



qPCR 检测实验报告

一、实验器材及试剂

1、实验器材

名称	厂家	型号
立式冷藏柜	海尔	SC-332
电子天平	幸运	FA2204
S10 手持式高速匀浆机	上海菲桐仪器	S202404047
台式高速冷冻离心机	湖南恒诺仪器设备	2-16R
干式恒温器	申花	SH-G100
实验室超纯水机	砾鼎	MT-VF-20
涡旋混匀仪	JOANLAB	VM-500S
复合转子离心机	申花	SH-Mini7KS
全自动雪花制冰机	常熟市雪科电器	IMS-40
PCR 仪	杭州龙扬科学仪器	SC-96G
实时荧光定量 PCR 仪	赛默飞	QuantStudio5
超微量分光光度计	赛默飞	NanoDrop OneC

2、主要实验试剂

试剂名称	厂家	货号
Unizol 总 RNA 提取试剂 PLUS	科兔生物	KR702
UnionScript First-strand cDNA Synthesis Mix for qPCR	科兔生物	KR511
AceQ U+ Probe Master Mix	诺唯赞	Q113-02
1.5mL 离心管	科兔生物	KTL-15-P
10 μ L 吸头	科兔生物	KTX-H10-W
200 μ L 吸头	科兔生物	KTX-H200-W
1000 μ L 吸头	科兔生物	KTX-H1000-W
1250 μ L 吸头	科兔生物	KTX-H1200-W
单道移液枪 0.5-10 μ L	科兔生物	KTY-10



单道移液枪 2-20 μ L	科兔生物	KTY-20
单道移液枪 5-50 μ L	科兔生物	KTY-50
单道移液枪 10-100 μ L	科兔生物	KTY-100
单道移液枪 20-200 μ L	科兔生物	KTY-200
单道移液枪 100-1000 μ L	科兔生物	KTY-1000

二、实验原理

PCR 的基本工作原理是以拟扩增的 DNA 分子为模板，以两段分别与模板互补的寡核苷酸片段为引物，在 DNA 聚合酶的作用下，按照半保留复制的原则沿着模板链延伸直至完成新的 DNA 合成，经过不断循环直至完成扩增。而 qPCR,即实时荧光定量 PCR，则是在 PCR 反应中引入一种荧光化学物质，随着 PCR 反应的进行，荧光信号强度会随着 PCR 反应产物不断积累而等比例增加，通过荧光强度变化监测产物量的变化,从而得到一条荧光扩增曲线。

三、实验目的

1.qPCR 有助于揭示基因的表达模式。通过 qPCR 可以准确地测量特定基因在各种组织、细胞或疾病状态下的表达水平，从而为疾病的诊断、治疗和预防提供关键信息。

2.qPCR 有助于实现基因表达的定量分析。qPCR 则能够实现基因表达的定量分析。可以对基因的表达变化进行精确测量，进而深入理解基因表达的调控机制。

3.qPCR 还具有高灵敏度和高特异性。qPCR 凭借其高灵敏度，能够检测到极低浓度的 DNA。同时，通过使用特定的探针和引物，qPCR 能够准确地识别目标基因，避免假阳性和假阴性结果的产生。

