**实验八 半定量RT-PCR**

**一、实验目的**

学习利用半定量RT-PCR测定改造后hhl1基因的表达差异

**二、实验原理**

RT-PCR将以RNA为模板的cDNA合成同PCR结合在一起，提供了一种分析基因表达的快速灵敏的方法。RT-PCR用于对表达信息进行检测或定量。另外，这项技术还可以用来检测基因表达差异或不必构建cDNA文库克隆cDNA。RT-PCR比其他包括Northern印迹、RNase保护分析、原位杂交及S1核酸酶分析在内的RNA分析技术，更灵敏，更易于操作。

RT-PCR的模板可以为总RNA或poly(A)+选择性RNA。逆转录反应可以使用逆转录酶，以随机引物、oligo(dT)或基因特异性的引物（GSP）起始。RT-PCR可以一步法或两步法的形式进行。在两步法RT-PCR中，每一步都在最佳条件下进行。cDNA的合成首先在逆转录缓冲液中进行，然后取出1/10的反应产物进行PCR。在一步法RT-PCR中，逆转录和PCR在同时为逆转录和PCR优化的条件下，在一只管中顺次进行。

**三、实验材料及仪器用具**

1. 实验材料

转染后的拟南芥原生质体

2. 实验试剂

RNA抽提试剂盒、氯仿、无水乙醇、琼脂糖 、10×TBE电泳缓冲液、10×载样缓冲液、EB母液(0.5 mg/ml) 、分子量标记、ddH2O、dNTP、Taq酶、Mg2+、10×Buffer

3. 实验仪器

微波炉、电泳仪、微型电泳槽、紫外透射检测仪、微量取液器、吸管头若干、加样板、量筒100 ml、三角瓶500 ml、透明胶带、DNA热循环仪、电泳仪、电泳槽、紫外检测仪、台式离心机、0.5ml离心管10个、吸管头若干个、微量取液器(20 ×l)一支、1.5ml离心管20个、离心管架两个

**四、实验步骤**

1. 试剂盒抽提RNA

2. 初步测定RNA质量

先用稀释用的TE溶液将分光光度计调零。然后取少量RNA溶液用TE稀释（1:100）后，读取其在分光光度计260 nm和280 nm处的吸收值，测定RNA溶液浓度和纯度。

凝胶电泳比对，当荧光都很亮很亮，会难以比对。

当荧光都很暗很暗，会难以比较。

① 浓度测定

A260下读值为1表示40 µg RNA/ml。RNA溶于40 µl DEPC水中，取5µl，1:100稀释至495 µl的TE中，样品RNA浓度(µg/ml)计算公式为：A260 ×稀释倍数× 40 µg/ml。

②纯度检测

RNA溶液的A260/A280的比值即为RNA纯度，比值范围1.8到2.1。

3. 逆转录获取第一条cDNA链

（1）配制反应体系

|  |  |
| --- | --- |
| 试剂 | 剂量（µl） |
| 逆转录缓冲液 | 2 |
| 上下游引物 | 各0.2 |
| dNTP | 0.1 |
| 逆转录酶MMLV | 0.5 |
| DEPC水 | 5 |
| RNA模板 | 2 |

轻弹管底将溶液混合，6000rpm短暂离心。

（2）混合液在加入逆转录酶MMLV 之前先70℃干浴3分钟，取出后立即冰水浴至管内外温度一致，然后加逆转录酶0.5μl，37℃水浴60分钟。 ③取出后立即95℃干浴3分钟，得到逆转录终溶液即为cDNA溶液，保存于-80℃待用。

4. cDNA的聚合酶链式反应及浓度检测

**五、注意事项**

1、 实验器材和用品做好抑制RNA酶准备；操作过程中避免RNA酶污染；提取的组织细胞样品不能太多（可能裂解不充分等）。

2、PCR扩增中循环次数恰当。过少的循环次数条带出不来，过高的循环次数条带太亮看不出差异（达到平台期后也不准确）。

3、Mg2+浓度和Taq酶含量适度。过高容易引起非特异性条带。

4、建议在RT逆转录前可以对样品进行DNA酶处理，以纯化提取的样品RNA。

5、图像定量分析时尽量选择浅条带，太亮的条带不可靠。