

qRT-PCR实验

qRT-PCR，是Quantitative Real-time PCR的简称，也叫实时荧光定量PCR，是一种在DNA扩增反应中，以荧光化学物质测定每次聚合酶链式反应（PCR）循环后产物的总量，通过内参或者外参法对待测样品中特定DNA序列进行定量分析的方法。

qRT-PCR目前已成为不同样本间进行基因表达水平差异比较权威的方法。然而不适当的实验设计，没有足够的对照和重复，低质量的RNA样本，逆转录引物选择不理想，qRT-PCR的引物退火温度选择不当和数据分析方法不正确等都可能会成为影响qRT-PCR检测灵敏度的因素。

1.实验设计

由于RNA易降解对外在环境敏感，因此在实验条件或样本操作等各个环节都需要严格把控。

2.RNA抽提

RNA的抽提环境非常关键。由于RNA酶无处不在和其难以灭活的顽固本性，在实验的每一步，任何偶然的疏忽或不妥当的操作都有可能造成RNA酶的污染，从而导致整个实验的失败。因此，严格控制实验条件，避免任何可能的污染，是保证实验成功的关键：RNA抽提建议用专用的操作区，离心机、移液枪、试剂等均应专用；所用的耗材、溶液及试剂均应是RNase-free或经过DEPC处理过的；操作过程中应始终戴一次性橡胶手套，并经常更换，以防手臂上的细菌、真菌以及人体自身分泌的RNA酶造成污染；避免在操作中说话聊天并且要记得戴口罩以防RNA酶污染；提取过程应尽量保持低温环境并减少操作时间。

如果样本在采集后不能立即处理，则需要把样本保存于-80°C（样本直接冻存或保存于Trizol中）。

注：Trizol是一种新型总RNA抽提试剂，可以直接从细胞或组织中提取总RNA。苯酚的主要作用是裂解细胞，使细胞中的蛋白，核酸物质解聚得到释放。苯酚虽可有效地变性蛋白质，但不能完全抑制RNA酶活性，因此Trizol中还加入了8-羟基喹啉、异硫氰酸胍、β-巯基乙醇等来抑制内源和外源RNase（RNA酶）。

为缩短RNA抽提的操作时间，建议以10-20个样本的小批次来处理样本。

无论是Trizol手提RNA还是使用试剂盒抽提RNA都应包括DNaseI处理步骤以便去除基因组DNA污染。

3.RNA质量控制

在qRT-PCR中使用高纯度（无污染）和高完整性（无降解）的RNA是最基本的要求。不纯的RNA样品会抑制PCR反应，产生偏离的数据。使用部分降解的RNA会产生可变和不正确的定量结果。因此RNA样品的纯度和完整性是进行下游实验的最基本要求。

RNA质量如何检测？

RNA样品是否有蛋白污染可以通过OD260/280分光光度法来进行检测。比值在1.8-2.2之间则表示该RNA质量好，没有蛋白和苯酚的污染。RNA的完整性可通过甲醛变性琼脂糖电泳（普通的琼脂糖凝胶电泳也可）来观察。高完整性的RNA样品可明显地观察到28S和18S两条带，并且28S的条带亮度约是18S的两倍。若两条条带不明显，则提示RNA可能部分降解。

通过确保所有RNA样品的纯度和质量的一致性可以降低生物学重复的差异。

4. 逆转录

鉴于RNase在环境中广泛存在，我们建议在检验RNA的质量后将总RNA样本立即逆转录为cDNA。这种处理避免了RNA样品因反复冻融或其他不当操作而导致RNA降解。在逆转录步骤中，最关键的是抽提的RNA样品能否完整地覆盖基因组。使用mRNA末端配对引物（OligodTprimer）和mRNA序列随机位点配对引物（Randomprimer）的组合可以得到每个基因的逆转录产物群。此方法比单一的末端或随机位点配对引物进行逆转录得到的cDNA可以更好地覆盖基因组。为了减少不同生物学重复之间的差异，每次逆转录使用的RNA量和反应时间应相同。

逆转录后的cDNA可长期冻存于-20°C或-80°C。

引物的设计和目标序列的选择对有效地扩增和产物的特异性至关重要。目标序列应是唯一的，长度建议在75-300 bp之间，GC含量约50%-60%。目前有许多引物设计软件及在线设计网站，操作者应在设计和实验阶段保证扩增片段的特异性。建议引物的GC含量在50-60%之间，退火温度在55°C-65°C。

6. qRT-PCR的扩增与验证

PCR反应中引物与目的序列的退火温度选择非常关键。在合适的温度下，引物可有效地与其目标序列进行退火，并降低非特异性退火和引物二聚体的形成。在正式进行qRT-PCR之前应该对退火温度进行优化（可以通过做梯度PCR来优化）。PCR产物的特异性对于结果也至关重要。通过对PCR反应后的溶解曲线进行分析，可检测产物的特异性：溶解曲线应该显示出一个单一尖锐的峰。此外，应用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的大小是否正确。

7. 数据分析

在qRT-PCR实验中，内参基因被用来作为数据标准化的对照，以校正作为模板的cDNA所存在的数量差异。常用来作为内参的有GAPDH、 β -actin或rRNA。操作者应根据不同来源的样品选择不同的参照基因。进行相对基因表达分析普遍采用操作简便的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法，此方法的应用基础是目标基因和参照基因的扩增效率都接近100%并且相互间效率偏差在5%以内。所有实验组（Test）和对照组（Control）均应得到内参基因的CT值(CT reference)和

目的基因的CT值(CT target)，用各组的内参基因CT值归一目标基因的CT值：

$$\Delta CT (\text{test}) = CT (\text{target, test}) - CT (\text{reference, test}) \quad \Delta CT (\text{control}) = CT (\text{target, control}) - CT (\text{reference, control})$$

接下来，用对照组的 ΔCT 值归一实验组的 ΔCT 值：

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{test}) - \Delta CT (\text{control})$$

最后，计算表达水平比率：

$$\text{实验组目的基因相对对照组目的基因的表达量} = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

得到的结果是通过参照基因表达水平校准的实验组中目的基因相对于对照组中目的基因增加或减少的倍数。

8. 实验的重复性和重现性

在qRT-PCR的检测中，有两个可变因素可能会影响实验结果：一个是不同生物个体，组织或细胞等样本间基因表达水平的内在差异所导致的生物学差异；另一个是移液操作或移液器本身等原因导致的实验过程本身存在的技术差异。为减少生物学和技术差异的影响，一般认为在实验中至少要设置三个生物学样品重复且每个生物学样品至少应有三个技术性重复。

The end



• 一站式蛋白抗体发现服务

重组蛋白 · 抗体 · 噬菌体文库 · 诊断原料

武汉国家生物产业基地 · 光谷抗体发现与筛选公共服务平台