

赛默飞世尔科技微量紫外可见光分光光度计 NanoDrop 应用

NanoDrop 在 Real-time PCR 中的应用

简介

Real-time PCR 的方法已经成为了基因表达定量的金标准。这里有两个重要的注意事项：一是在 cDNA 反转录之前，将 RNA 的量均一化，以保证得到的 cDNA 是均一的；二是确认选择的内参基因是可靠的。充足的 RNA 量是得到高质量且重复性好的数据的保证。这里描述的是用 NanoDrop 对 RNA 含量均一化后，再反转录 cDNA 的方法。

前言

基因表达定量实验已经成为分子生物学实验室的主流实验。反转录 PCR (RT-PCR) 是根据 RNA 的序列反转录成 cDNA 的过程。Real-time PCR 使用专门的仪器 (荧光定量 PCR 仪)，捕捉每个 PCR 反应后释放的荧光信号，对 PCR 扩增产物进行实时检测。

合适的引物、可靠的试剂和稳定的仪器紧密配合，对获得高质量的数据至关重要。因为 Real-time PCR 有许多的步骤，所以前期的质控对于获得可靠的结果是关键。据普遍的经验来看，遵守前述这两个 Real-time PCR 的注意事项，都能获得高质量的数据。

基因表达定量研究的目的是比较基因在两组样品间的表达情况。比如：比较不同细胞系或组织基因的表达情况，研究药物处理后不同时间的样本和未处理的对照组间基因表达的不同，检测病变和正常组织间基因表达的变化等。

Real-time PCR 的数据一般会使用内参基因并使其均一化，内参基因一般是选择合适的管家基因，即在该次的实验条件中，对于同样的细胞数量，该管家基因的表达水平不会在实验组间发生变化。

为了确定内参基因在该实验条件下是否发生变化，我们必须在预实验中，对内参基因进行定量分析，因此需要保证加入的 RNA 量是一致的。

接下来我们将用 NanoDrop 对每个反应加入的 RNA 量进行均一化。以 U6 RNA 表达为例，用 Real-time PCR 的技术分析 33 个人类肝组织样本。cDNA 合成，RNA 提取和 PCR 的基本原则将不再描述。

RNA 分离和定量

1. 本次实验中有 33 个人类肝样本，其中 18 个为肝硬化病人的样本，另外 15 个为正常人的样本。本次实验的目的是探究某几个感兴趣基因在肝硬化与非肝硬化的样本中的表达是否有差异。但第一步得确认其中一个内参基因在肝硬化和正常样本中的表达情况，即内参基因是否可用。
2. 将冰冻的肝组织放入不锈钢的研钵中，倒入液氮研成粉末，用 Trizol 试剂 (Invitrogen)，按照说明书中的 Protocol 进行 RNA 的提取。最后，待 RNA 沉淀物中的乙醇蒸发后，在每个 RNA 样品中加入 25uL 的水，整个过程都在冰上操作。
3. 取 1uL 未稀释的 RNA 样本在 NanoDrop 上进行检测，样品的浓

度和纯度将在结果中直接呈现，用无尘试纸擦拭上下基座，便可进行下一个样品的检测了。重复以上操作，直至所有的 RNA 样本都检测完毕。

4. 取 50-100ng RNA 在 Agilent 2100 生物分析仪上进行分析，用毛细管电泳的方法对 28S 和 18S rRNA 进行量化分析，得到 RIN 值 (RNA integrity number)。RNA 表明 RNA 的降解水平，RIN 值在 1 (差) 至 10 (最好) 之间，一般认为 RIN 的最低可用的极限是 4-5。
5. 用 NanoDrop 检测 RNA 样本得到的参数和浓度可以通过 Excel 表导出，用于后续的反转录和 Real-time PCR 实验。

Sample ID	[RNA] ng/ul	A260	A260/A280	Volume (ul)	Total RNA (ug)	Volume for 1.2ug (ul)	Water (ul)
S1	2551	1.85	1.90	25	63.78	0.470	9.78
S2	2099.13	1.93	2.02	25	52.48	0.572	9.68
S3	2192.62	1.92	2.03	25	54.82	0.547	9.70
S4	2136.48	1.92	2.05	25	53.41	0.562	9.69
S5	1782.58	1.88	1.33	25	44.56	0.673	9.58
S6	1928.28	1.89	1.75	25	48.21	0.622	9.63
S7	1747.47	1.87	1.51	25	43.69	0.687	9.56
S8	1967.65	1.91	1.72	25	49.19	0.610	9.64

反转录

6. 将适量的 RNA 加入到每一个反转录的体系中，一般认为：每 50uL 反应体系加入 1ug RNA。对于大多数 Real-time PCR 实验，最低的反转录起始 RNA 样本可以低至 50ng。
7. 或者可以将 RNA 的浓度进行稀释，将每个 RNA 样品的浓度调齐。比如都稀释为 1.2ug/uL。
8. 加入 1.2ug 的 RNA 样品，加水将总体积补齐到 10uL，提取的 RNA 中可能存在基因组 DNA 的污染，可先用 DNase I 去除：用 RNase-free 的水配制 30uL DNase I 反应体系，其中含有 2mM MgCl₂，37°C 反应 10min 去除 DNA，90°C 反应 5min 使 DNase 失活。
9. 取 25ul 的反应体系 (里面含有 1ug RNA)，根据 SuperScript II (Invitrogen) 的 Protocol 配置终体积为 50 ul 的反应体系。我们一般用 random 引物引导反转录。cDNA 产物分离、纯化，存储于 -20°C 或 -80°C 冰箱中待用。

