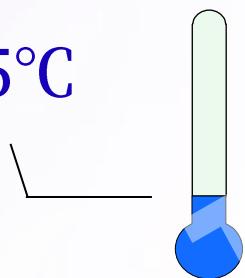


RT-qPCR实验操作

TIANGEN 2022



-30 ~ -15°C



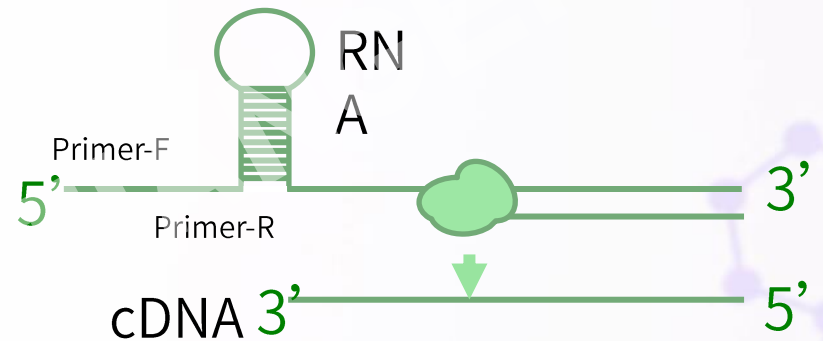
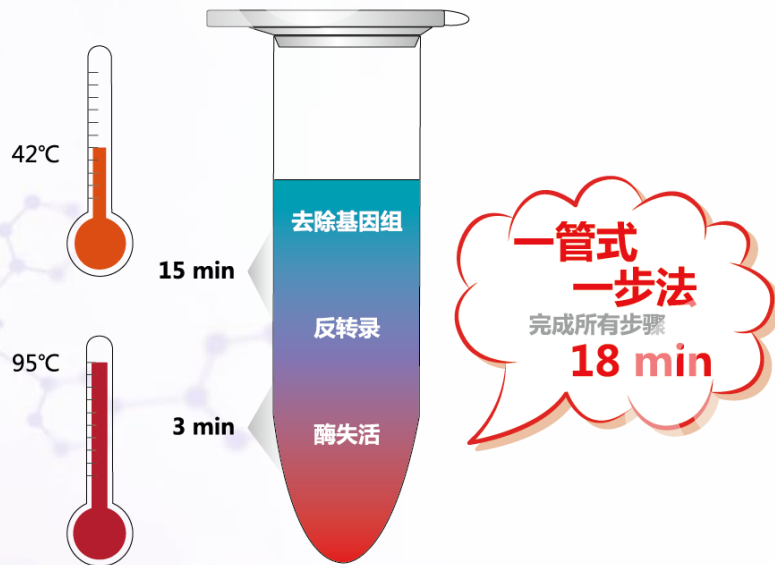
试剂盒保存温度

产品	产品组成	使用温度
FastKing一步法除基因组cDNA第一链合成预混试剂 (目录号: KR118)	5 × FastKing-RT SuperMix	冰上
	RNase- Free ddH ₂ O	常温
Talent荧光定量检测试剂盒 (SYBR Green) (目录号: FP209)	2 × Talent qPCR PreMix (SYBR Green)	常温
	50 × ROX Reference Dye	常温
	RNase- Free ddH ₂ O	常温

FastKing gDNA Dispelling RT SuperMix (KR118)

-- 18 分钟一步搞定去基因组和反转录

仅需加入模板，一步法完成高效基因组DNA去除和反转录，18分钟完成实验，反转效率超过95%。



组成成分	使用量
5×FastKing-RT SuperMix	4 μ L
Total RNA	50ng-2 μ g
RNase-Free ddH ₂ O	补足到20 μ L