一、实验步骤及注意事项

(一) 抽提 RNA

1.1 动物组织

a.取新鲜组织立即用液氮速冻，迅速转移至液氮预冷的研钵中充分研磨，期间不断加入液氮，直至研磨成粉末状(无明显可见颗粒)；

b.将研磨至粉末状的样品转移到离心管中，每 50-100mg 样品加入 1mL Unizol Reagent Plus, 匀浆处理；

c. 室温静置 5min 使核酸蛋白复合物完全分离）。



注意:样品体积一般不要超过 Unizol Reagent Plus 体积的 10%，若取样量过多会导致提取的 RNA 中有 DNA 污染。

1.2 贴壁细胞

a.倒出培养液，用 1xPBS 清洗一次

b.每 10cm² 培养面积生长的细胞加 1 mL Unizol Reagent Plus,反复吹打至无明显沉淀后转移至离心管中。

c.静置 5min。

1.2 悬浮细胞

a. 连同培养液一起倒入离心管中，8000xg，4°C离心 2min 收集细胞。

b. 每 5x10⁶-1x10⁷ 培养面积生长的细胞加 1 mL Unizol Reagent Plus,反复吹打至无明显沉淀后转移至离心管中。

c.静置 5min。

2.向上述裂解液中加入 1/5 UnizoL Reagent Plus 体积的 RNA Extraction Buffer，盖好盖管，剧烈振荡 15s 呈乳浊状，室温静置 5min。

3.12000×g 4°C离心 15min，此时样品分为 3 层，即上层无色的水相(含 RNA)、中间层和下层粉红色的有机相。小心吸取上层水相转移至新的离心管中。

4.加入等体积的异丙醇，上下颠倒混匀，室温放置 10min。

5.12000×g 4°C离心 10min,去上清，此时管底会出现白色胶状沉淀，即 RNA。

6.加入 1mL 75%乙醇(用 Rnase-free 水配制)洗涤沉淀。7,500×g 4°C离心 5min,弃去上清;

7.重复步骤 6;

8.室温晾干 5-10min.加入适量的 RNase-free 水溶解沉淀，必要时可用移液器轻轻吹打或在 55-60°C 孵育 5-10min。

(二)逆转录

1. 测 OD 值定量 RNA 浓度

(1) A260/A280 是 DNA 和 RNA 之间的关系，值应在 2.0 左右，否则可能是有 RNA 干扰；

(2) A260/A230 是 RNA 和有机杂质的关系，值应在 1.8 左右，否则可能是有杂质干扰。

2.去除基因组 DNA

在 RNase-Free 离心管中配制如下反应液(冰上配制):

组分	使用量
----	-----



RNA 模板	一般使用 1 μ g
dsDNase	1.0 μ L
10 \times dsDNase Buffer	1.0 μ L
NuLclease-Free Water	UP to 10 μ L

用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后按下列程序进行反应(反应结束后立即置于冰上):

温度	时间
37 $^{\circ}$ C	2-5min
65 $^{\circ}$ C	2min

注意：若 RNA 模板中基因组 DNA 含量较多，可适当延长 37 $^{\circ}$ C 孵育时间至 5min。

3.第一链 CDNA 合成(冰上配制)

组分	使用量
“第 1 步”的反应产物	10 μ L
UnionScript First-strand cDNA Sythesis Mix	4.0 μ L
Nuclease-Free Water	UP to 20 μ L

用移液器轻轻吹打混匀，瞬时离心后按下列程序进行反应:

温度	时间
25 $^{\circ}$ C	10min
50 $^{\circ}$ C	15min
85 $^{\circ}$ C	5min

(三) qPCR

1.按下表配制 qPCR 反应体系 (冰上配制)

组分	10 μ L 体系
AceQ U+ Probe Master Mix	5 μ L
Primer F(10 μ M)	0.15 μ L
Primer R(10 μ M)	0.15 μ L
Probe(10 μ M)	0.15 μ L
Template DNA	4 μ L
ddH ₂ O	UP to 10 μ L



2. 设置 qPCR 程序

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95°C	5min	1
循环	95°C	10s	40 cycles
	72°C	30s	

3. 结果处理

ΔΔCT 法:

A=CT(目的基因, 待测样本)- CT(内标基因, 待测样本)

B=CT(目的基因, 对照样本)- CT(内标基因, 对照样本)

$$K=A-B$$

$$\text{表达倍数}=2^{-K}$$

4. 引物信息:

Primer name	Sequence (5' to 3')	Length (bp)
	F:	
	R:	
	F:	
	R:	

仅供科研用途, 不可用于临床诊断!