Real-time PCR

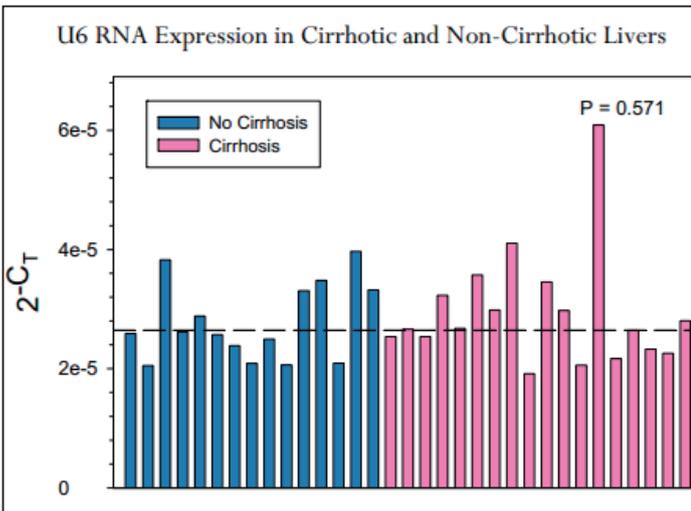
10. cDNA 只要保存恰当可以非常稳定，并几乎可供无限次的 PCR 反应。
11. 反转录得到的 cDNA 可按 1:50 或 1:100 进行稀释再使用。配置 25ul 的 Real-time PCR 反应体系，只需加入 5ul 稀释好的 cDNA，再加入 Real-time PCR 试剂 (这里推荐的是 ABI 公司的 SYBR Green 试剂盒) 和目标基因的特异引物，最后用水补齐

到 25ul。

12. Real-time PCR 推荐在荧光定量 PCR 仪上运行 40 个循环，如果使用的是 SYBR Green 染料，建议在 40 个循环之后再进行一次热变性的反应，检测熔融温度，如果有非特异的产物，则会被检测到杂峰。如果使用的是 TaqMan 的探针，则无需进行这一步。在实验设计上，一般一个样本需设定 3-4 个重复，设定一个没有样本的空白对照及一个没有 DNase 的负对照，来确定是否有基因组 DNA 污染。

数据分析

13. 在终点法定量 Real-time PCR 中，CT 值（到达阈值经过的循环数）非常重要。平均 CT 值是通过 2-3 个重复进行计算的，这里演示的是 2 次重复得到的结果。
14. 数据结果在图表上显而易见，经过统计学的分析，用 T-Test 结果来判断这两组样本（即肝硬化样本和正常样本）间内参基因表达是否存在差异。通过计算两组间的平均表达量的倍性变化，如果理论上相等，说明该内参基因在本次实验条件中是一个合适的内参基因。



总 RNA 分别从 33 个人类肝组织中分离得到，这 33 个样本中包括 18 个肝硬化和 15 个正常的样本，从每个样品中取 1ul RNA 用 NanoDrop 进行定量。再分别反转录成 cDNA；这 33 个样本的 cDNA 都用 1ug 的 RNA 反转录而来。用 U6 特异的引物，通过 Real-time PCR 技术检测 U6 RNA 的表达情况。通过 T-Test 计算 (P=0.571) 发现，U6 RNA 的表达在肝硬化样本和正常样本组中都没有明显的变化。

15. 如果不能确定一个内参基因是否可用，可选择若干个不同的内参基因进行检测和比较，来确定哪个基因是最合适的。在这里，我们选择了 18S rRNA 或 U6 RNA。所用的引物如下：

18S rRNA

5' GTAACCCGGTTGAACCCATT 3' (forward)

5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3' (reverse)

U6 RNA

5' CTCGCTTCGGCAGCACA 3' (forward)

5' AACGCTTCACGAATTTGCGT 3' (reverse)

16. 如果内参基因没有改变，那么便可以用这个内参基因作为参照，按 10-12 步对目标基因进行定量；如果内参基因发生改变，则重新选择一个新的内参基因，重复 10-14 步。

结果

U6 RNA 表达的水平在肝硬化和正常样本中平均表达量分别为 2.94×10^{-5} 和 2.78×10^{-5} ，倍性变化为 1.058， $P=0.571$ 。U6 RNA 的表达在肝硬化样本和正常样本组中都没有明显的变化，所以 U6 RNA 可作为本次实验的内参基因。

结论

反转录前，每个反应中需要加入相同量的 RNA，以保证定量 Real-time PCR 的起始 cDNA 是均一化的。这样才能保证 Real-time PCR 检测出的变化是 RNA 实际表达水平的变化，而非是加入的起始 cDNA 不同而产生的变化。只需 1ul 的样本，用 NanoDrop 便能为定量 Real-time PCR 提供非常理想的均一化检测。用上述模板均一化的方法能帮助我们确定一个合适的内参基因。使用 RNA 样本均一化的方法和选择合适的内参基因，会让我们对得到的 RNA 表达水平变化更有信心。

赛默飞世尔科技

服务热线：800 810 5118
400 650 5118

中文网站：www.thermofisher.cn www.thermo.com.cn/xps
E-mail 地址：sales.china@thermofisher.com

ThermoFisher
S C I E N T I F I C