 得率

紫外分光光度计进行测量



高浓度样品（鼠肝样本浓度：2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）

按试剂盒允许**最大总量**加入RNA

$$V_{\text{体积}} = \text{RNA 总量} / C_{\text{RNA 浓度}}$$

组分	体积
5 \times FastKing-RT SuperMix	4 μL
Total RNA	1 μL
RNase-Free ddH ₂ O	15 μL

低浓度样品（陈旧血液：0.05 μg/μL）

按试剂盒允许**最大体积**加入RNA

$$\textcircled{1} \text{ RNA 总量} = V_{\max} \cdot C_{\text{RNA 浓度}} \text{（浓度最低样品）}$$

$$\textcircled{2} V_{\text{体积}} = \text{RNA 总量} / C_{\text{RNA 浓度}}$$

组分	体积
5× FastKing-RT SuperMix	4 μL
Total RNA	16 μL
RNase-Free ddH ₂ O	0 μL

➤ cDNA稀释

建议进行2倍稀释，并做预实验检测目的基因Ct值，Ct值尽量在15-30之间。

➤ cDNA用量

单个反应cDNA不超过总体积的10%，既20 μ L体系最多加入2 μ L cDNA模版。

➤ 不要测cDNA浓度

dNTP、蛋白、盐离子都会干扰浓度测量，测不准。

荧光定量PCR反应体系 (20 μ L 体系)

试剂	单孔组分加入量 (μ l)
2 \times Talent qPCR PreMix	10
Primer: RNC-F	0.5
Primer: RNC-R	0.5
cDNA	2
50 \times ROX	0.4
H ₂ O	Up to 20 μ l

荧光定量参比荧光ROX Reference Dye

仪器	终浓度
ABI 7000/7300/7700/7900/7900HT/7900HT Fast、StepOne™/ StepOne Plus™	5 × (例：2 μL ROX/20 μL 体系)
ABI 7500/7500 Fast、 ViiA 7、QuantStudio™ 3/5/6 Flex/7 Flex/12K Flex；Agilent Stratagene Mx3000P/Mx3005P/Mx4000	1 × (例：0.4 μL ROX/20 μL 体系)
Roche仪器， Bio-Rad仪器， Eppendorf仪器等	不用添加

