

## Real time PCR 프로토콜

2021.05.31. 권정원 작성

### ○ RNA isolation

1. Trizol을 사용하여 세포 지질층을 녹인다. (24웰 플레이트에 경우 한 웰당 500 $\mu$ l 넣음)
2. Trizol을 건어 1.5ml tube에 옮기고 vortexing을 강하게 15초 이상 하거나 주사기로 15번 이상 왔다 갔다 하며 쪼갬다.
3. Chloroform 100 $\mu$ l 넣고 vortexing을 강하게 15초 이상하여 액체가 잘 섞여 분홍빛으로 변하게 한다. (투명색 층이 위로 올라옴)
4. 미리 차갑게 해둔 상태에서 13000 rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C로 centrifuge 한다.
5. 그 후 투명색 상층액만 200 $\mu$ l 떠다. (밑 층에 닿아 오염되지 않게 조심스럽게 떠다.)
6. Isopropanol 200 $\mu$ l을 넣고 inverting 5번 해준다.
7. -20 $^{\circ}$ C에서 한 시간 incubation 시킨다.
8. 한 시간 후 미리 차갑게 해둔 상태에서 13000 rpm, 15분, 4 $^{\circ}$ C로 centrifuge 한다.
9. 상층액을 suction하고 75% ethanol, 25% DEPC-water의 washing 용액을 1ml 넣어준다.
10. 간단한 vortexing 으로 섞어준 후 다시 13000 rpm, 5분, 4 $^{\circ}$ C로 centrifugation 한다.
11. washing 과정을 2번 반복한다.
12. washing buffer를 suction 한 후 1.5ml 튜브 안에 있는 에탄올이 날라가게 한다. (세포 벤치의 바람을 이용해서 말림, 20분 가량 소요)
13. DEPC-water 20 $\mu$ l로 elution 시킨다. (필요시 -20 $^{\circ}$ C 저장)

### ○ cDNA synthesis

14. Nano drop 기계를 사용하여 RNA를 정량한다.
15. 정량한 RNA를 1 $\mu$ g으로 계산하여 새로운 1.5ml 튜브에 15.2 $\mu$ l로 넣어준다. (총량은 20 $\mu$ l임. 필요시 DEPC-water로 채워준다.)
16. OligoDT와 dNTP를 각 1 $\mu$ l씩 넣어준다.
17. 65 $^{\circ}$ C에서 5분 incubation 시킨 후 ice에서 5분 incubation 시킨다.
18. 10X buffer 2 $\mu$ l + RNA reverse transcriptase 0.4 $\mu$ l + RNase inhibitor 0.4 $\mu$ l를 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 45분 incubation 시킨다.
19. 70 $^{\circ}$ C에서 15분 incubation 시킨 후 ice에서 식혀준다.

○ real time PCR

20. 합성된 cDNA를 사용하여 PCR 준비한다.

21. 원하는 타겟 primer를 forward, reverse로 준비하고 SYBR을 준비한다.

22. 한 샘플 당 SYBR 25 $\mu$ l, ultrawater 22.5 $\mu$ l, primer forward/reverse 각 0.25 $\mu$ l의 premix를 만든다. (총량은 50 $\mu$ l, 원하는 샘플 개수보다 1-2개 이상 분량으로 premix를 만들면 좋다.)

23. 새로운 1.5ml 튜브에 premix 48 $\mu$ l씩 넣고 cDNA 2 $\mu$ l씩 넣는다.

24. PCR tube에 한 샘플당 duplicate로 넣는다. (PCR tube에 20 $\mu$ l 분주한다.)

25. 간단한 centrifuge를 사용하여 벽면에 붙은 용액을 밑으로 가라앉힌다.

26. PCR 기계에 넣어 적정 온도와 사이클을 조절하고 PCR을 진행한다.