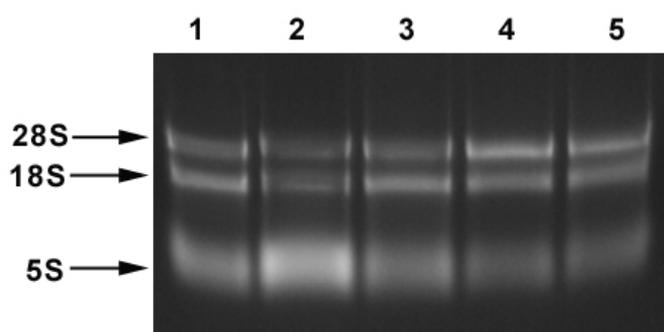


5. mRNA 水平检测基因沉默

5.1 RNA 的提取

RNA 提取物的完整性是进行电泳的主要目的之一。在有 EB 存在时,完整未降解的 RNA 制品电泳图谱应可清晰看到 18S rRNA、28S rRNA 两条带,也应当能看到一条由 tRNA、5.8S rRNA 和 5S rRNA 组成的、较模糊迁移较快的条带,且 28S rRNA 条带亮度应为 18S rRNA 的 1.5-2 倍。



附图: 本公司 RISO™ RNA 抽提试剂盒与其他公司产品的比较

Line 1、2、3: 国内某 3 家公司 RNA 抽提试剂; Line 4: 本公司 RISO™ RNA 抽提试剂; Line 5: 国外某公司 RNA 抽提试剂

5.1.1 试剂耗材的准备:

1) 试剂:

- RNase-Free 水: 配 0.01 % (v/v) 的 Diethylpyrocarbonate (DEPC) 溶液, 室温保持过夜, 次日高压灭菌后, -20 °C 保存。
- 氯仿 (Chloroform), 异丙醇 (Isopropyl alcohol), 分子生物学级别
- 75% 乙醇 (用 DEPC-treated 水配制)

2) RNase 去除的耗材: 用 0.01% (v/v) DEPC 溶液完全浸泡过夜, 高压灭菌后烘干。

5.1.2 实验步骤:

1) 准备分离 RNA 的细胞:

I. 悬浮细胞:

收集细胞, 离心 200 g, 5 min。吸出培养液。每 10⁶ 个细胞加入 1 mL Trizol 裂解液, 反复吹吸 3 - 5 次, 室温下静置 10 min 后转移至干净的离心管中。

II. 贴壁细胞:

吸出培养液, 每 10 cm² 生长面积的细胞加入 1 mL Trizol 裂解液, 反复吹吸 3 - 5 次, 室温下静置 10 min 后转移至干净的离心管中。

2) 加入 0.2 mL 氯仿 (1 mL Trizol), 振荡 15 sec 混匀后静置 2 min。

3) 在 4 °C, 12,000 g 离心 15 min, 混合液分成三层。

(以下所有步骤用到耗材均需用 DEPC 处理并高压灭菌。)

4) 小心吸取最上层的无色水层于干净的离心管中。加入 0.5 mL 异丙醇 (1 mL Trizol), 室温下静置 10 min。

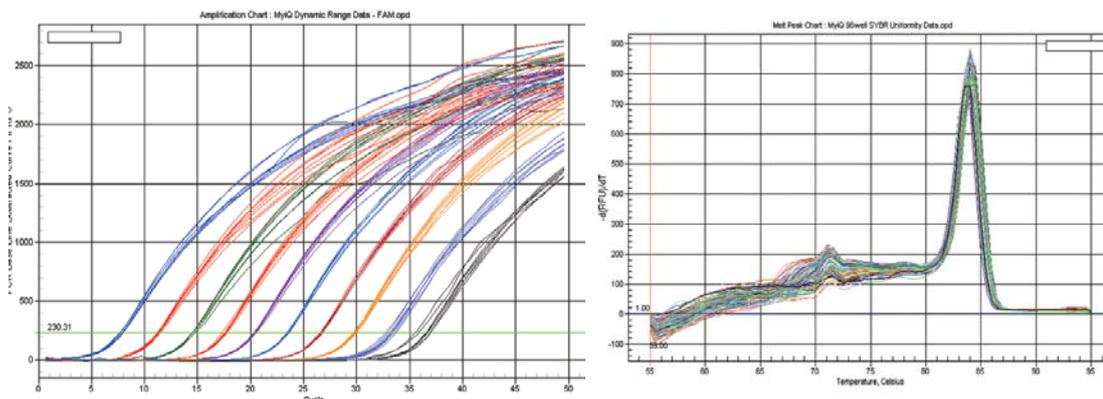
5) 在 4 °C, 12,000 g 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇 (1 mL Trizol), 振荡混匀。

