, China) under the following conditions: 95°C for 15min, 40 cycles of 95°C for 5s, and 60°C for 30s. To amplify the target genes, the following primers were purchased from Genscript (Nanjing, China): HGF, forward 5'-ATT TGG CCA TGT TTT GAC C-3' and reverse 5'-AGC TGC GTC CTT TAC CAA TG -3'; CDH2, forward 5'-TTA AAC TCC TGG CCT CAA GCA ATC-3' and reverse 5'-TTA AAC TCC TGG CCT CAA GCA ATC-3'; GAPDH qPCR primer was obtained from HaiGene (Harbin, China). Quantitative normalization of the cDNA in each sample was performed using the GAPDH gene as an internal control. Real-time PCR assays were performed in duplicate for each sample, and the mean value was used for the calculation of mRNA expression levels. The statistical analyses were done using Microsoft Excel (Microsoft) both to calculate the SD and to test for statistically significant differences between the samples using a T test. A value $P < 0.05$ was considered statistically significant.