

RT-PCR 实验步骤

一. 实验器具:

1. 移液枪: 1ml、200 μ l、20 μ l、10 μ l、2.5 μ l
2. 吸头: 1ml、200 μ l、20 μ l
3. 匀浆管: 5ml
4. EP 管: 1.5ml、500 μ l、200 μ l
5. 试剂瓶: 棕色试剂瓶(广口, 放 75%乙醇)
6. 量筒: 100ml
7. 容量瓶: 1000ml
8. 试管架: 5ml、1.5ml、20 μ l
9. 铝制饭盒: 1-2 个
10. 大瓷缸: 1 个
11. 锡箔纸: 一卷
12. 卷纸: 2 卷
13. 三角烧瓶: 带盖, 稍大

二. 实验器具处理

1. 塑料制品: (包括枪头、EP 管、匀浆管等)先将 DEPC 水从容量瓶中倒入瓷缸中, 将塑料制品逐个浸泡其中(注意: 小枪头要充分浸泡, 必要时需要针筒打入 DEPC 水), 过夜后取出(注意: DEPC 水很难自然晾干, 所以建议先将刚取出的 DEPC 物品甩干, 枪头装入枪头盒后甩干, EP 管和匀浆管装入饭盒后甩干, 然后在 37 度孵箱烘干)。高压后烤干备用。如果 DEPC 处理过的物品时间已超过一个星期, 再次使用前应再次高压。

2. 玻璃制品: 泡酸过夜, 冲洗干净, 先泡 1%DEPC 过夜, 再蒙锡纸烤干备用。

3. 匀浆器: (包括剪刀、镊子)先洗净后, 超声消毒即可(不需要泡 DEPC)。

三. 试剂配制

1. DEPC 水: 吸出 1ml DEPC 放在 1000ml 容量瓶中加双蒸水定容至 1000ml, 配成 1%DEPC 水, 并充分振荡混匀备用。

2. 75%乙醇: 用无水乙醇+DEPC 水配, 然后放-20 $^{\circ}$ C 保存(DEPC 水需先高压, 高压时注意: 1. 装 DEPC 水的瓶子在盖子和瓶之间要放上线头; 2. 高压时间在 40-45 分钟, 所以水要适当多加一点; 3. 高压结束后, 不要强行放气, 要让压力自然下降, 不然水会喷出)。

3. 异丙醇: 放入棕色瓶中。

4. 氯仿: 放入棕色瓶中。

5. 琼脂糖

四. 缓冲液配制

1. 电泳缓冲液(5 \times TBE 贮存液): Tris 54g、硼酸 27.5g、0.5M EDTA 20ml pH8.0、加蒸馏水至 1000ml。使用时, 将 5 \times TBE 稀释 10 倍成 0.5 \times TBE 就可以在电泳时使用(工作浓度)

2. 上样缓冲液(6 \times 缓冲液, 4 $^{\circ}$ C 保存): 0.25%溴酚蓝、0.25%二甲苯青 FF、30%甘油

五. 琼脂糖凝胶配制

1. 1.0%: 1.0g 琼脂糖+100ml 电泳缓冲液, 微波炉加热至沸腾(如果首次煮胶, 一定要煮透, 以不出现泡沫为标志), 熔化的琼脂物冷却至 60 $^{\circ}$ C 时加入 10mg/ml 溴化乙锭 2.5 μ l, 充分混匀, 将温热的凝胶倒入已置好梳子的胶膜中, 在室温下放置 30-45min(可以放入 4 度冰箱加快琼

脂糖凝固)后现进行电泳。

2. 1.5%: 同上, 将琼脂糖的量改为 1.5g

六. 需购置材料

Taq 酶(-20 度保存) (配 $10 \times$ buffer 和 $MgCl_2$): 不需要使用高保真 Taq 酶, 一般的就行。个人感觉天为时代的普通 Taq 酶就很不错。

dNTP (4 度保存): 向生物公司购买, 原装和分装均可。

oligo(dT)₁₅ (-20 度保存): 可以向生物公司购买 Invitrogen 合成的廉价货, 每支 10 元, 稀释后使用(注意稀释浓度), 也可以购买 Promega 的原装货, 稀释 10 倍后使用, 稀释液 4 度保存。

M-MLV (-20 度保存): 向生物公司购买, 推荐使用 Promega 的, 当然有钱可以购买更好的 AMV。

RNasin (-20 度保存): 向生物公司购买, 推荐使用 Promega 的, 原装分装均可。

DEPC (4 度保存): 向生物公司购买, 5 克足矣。

Trizol (4 度保存): 有 50ml 和 100ml 规格, 按照实验需要自己购买。国外进口的有 Invitrogen(Trizol)、罗氏(Tri Pure)、MRC(Tri Reagent); 国内的也行, 天为时代的就不错。

Marker (4 度保存): 按照目的条带大小购买, 推荐使用天为时代的 Marker(物美价廉, 上样 2.5ul 就很亮了, 较 3.0ul 的 Takara 同样品种 Marker 为亮), 本人很喜欢它的 DL2000。

电泳 Loading Buffer (4 度保存): 按照配方自己配制, 不需要购买(购买的话价格挺贵)。

七. 引物合成

1. 内参照: GAPDH(452bp) 正义: 5-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3

反义: 5-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3

2. 退火温度计算: $2(A+T)+4(G+C)$, 正反义平均数, 再上下波动 4-5 度。

3. 引物 2 OD 已足够, 每管 1 OD 分装。

4. 引物稀释: 加 DEPC 水量 (μl) = $X \text{ nmol/OD}(\text{合成的引物管上有标注}) \times \text{管上所标 OD 数}(\text{推荐每管引物为 1 OD 分装, 合成之前向公司说明这一点, 切记!!}) \times 100$ 。最终引物浓度为 $10 \text{ pmol} / \mu l$ 。

