

Stem-loop RT Real-time PCR

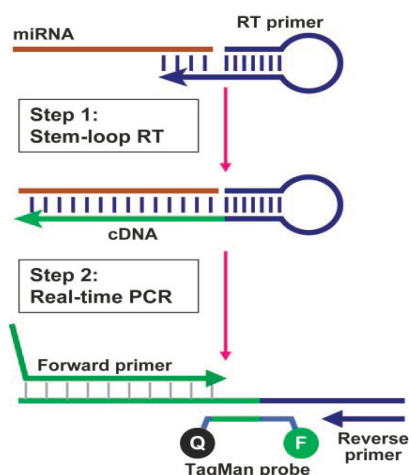
沈建强, 李燕, 熊立仲*

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: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 沈建强, 李燕, 熊立仲. (2018). Stem-loop RT Real-time PCR. *Bio-101* e1010118. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010118.

实验原理: 根据颈环引物的空间结构来提高反转录的特异性, 从而反转录特定的 small RNA, 在实时定量过程中, 打开颈环结构, 通过通用引物和特异引物, 用 SYBR 染料, 进行定量。



引物设计(仅供参考):

以>osa-miR171a 为例:

miR171a: UGAUUGAGCCGCGCCAAUAUC

RT-primer: 5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGAgat attg3'

Forward primer: 5'gcgaTGATTGAGCCGCGCC3'

Reverse primer: 5'GTGCAGGGTCCGAGGT3'

实验目的: 检测水稻各种组织中的 small RNA 的表达量, 特别是样品很少的材料。

关键词: Small RNA, Stem-loop RT, Real-time PCR, 颈环结构, SYBR

材料与试剂

1. 各种规格枪头 (RNase free 及一般枪头)
2. 96 孔板
3. DEPC 水
4. DNase I (NEB, catalog number: M0303S)
5. SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen, catalog number: 18080-044)
6. RR I (Takara, catalog number: D2313A)
7. SYBR Premix Ex Taq™ (Takara, catalog number: DRR041A)
8. EDTA

仪器设备

1. 移液器
2. 9700 PCR 仪(ABI)
3. 7500 Real time PCR 仪(ABI)
4. 离心机

实验步骤

1. 2.2 µg 总 RNA 稀释到 5 µl, 加入 1 µl DNase I, 1 µl DNase I buffer 和 3 µl DEPC 水。于 37 °C 孵育 10 min, 加入 1 µl 50 mM EDTA, 65 °C 孵育 10 min。将处理好的 RNA 稀释 10 倍待用。
2. 每个反转录反应需 0.25 µl 引物, 0.25 µl dNTP, 加上 1 µl DEPC 水配成混合液。
3. 在 96 孔板中加入 2 µl RNA 和 1.5 µl 引物混合液。然后稍离心, 盖上橡皮盖子。将混合液置于 96 孔板上 65 °C 孵育 5 min, 立即置于冰上 3 min。

将 1 µl 5x First strand buffer, 0.5 µl 0.1 M DTT, 0.15 µl RR I 以及 0.15 µl SuperScript III 配制成混合液, 每管中加入 1.8 µl 混合液。离心后, 放置于 PCR 仪上, 程序如下:

16 °C	30 min
50 °C	30 min
85 °C	5 min
25 °C	1 min

4. 将反转录产物置于 -20 °C 过夜, 或者立即进行定量分析。

5. 将 1 μl 通用反向引物和 1 μl 特异正向引物加入 1.5 μl 灭菌双蒸水，配制成混合液，分加至每管中，并且加入 12.5 μl real time 试剂。贴上膜后，于离心机中稍微离心。
6. 放置于 ABI 7500 中程序如下

95 °C	10 sec
95 °C	5 sec
60 °C	34 sec

后两步 40 个循环，加上标准溶解曲线程序。

参考文献

1. Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J. and Guegler, K. J. (2005). [Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR](#). *Nucleic Acids Res* 33(20): e179.