预混Mix配制

需根据技术重复数、样本数、对照数、冗余量提前进行计算。

公式如下：

$$\text{总份数} = \text{技术重复数} \times \text{样本数} + \text{冗余量}$$

例如：

某基因共检测6个样本，并设置3个技术重复

那么需要配制的总份数（N）为：

$$N = 3 \times 6 + 2 = 20 \text{ (份)}$$

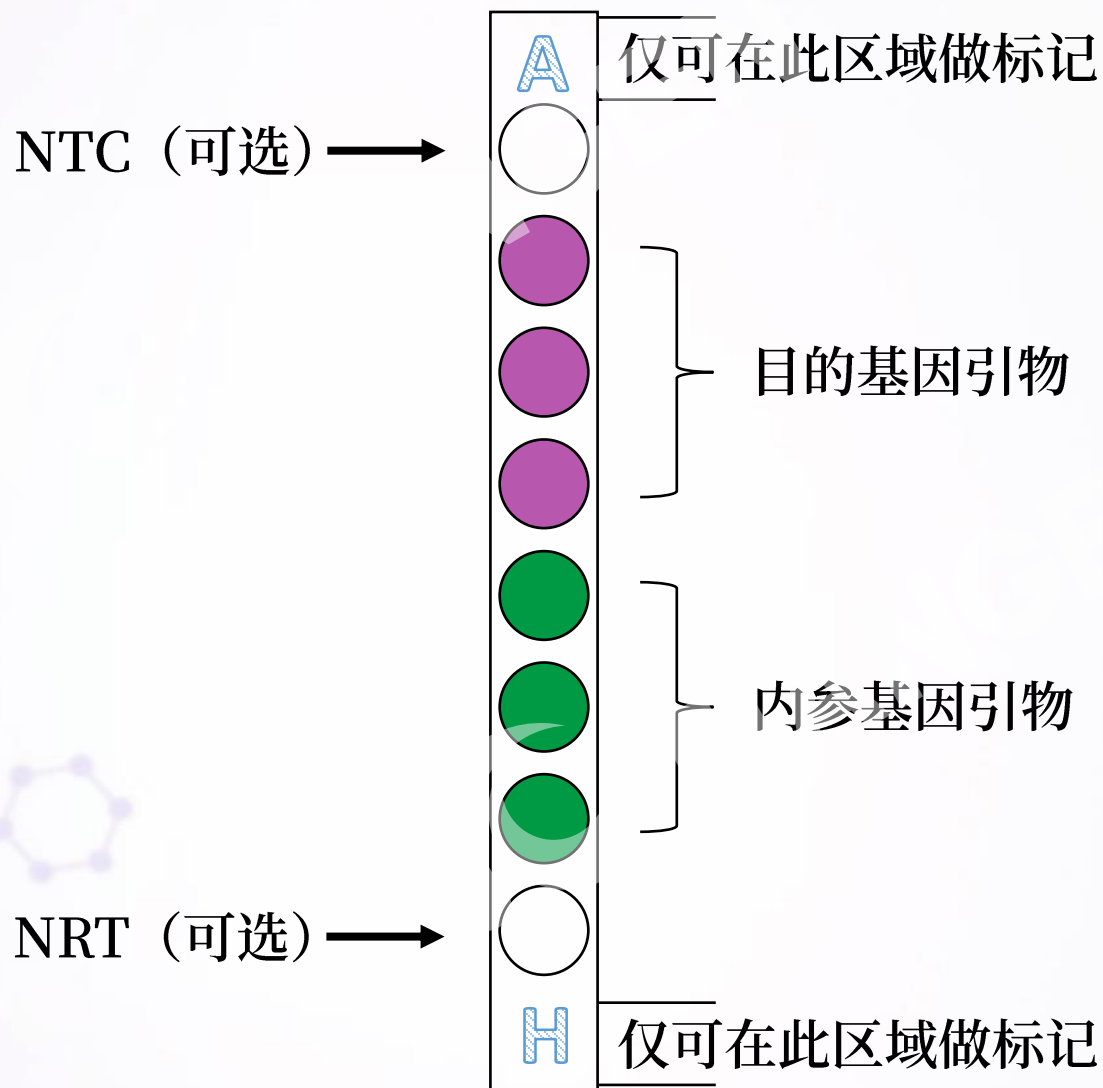