八. PCR 产物电泳

取 $1-10 \mu l$ (一般取 $5 \mu l$) PCR 产物, 加已点在纸上的 $6 \times$ 上样缓冲液, 反复吸打混匀后进行电泳, 一般用稳压状态进行电泳, 100V 左右, 电泳 20-30 分钟, 紫外灯下观察, 结果进行扫描保存。

九. 注意点: 1 逆转录后应立即冰水浴 2 RNA 抽提前, 打开离心机预冷

TRIZol 法抽提总 RNA

组织 100mg/细胞 1×10^7

↓

加 1ml TRIZol

↓

组织: 匀浆(彻底, 分几次打, 是匀浆时产生的热量能散出, 后转至 EP 管)

细胞: 用 1ml 加样器吹至液体澄清且无细胞团块

↓

颠倒混匀 10 下, 室温 5 分钟

↓

加氯仿 1/5 体积 (0.2ml) (必须按总体积的 1/5)

↓

颠倒混匀 10 下, 室温 5 分钟

↓

4℃, 离心 12000g, 15 分钟

↓

转上层水相 (约 400 μl) 于另一 1.5ml EP 管中

↓

加等体积异丙醇 (约 400 μl), 混匀室温 10 分钟

↓

4℃, 离心 12000g, 10 分钟

↓

弃上清

↓

加冰预冷的 75%乙醇 (DEPC 水配) 1ml

↓

4℃ 离心 7500g, 5 分钟

↓

弃上清, 空气干燥 5-10 分钟 (不能完全干燥)

↓

溶于 DEPC 水中

- 注意: 1. RNA 若用于核酸转移应溶解于样本缓冲液中, 否则 DEPC 溶解。
 2. 细胞组织加 TRIzol 匀浆后, 可在 -60℃ 放置至少一个月 (甚至可一年以上)。
 3. RNA 在 75%乙醇中, 2-8℃ 至少可保存一周, -20℃ 至少可保存一年。
 4. 弃上清的操作, 我们一般将 EP 管倒置在平铺于桌面的卷纸上, 吸干。
 5. 最后一步弃酒精, 将 RNA 溶于 DEPC 水的操作, 我们的做法是: 先按 4 的步骤吸干酒精, 其实这样还是不彻底的, 再将 EP 管小离心后用 20 μl 小枪头 (DEPC 处理过的) 吸出多余的酒精。最后用 200 μl 中枪头 (DEPC 处理过的) 吸 11.5 μl (20 μl 体系, 如果是 40 μl 体系则加倍) 的 DEPC 水至 EP 管中, 吹打助溶, 然后转移至 200 μl 的 EP 管 (这些 EP 管中可以事先加好 Oligo (dT)₁₅, 以节省枪头) 中。

两步法 RT-PCR

(第一步: 逆转录反应: 20 μl 体系, 如果是 40 μl 体系则加倍)

试剂	浓度	体积	终浓度
RNA		11.5 μl	
Oligo (dT) ₁₅	0.05 μg/μl	2 μl	0.005 μg/μl

(0.05 μg/μl Oligo (dT)₁₅ 为 Oligo (dT)₁₅ 原液稀释 10 倍的浓度)

↓

混匀, 离心, 70℃ 5min

↓

立即冰水浴, 稍离心

↓

试剂	浓度	体积	终浓度
M-MLV Buffer	5 ×	4 μ l	1 ×
dNTP	10mM	1 μ l	0.5mM
RNasin	40U/ μ l	0.5 μ l	20 μ
M-MLV	200U/ μ l	1 μ l	200U

总体积 20 μ l

↓

混匀, 离心, 42°C 60min

↓

95°C 10min (破坏 M-MLV)

↓

4°C 保存

(第二步: PCR 反应: 总体积 20 μ l, 如果 50 μ l 体系, 相应加倍)

试剂	浓度	体积	终浓度
Taq Buffer	10 ×	2 μ l	1 ×
MgCl ₂	25mM	1.2 μ l	1.5mM
dNTP	10mM	0.2 μ l	
上游引物	10pmol/ μ l	0.4 μ l	
下游引物	10pmol/ μ l	0.4 μ l	
cDNA 模板		1 μ l	
DEPC 水		14.7 μ l	
Taq 酶	2.5U/ μ l	0.1 μ l	

↓

混匀

↓

95°C	5 分	预变性
94°C	30 秒	变性
X°C	30-40 秒	退火
72°C	30 秒	延伸
72°C	7 分	终末延伸

(28-36 循环, 4°C 保存)

注意: 1. Taq 酶、M-MLV、RNasin 等-20°C 保存, 操作时置于冰上。

2. dNTP 保存在 4 度即可, 勿反复冻融。

3. 如果一次做很多管, 可以先将共同需要的部分一起加(稍微多算一点, 例如 20 管分装, 可以加入 21-22 管的量, 因为枪头会吸附一定的液体, 可能有人认为这样会浪费试剂, 其实不然, 因为每管分开加的话试剂用量更多, 枪头吸附的试剂的量其实也是很可观的, 特别是国产的枪头, 这样做同时还能降低加样误差), 然后各管分装, 再加各自不同的部分。

4. 如果 200 μ l 的 EP 管在 PCR 过程中盖子容易炸开, 解决方法有: (1) 用封口膜将管口密封、(2) 最后每管加入液体石蜡进行液封。