

上海生物样本库
最佳实践规范及标准操作流程
文件汇编
(第二版)

2010年5月

上海生物样本库 质量管理体系文件				
文件名称	RT-PCR 操作规程		编号	SOP-TQ-021-01
批准人		批准日期	实施日期	

RT-PCR 操作规程

1. 目的

规定了反转录聚合酶链式反应 RT-PCR 的操作。

2. 适用范围

适用于从人体体液、细胞、组织等样本中提取和纯化的 mRNA 进行反转录聚合酶链式反应 RT-PCR 的操作。

3. 定义和术语

无

4. 职责

4.1 样本库实验人员负责反转录聚合酶链式反应 RT-PCR 的操作。

5. 设备和器材

PCR 仪、0.5ml PCR 管、移液器

6. 正文

6.1 原理

反转录 PCR (RT-PCR) 是一种从 RNA 扩增 cDNA 拷贝的方法。RT-PCR 对于获得与克隆 mRNA 的 5'、3' 末端序列和从非常少量的 mRNA 样品中构建大容量的 cDNA 文库方面都是极为灵敏和通用的方法。此外, RT-PCR 还易于坚定已转录序列是否发生突变及呈现多态性;还可用于测定基因表达的程度,尤其是在可获得的 mRNA 数量有限和目的基因表达水平很低时来分析。

6.2 试剂准备

6.2.1 10x 扩增缓冲液

500 mmol/L KCl

100 mmol/L Tris-Cl (pH8.3 室温下)

15 mmol/L MgCl₂

在 15psi 高压下蒸汽灭菌 10 分钟，分装贮存于-20℃。

6.2.2 4 种 dNTP 贮存液 (20 mmol/L, pH8.0)

6.2.3 乙醇、MgCl₂(50 mmol/L)、酚:氯仿 (v/v, 1:1)

6.2.4 反转录酶 (RNA 依赖的 DNA 聚合酶)、热稳定 DNA 聚合酶

6.2.5 RNA 酶抑制剂

6.2.6 用于 cDNA 合成的寡核苷酸引物:

Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 溶于 TE (100ug/ml, pH8.0);

随机六核苷酸溶于 TE (1ml/ml, pH8.0);

基因特异性寡核苷酸 (20umol/L) 溶于水 (终浓度 20 pmol/ul);

正义与反义寡核苷酸引物用于 cDNA 的 PCR 扩增。

6.2.7 总 RNA (100ug/ml) 或带 poly(A)⁺RNA (10ug/ml) 溶于水中。

6.3 PCR 试验

6.3.1 转移 1pg-100ng 的 poly(A)⁺RNA 或 10pg-1ug 的总 RNA 至新的无 RNA 酶的 PCR 管，用水调整至体积 10ul；将 RNA 样品在 75℃ 变性 5 分钟，将离心管迅速插入冰中冷却。

6.3.2 按次序，将以下各成分加入 PCR 管中：

10x 扩增缓冲液 5ul

20 mmol/L 4 种 dNTP 混合液 (pH8.0) 2ul

引物 (与靶 RNA 互补的寡核苷酸 5-20pmol/L、oligo(dT)₁₂₋₁₈ 0.1-0.5ug、随机六核苷酸 1-5ug) 1ul

约 20 单位/ul 胎盘 RNase 抑制剂 1ul

50 mmol/L MgCl₂ 1ul

100-200 单位/ul 反转录酶

水补足总体积 20ul

6.3.3 温育在 37℃ 反应 60 分钟。MgCl₂ 为反转录酶作用所必需。

6.3.4 将反应管在 95℃ 加热 5 分钟，使反转录酶是活和 RNA-cDNA 杂合物变形。

6.3.5 调整反应混合液体积以便使正义和反义引物浓度在 20 pmol/L。

6.3.6 离心管内加入如下反应试剂：

1x 扩增缓冲液调整反应体积至 99ul

1-2 单位热稳定 DNA 聚合酶 1ul

6.3.7 如 PCR 仪没有加热盖，在反应混合液上层加一滴轻矿物油（约 50ul），防止样品在 PCR 反应循环中蒸发，反应结束后可用 150ul 氯仿抽提去除。放置 PCR 管在 PCR 仪上。

6.3.8 在 PCR 仪中按下列程序开始循环：

A. 预变性 94℃ 5 分钟

B. 变性 94℃ 30 秒

退火 37-65℃（根据引物决定） 30 秒

延伸 72℃ 1 分钟

循环 30-50 次

C. 终延伸 72℃ 10 分钟

6.2.4 将扩增 DNA 产物分析和保存。

7. 相关文件

无

8. 参考标准与文献

《分子克隆实验指南》第三版，ISBN 7-03-010338-6