例如：RNC基因共检测6个样本，并设置3个技术重复

那么需要配制的总份数（N）为：

$$N=3*6+2=20 \text{ (份)}$$

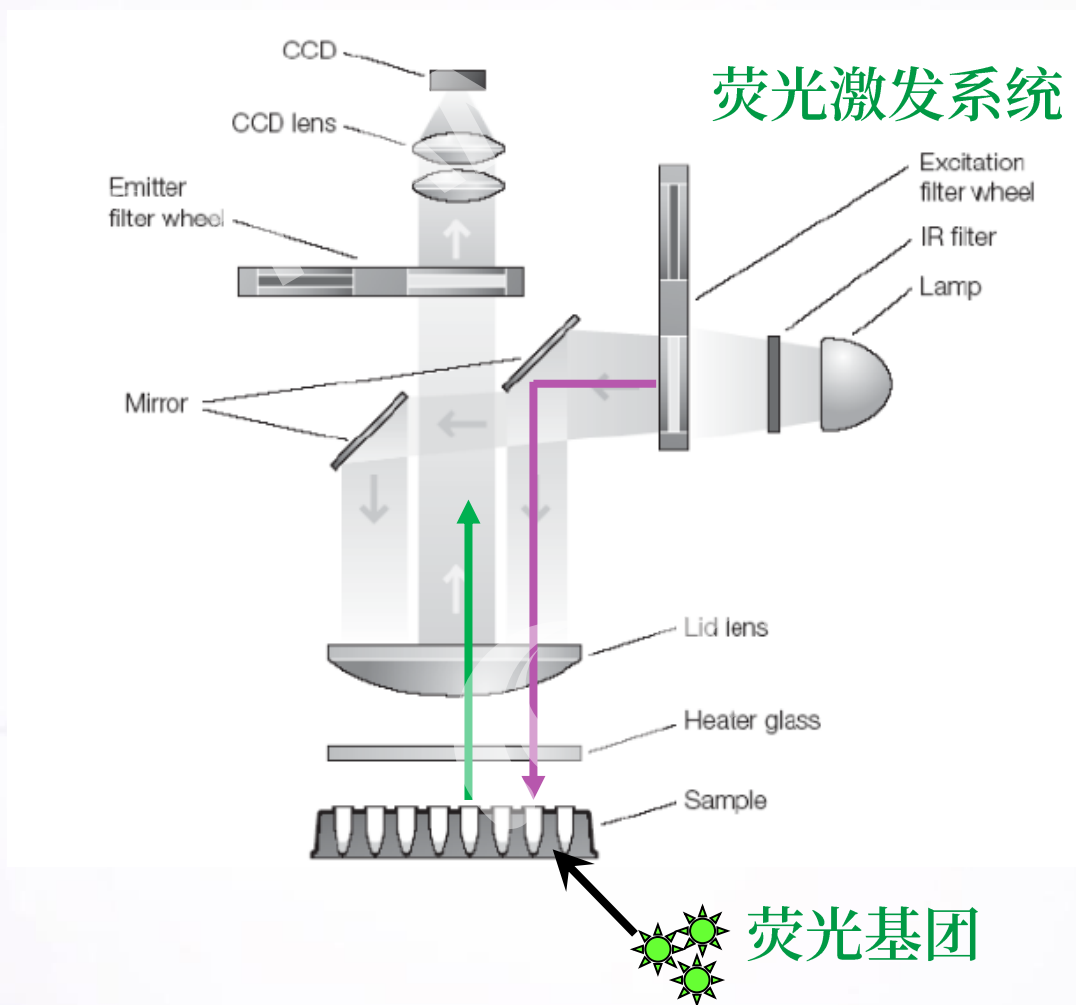
试剂	单孔组分加入量 (μL)	Mix总量 (μL)
2×Talent qPCR PreMix	10	200
Primer: RNC-F	0.5	10
Primer: RNC-R	0.5	10
cDNA	2	-
50× ROX	0.4	8
H ₂ O	6.6	132

八联排管设置



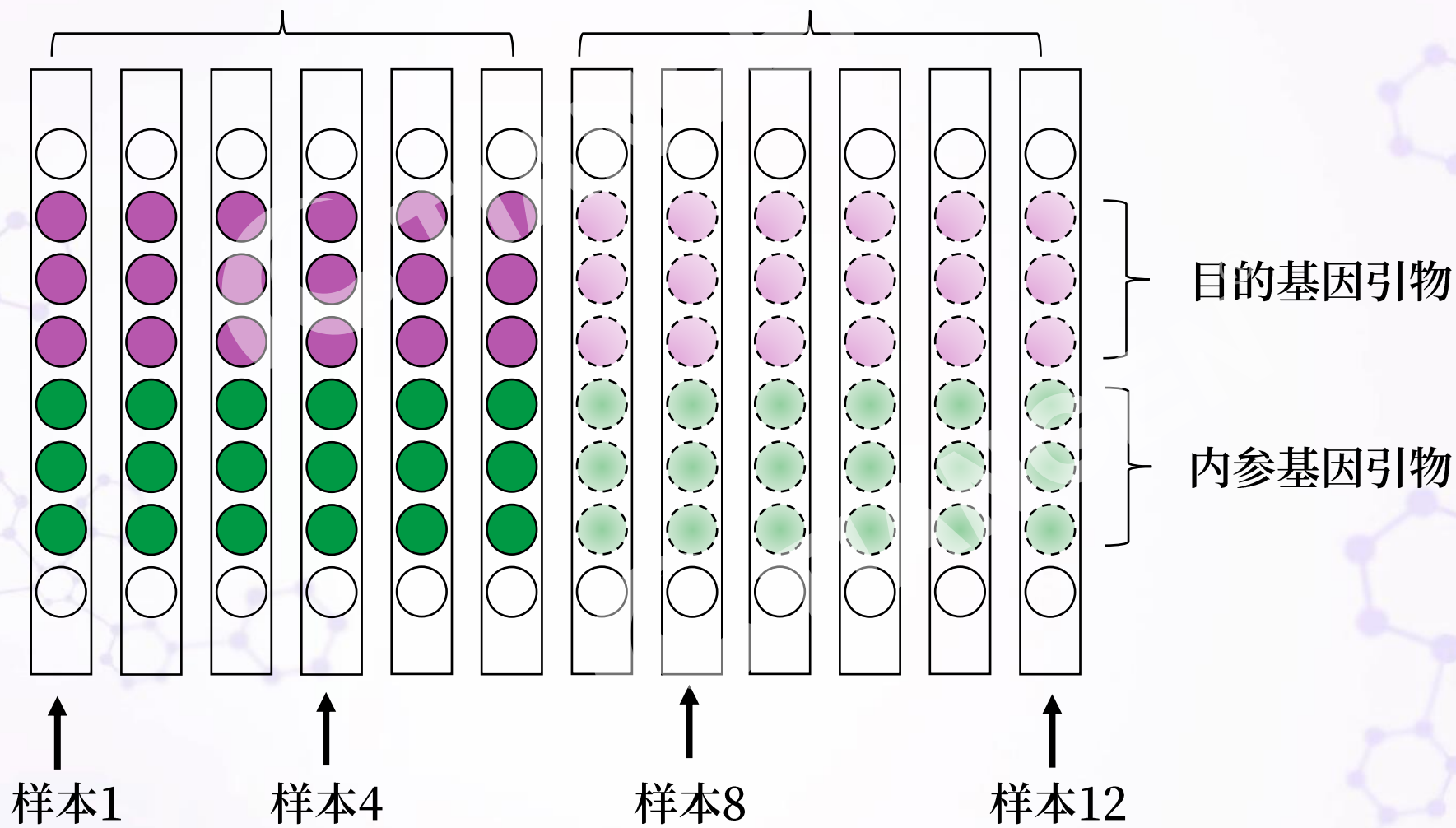
荧光定量PCR仪器光学原理

荧光检测元件



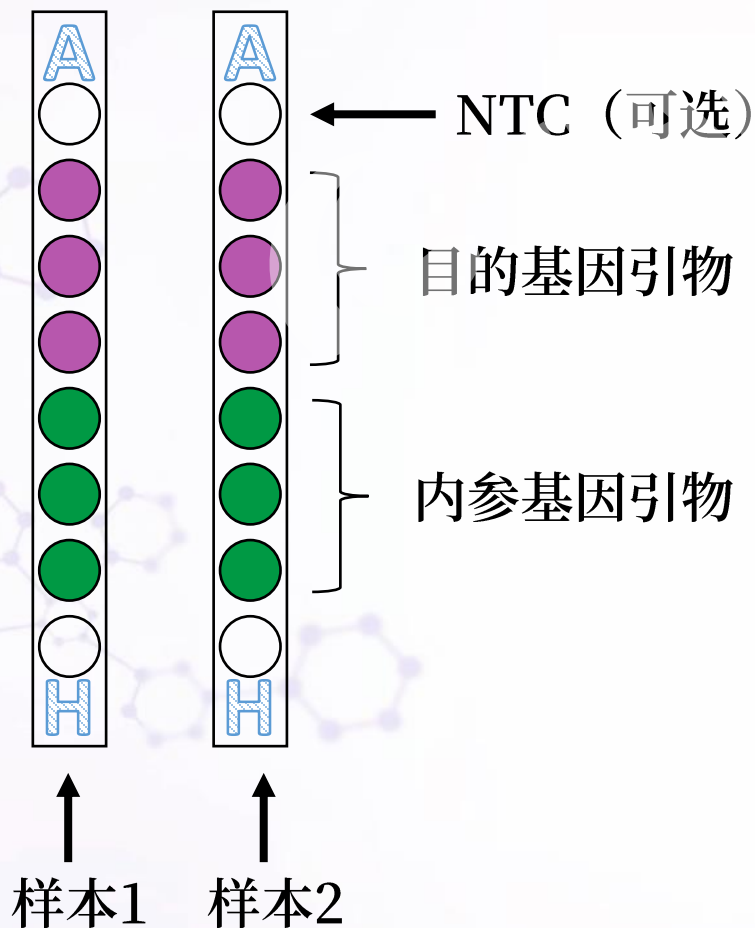
对照组 (样本1-6)