6) 在 4 °C, 7,500 g 离心 5 min, 弃上清。室温下完全干燥 5 - 10 min。

7) 加入 RNase-Free 水溶解 RNA 沉淀, 分装后在 -80 °C 保存。

5.2 实时定量荧光 PCR

实时荧光定量 PCR (Real Time PCR, qRT-PCR) 避免了传统 PCR 以终产物检测定量产生的偏差, 提高实验的重复性。与常规 PCR 相比, 实时荧光定量 PCR 具有特异性更强、有效解决 PCR 污染问题、自动化程度高等特点, 已成为国际公认的核酸分子定量的标准方法。该技术已被广泛用于检测细胞 mRNA 表达量的变化; 比较不同组织的 mRNA 表达差异; 验证基因芯片, siRNA 干扰的实验结果。它涉及到 DNA 或 RNA 样品制备, 反转录及 PCR 反应等一系列重要的分子生物学过程。



5.2.1 设计目的片段和内参基因的 qPCR 引物: 利用 Primer5.0 等软件设计 PCR 引物及探针。我们公司免费为客户设计引物和探针。

5.2.2 SYBR Green 法:

1) 建立以下反应体系

试剂 (SYBR Green法)	量
总RNA	根据实验
qPCR mix (包含MLV、Hot-start Taq、dNTP等)	终浓度为1×
SYBR Green I solution	终浓度为1×
上游引物, 10 μ M	终浓度: ~200 nM
下游引物, 10 μ M	终浓度: ~200 nM
MgCl ₂	根据实验
RNase-Free H ₂ O	To 25.0 μ l

2) PCR 反应条件如下:

步骤	循环数	步骤	温度	时间
逆转录	1	1	42 °C	30 min
失活 MLV, 激活 Taq	1	1	95 °C	10 min
实时荧光定量 PCR	40	1	95 °C	15 sec
		2	X °C*	30 sec
		3	72 °C	30 sec

*与引物的 T_m 相关

3) 取 5 μ l PCR 产物跑 1.5%琼脂糖凝胶电泳, 或做溶解曲线, 检测 PCR 产物的特异性

5.2.3 Taqman 法

1) 建立以下反应体系

试剂 (Taqman法)	量
总RNA	根据实验
qPCR mix (包含MLV, Hot-start Taq、dNTP等)	终浓度为1×
Taqman Probe	根据实验
上游引物, 10 μ M	终浓度: ~200 nM
下游引物, 10 μ M	终浓度: ~200 nM
MgCl ₂	根据实验
RNase-Free H ₂ O	To 25.0 μ l

2) PCR 反应条件如下:

步骤	循环数	步骤	温度	时间
逆转录	1	1	42 °C	30 min
失活 MLV, 激活 Taq	1	1	95 °C	10 min
实时荧光定量 PCR	40	1	95 °C	15 sec
		2	60 °C*	1 min

5.2.4 实验完毕之后, 将数据导入到 Excel 中进行数据分析。

5.2.5 结果分析:

利用 $\Delta\Delta C_t$ 法, 相对定量, 将目的基因的表达与看家基因的表达对比, 获得沉默效果。如下图所示:

