

实验报告书

项目名称: **qRT-PCR 检测细胞中 BCL 基因表达**

客户姓名:

合同号:

项目负责人

一、 实验仪器与试剂

表格一：实验仪器

仪器名称	型号	生产厂家
低温高速离心机	64R	BECKMAN
PCR 仪	9700	ABI
荧光定量 PCR 仪	7500	ABI

仪器	厂家	型号
小型垂直电泳槽	Biorad	164-8001
转印槽	Biorad	Trans-Blot
脱色摇床	常州澳华	TY-80B
电泳仪	上海天能	EPS-200
低温高速离心机	64R	BECKMAN
酶标仪	Thermo	Thermo Scientific Microplate Reader

表格二：试剂

试剂名称	厂家
PBS (0.01M, pH 7.4)	自配
Trizol	Life Technologies
氯仿	国药集团
异丙醇	国药集团
乙醇	国药集团
PrimeScript® RT reagent Kit	Takara
荧光定量试剂盒	Takara

二、 实验步骤

1、样本处理

4℃ 12000rpm 离心收集细胞，弃上清。PBS 清洗 1 遍后，加入 1mL Trizol 充分混匀。

2、两相分离

每个样品中加入 0.2 mL 的氯仿，盖紧管盖，剧烈振荡管体，室温静置 5min。4℃ 下 12000rpm 离心 15 min。离心后混合液体将分为下层的红色酚氯仿相，中间层和上层的无色的水相。RNA 全部被分配于水相中。水相的体积大约是匀浆时加入的 Trizol 试剂的 60%。

3、RNA 沉淀

将水相转移到新离心管中。加入等体积的异丙醇，水相与异丙醇混合以沉淀其中的 RNA。混匀并在室温孵育 10 min 后，4℃ 12000rpm 离心 10 min。

4、RNA 清洗

移去上清液，加入 1 mL 75% 乙醇，清洗 RNA 沉淀。振荡后，4℃ 7500 rpm 离心 5 min。

5、重新溶解 RNA 沉淀

去除乙醇溶液，空气中干燥 RNA 沉淀 5-10 min。溶解 RNA 时，先加入无 RNA 酶的水用枪反复吹打几次，然后 55 到 60℃ 孵育 10 min。获得的 RNA 溶液保存于 -70℃。

6、反转录

1) 按下列组份配制 RT 反应液

5×PrimeScript Buffer	5 μL
PrimeScript® RT Enzyme Mix I	1 μL
Oligo dT Primer(50 μM)×1	1 μL
Random 6 mers(100 μM)×1	1.5 μL
Total RNA	1 ng
RNase Free ddH ₂ O	Up to 25 μL

2) 反转录反应条件如下：37℃ 15min，85℃ 5s。

3) 反应结束后，将其放在冰上待用或 -20℃ 保存。

7、荧光定量 PCR

1) 引物设计

Gene	Forward Primer	Reverse Primer
β-action	5'-TTCCAGCCCTCCTTCCTG-3'	5'-GCCCCGACTCGTCATACTCC-3'
BCL	5'-CTACCGTCGTGACTTCGC -3	3'-CCTATTGCCTCCGACCCT-5'

2) 按下列组份配制 Realtime PCR 反应体系

SYBR Premix Ex Taq	10 μL
PCR Forward Primer(10μM)	1 μL
PCR Reverse Primer(10μM)	1 μL
cDNA 模板	1 μL
ddH ₂ O	7 μL
Total	Up to 20 μL

用漩涡振荡器将管中溶液彻底混合均匀，短暂低速离心。

3) 点样。将混合好的液体加入孔板中，每个样本的每个基因保证 3 个复孔，点完样之后将 PCR 板置于离心机中 2000rpm、2min，然后用锡箔纸将板包好，置于 4 度冰箱中备用。

4) PCR 反应

Real time PCR 仪使用 ABI7500, PCR 程序已优化

将步骤 3 中已点好样的 PCR 板置于 Realtime PCR 仪上进行 PCR 反应：

第一步是预变形：95℃/10min

第二步是循环反应 40 cycles：95℃/15s；60℃/45s(收集荧光)；72℃/45s

上海秉新生物科技有限公司

地址：上海市徐汇区龙吴路 2715 号 2A 楼 110 室

电话：021-54438753

网址：www.bio-nano.com.cn

邮箱：service@bio-nano.com.cn

第三步溶解曲线：95℃/15s; 60℃/1min ;95℃/15s

三、结果与计算（采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行分析）

基因相对表达量

组别	BCL 基因 CT 值 1	BCL 基因 CT 值 2	BCL 基因 CT 值 3	Mean Ct	内参 基因 CT 值 1	内参 基因 CT 值 2	内参 基因 CT 值 3	Mean Ct	ΔCt		$\Delta\Delta Ct$	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
1	24.23	24.09	23.49	23.94	16.41	16.73	16.21	16.45	7.49	7.49	0	0	1
2	25.79	26.23	25.48	25.83	18.01	17.95	17.55	17.84	8.00	7.49	0.51	-0.51	0.70
3	27.26	27.01	26.72	27.00	18.44	18.3	18.08	18.27	8.72	7.49	1.23	-1.23	0.42
4	26.74	26.96	26.42	26.71	17.07	16.62	16.74	16.81	9.90	7.49	2.41	-2.41	0.19