实验组 (样本7-12)



本次实验设置

1目的基因，1内参基因，3个技术重复，2样本。

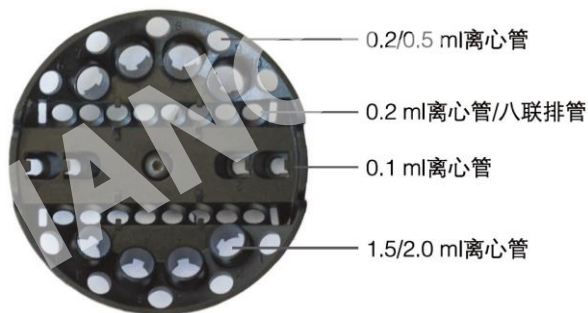


试剂	单孔组分量 (μL)	Mix总量 (μL)
2×Talent qPCR PreMix	10	100
Primer: RNC-F	0.5	5
Primer: RNC-R	0.5	5
cDNA	2	-
50× ROX	0.4	4
H ₂ O	6.6	66

去除气泡



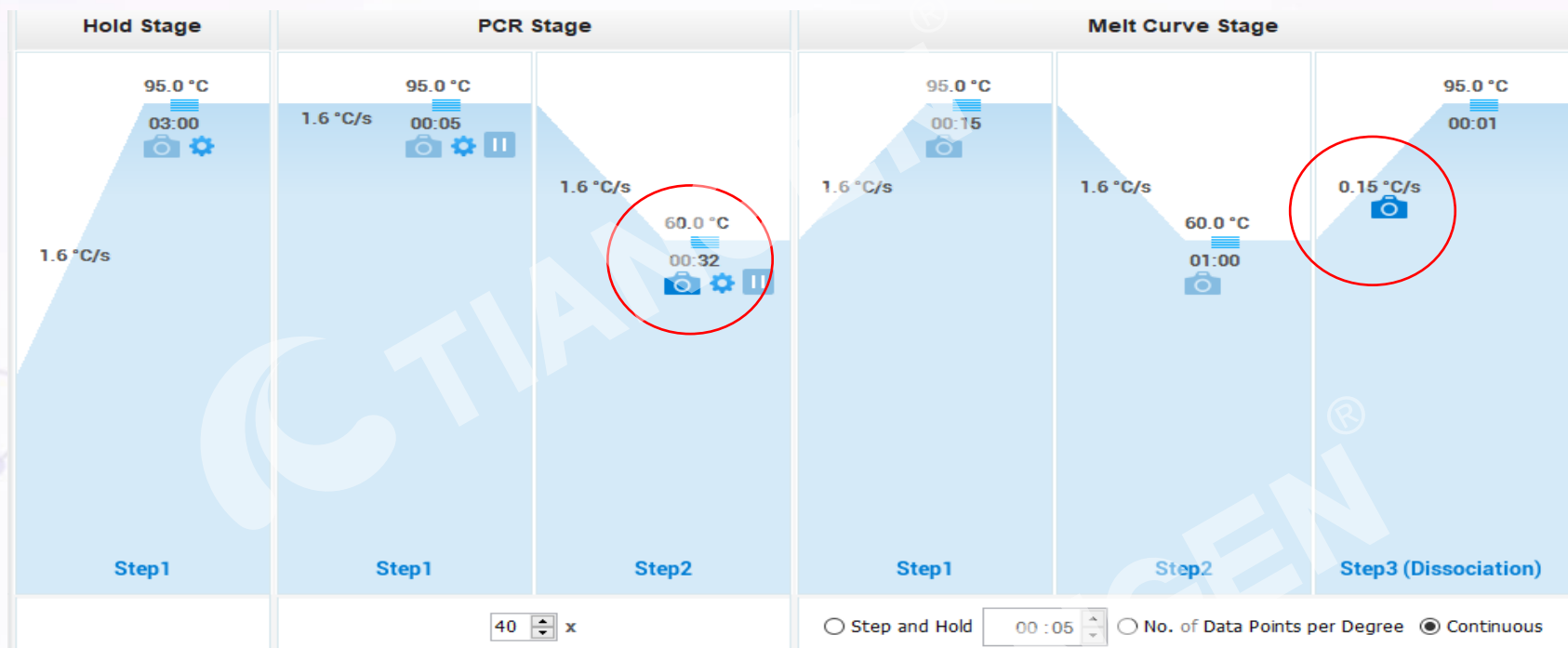
掌上微型离心机
(MC-6)



