

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	Real-Time PCR 操作规程			编号	SOP-TQ-022-01
批准人		批准日期		实施日期	

Real-Time PCR 操作规程

1. 目的

规定了实时定量 Real-Time 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 DNA 进行实时定量 Real-Time 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实时定量 Real-Time 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

实时定量 PCR 技术, 被许多实验室用于基因表达的定量和用 DNA 阵列技术检测证实基因的差异表达对与临床和工业生产部门所提供样品测定其特定 DNA 或 RNA 序列的丰度以及被这两类实验室用于筛选基因突变和核苷酸多态性。

荧光检测 PCR 仪能对整个 PCR 过程中扩增 DNA 的累积速率绘制动态变化图。靶序列的起始浓度能够用要求获得扩增产物的一种特定阈值的 PCR 循环数 (C_T) 来表达。以 C_T 为横坐标, 以一套标准 DNA 分子产量的起始拷贝数的以 10 为底的对数值为纵坐标作半对数图, 呈一条直线。一种未知样品的靶序列可以通过对照这种标准曲线的内推法轻易地予以定量。

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 MgCl₂(50 mmol/L)

6.2.4 合适的限制性内切酶、反转录酶 (RNA 依赖的 DNA 聚合酶 100-200 单位/u1)、热稳定 DNA 聚合酶

6.2.5 RNA 酶抑制剂 (20 单位/u1)

6.2.6 放射性物质

如[α-³²P]dCTP (放射性比活度: 3000Ci/mmol) 的浓度为 10mCi/ml。

6.2.7 已知含量的参考分子 (DNA 或 RNA)。

6.2.8 正向和反向引物 (20umol/L)

6.2.9 RNA 或 DNA 样品。

6.3 PCR 试验

6.3.1 准备好 RNA 反转录反应样品或者 DNA 样品。

6.3.2 如果是 RNA，将 RNA 分子在 75℃温育 5 分钟，使其变性，随后将样品管插入冰水中迅速冷却。在 0.5ml PCR 管中建立反转录反应体系：

10x 扩增缓冲液 2ul

20 mmol/L 4 种 dNTP 混合液 (pH8.0) 1ul

20 umol/L 反义引物 2.5ul

约 20 单位/u1 胎盘 RNase 抑制剂 1ul

50 mmol/L MgCl₂ 1ul

变性靶 RNA 10pg-1.0ug

100-200 单位/u1 反转录酶 1ul

10 倍稀释的参考模版 1ul

水补足总体积 20ul

6.3.3 温育在 37℃ 反应 60 分钟。将反应管在 95℃ 加热 20 分钟，使反转录酶变性灭活。

6.3.4 用 0.5ml 灭菌离心管，建立扩增反应：

RNA 反转录反应样品或 DNA 样品 5ul

20umol/L 正义和反义引物 1.5ul

10x 扩增缓冲液 5ul

[α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol) 10u Ci

20mmol/L 4 种 dNTP 混合液 1ul

Taq DNA 聚合酶 2 单位

水补足至 50ul

6.3.5 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。放置 PCR 管在 PCR 仪上。

6.3.6 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

6.3.7 利用实时荧光定量 PCR 仪对扩增重的产物进行分析。

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