

利用荧光实时定量 PCR 技术进行表达谱分析

翁小煜, 都浩, 欧阳亦聃*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: diana1983941@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 翁小煜, 都浩, 欧阳亦聃. (2018). 利用荧光实时定量 PCR 技术进行表达谱分析. *Bio-101* e1010115. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010115.

实验原理: 实时荧光定量 PCR 技术(Real-time PCR)是在常规 PCR 技术基础上发展而来的一种核酸定量技术。其基本原理是在常规 PCR 反应体系中加入荧光基团, 通过荧光信号的按比例增加来反应 DNA 量的增加, 从而对 PCR 产物进行实时监测, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析和检测。相较于常规 PCR 而言, 实时荧光定量 PCR 技术不仅实现了对 DNA/RNA 模板的定量分析, 而且具有灵敏度和特异性高、能实现多重反应、自动化程度高、无污染、实时和准确等特点。

实验目的: 目前实时荧光定量 PCR 技术正广泛应用于基因表达分析, 等位基因分析, CHIP 结果分析, 转基因生物检测等领域, 成为最为重要的核酸扩增和检测手段之一。本文仅以水稻表达谱分析为案例进行阐述。

关键词: 荧光实时定量 PCR, Real-time PCR, 基因表达

材料与试剂

1. 实时荧光定量 PCR 板及膜 (ABI)
2. 0.6 ml 及 1.5 ml tubes (AXYGEN)
3. 20 μ l、200 μ l 及 1 ml tips (AXYGEN)
4. SYBR premix Ex Taq (TaKaRa)

仪器设备

1. 2.5 μ l、10 μ l、20 μ l、200 μ l、1 ml 移液器
2. 实时荧光定量 PCR 仪 (ABI 公司, 7500 实时荧光定量 PCR 仪)

注：目前市面有多种实时荧光定量 PCR 的平台，如 ABI 公司的 7500，罗氏公司的 LightCycler 480，伯乐公司的 ICycler 等，本文以本实验室用到的 ABI 公司的 7500 实时荧光定量 PCR 仪为例进行阐述。

3. 离心机
4. 紫外分光光度计

实验步骤

1. cDNA 准备，根据不同的研究目的，对水稻各个发育时期的组织进行取样，例如叶片，叶鞘，根，茎，幼穗等，进行 RNA 抽提和反转录得到 cDNA，并用内参基因 (如 *Actin*, *Ubiquitin* 等)对 cDNA 进行常规 RT-PCR 扩增，确保 cDNA 质量和浓度基本一致。
2. 引物设计，实时荧光定量 PCR 扩增片段的设计一般遵循以下原则：
 - 1) 扩增片段长度在 70-200bp 为宜，片段越短扩增效率越高，但如果片段小于 70 bp，扩增片段很难与可能存在的引物二聚体区分。
 - 2) 扩增片段应尽可能避免连续的单碱基重复和二级结构的产生。
 - 3) 扩增片段优先考虑设计在基因的 3'端。
 - 4) 建议检测引物的扩增效率，扩增效率接近 100%的扩增能够保证试验的重复性。
3. 准备反应体系，在准备好 cDNA 样品和引物之后，即可制备样品表。一般每个样品会设置三个重复，同时设置三个重复的内参基因对照。按如下体系配置 PCR 反应：按如下体系分别配制 Mix1, Mix2 和 Mix3，并按先后顺序加入 cDNA (Mix1),引物 (Mix2)和 SYBR Green I/ROX (Mix3)。每个样品设置三个目的基因和内参基因的技术重复。

试剂		体积 (μl)
cDNA	Mix1	2
ddH ₂ O		4
正向引物 (2μM)		0.5
反向引物 (2μM)	Mix2	0.5
ddH ₂ O		5
SYBR Green I (2x)	Mix3	12.5
ROX Reference Dye II (50x)		0.5
		Total: 25 μl

注:

- 1) 由于实时荧光定量 PCR 的检测非常灵敏, 因此为了尽可能的避免人为操作的影响, 可以将模版 cDNA 进行一定程度的稀释可以降低误差(配成 Mix1, 则每孔加稀释后的 cDNA 体积为 6 μ l), 但同时应确保 cDNA 的浓度在合适范围之内。
- 2) 内参基因通常会选取表达量相对稳定的持家基因进行设计, 如 Actin, Ubiquitin 等, 具体到水稻, 可参见 *The Plant Journal*, 2010, A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice 一文对水稻看家基因的总结。
- 3) 本实验针对 TaKaRa 公司的 DRR041A SYBR premix Ex Taq 试剂设计, 如果用到其他公司和其他系统的试剂则具体参照试剂的使用说明进行试验。

4. 运行反应程序如下

程序 (°C)	反应时间(hh:mm:ss)	循环数
起始变性		
95	0:00:10	1
扩增反应		
95	0:00:05	40-45
60	0:00:34	
溶解曲线		
95	0:00:15	1
60	0:01:00	
95	0:00:15	
60	0:00:15	

5. 结果分析

首先对溶解曲线进行分析, 单峰的熔解曲线被认为是合格的扩增, 而出现双峰等情况则可能在扩增中出现了非特异扩增及二聚体等情况 (图 1)。

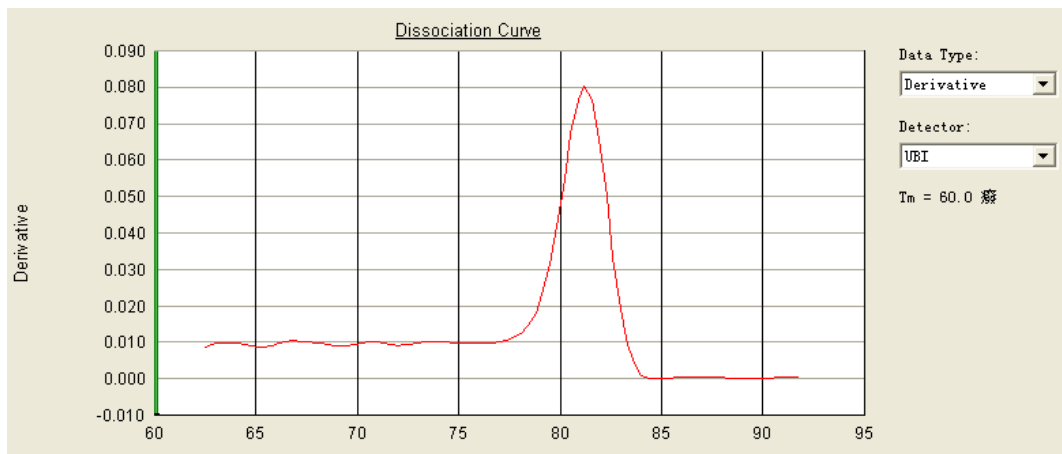


图 1. 荧光定量 PCR 引物溶解曲线图例

- 1) 利用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行相对表达量的计算。导出文件，整理 CT 值，对内参基因进行样本差异的均一化：目的基因 CT 值-内参基因 CT 值= ΔCT 处理样品和对照样品间的相对差异比较。
- 2) 处理样品 ΔCT 值-对照样品 ΔCT 值= $\Delta\Delta CT$ ，使用以下公式计算相对表达量差异：倍数变化= $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ 。

生成文件，以 CT 值进行相对表达量的计算。

注：计算公式及原理参考 Livak 等 2001。

注意事项

1. 为减少技术重复间的标准误，使用确认已校准的移液器，推荐对应移液器为 Real-time PCR 专用。
2. 目的基因的 CT 值在 20-35 之间较好，如果 CT 值较大，说明基因表达量较低，可适当提高模板浓度。
3. 为了节约试剂成本，反应体系可缩减至 10 μ l。
4. 为防止机器对实验结果的影响，做 Real-time PCR 时务必保持 PCR 板的洁净，不要在 PCR 板侧壁做标记或在机器旁打开有荧光的物质。
5. Real-time PCR 引物应做预实验确定其是否特异扩增。

参考文献

1. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). [Analysis of relative gene express](#)

[ion data using real-time quantitative PCR and the \$2^{-\Delta\Delta CT}\$ method.](#) *Methods*
25(4): 402-408.