微孔板离心机
(MP-25)



cDNA模版加在管壁上，
待加样完毕后一起离心



循环	温度	时间	作用
1x	95°C	3 min	起始模板变性
40-45×	95°C	10 sec	PCR 循环中模板变性
	60°C	34 sec	退火, 延伸此处收集荧光信号
熔解曲线分析 (Melting/Dissociation Curve Stage)			

内参基因筛选



<http://icg.big.ac.cn/>

Welcome to ICG

A knowledgebase of Internal Control Genes for RT-qPCR normalization

- Species
- Genes
- Projects
- Downloads

ICG is a wiki-based knowledgebase of internal control genes (or reference genes) for RT-qPCR normalization in a variety of species. Based on community curation, ICG harnesses collective intelligence to integrate a comprehensive collection of internal control genes curated from a large volume of literatures and provides appropriate internal control genes corresponding to specific experimental conditions for both model and non-model organisms.

Nothing great is ever accomplished in isolation. – Yo-Yo Ma

73

Animals

115

Plants

12

Fungi

9

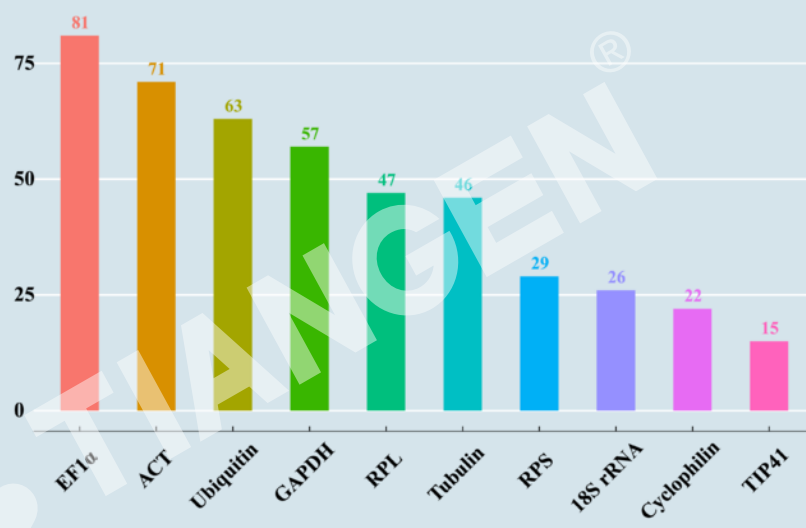
Bacteria

Recent Updates



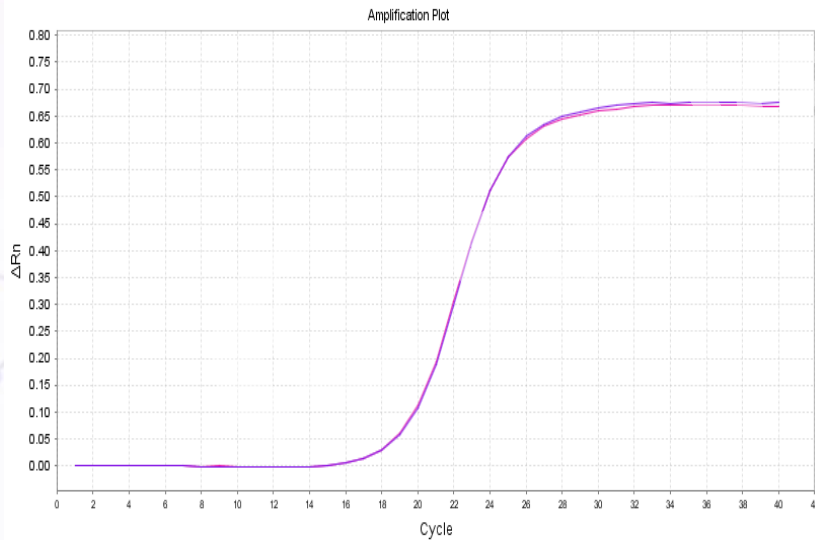
RT-qPCR内参基因筛选

Top 10 Internal Control Genes Ranked in ICG

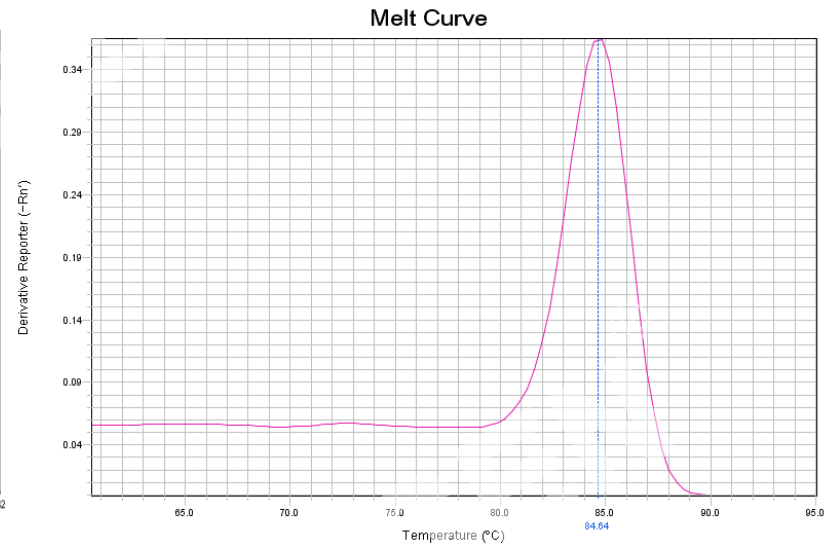


Sang *et al.*, Nucleic Acids Research, 2017

理想的扩增曲线、熔解曲线与CT值



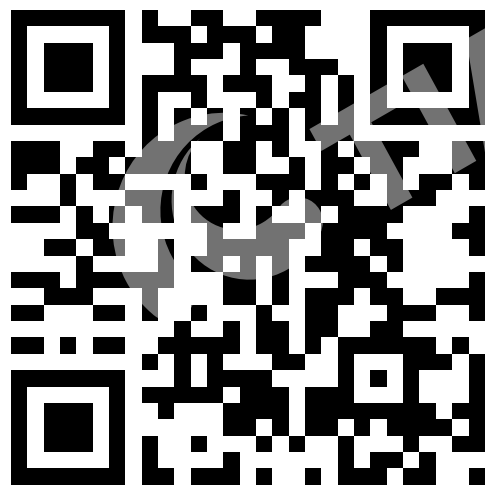
平滑的S型扩增曲线



熔解曲线单峰 (T_m值在80-90°C)

- 阳性结果(科研)理想的CT值范围: $15 < CT < 30$
- 阴性对照: $Ct > 35$
- 技术重复之间的CT差异 < 0.5
- 例如A基因三个技术重复CT值: 18.29/18.33/18.40

视频操作指南--反转录（KR118）



截图保存图片后，微信扫码观看视频

视频操作指南--qPCR (FP209)



截图保存图片后，微信扫码观看视频