

## ddRT-PCR(差示反转录 PCR,又 mRNA 差别显示技术)

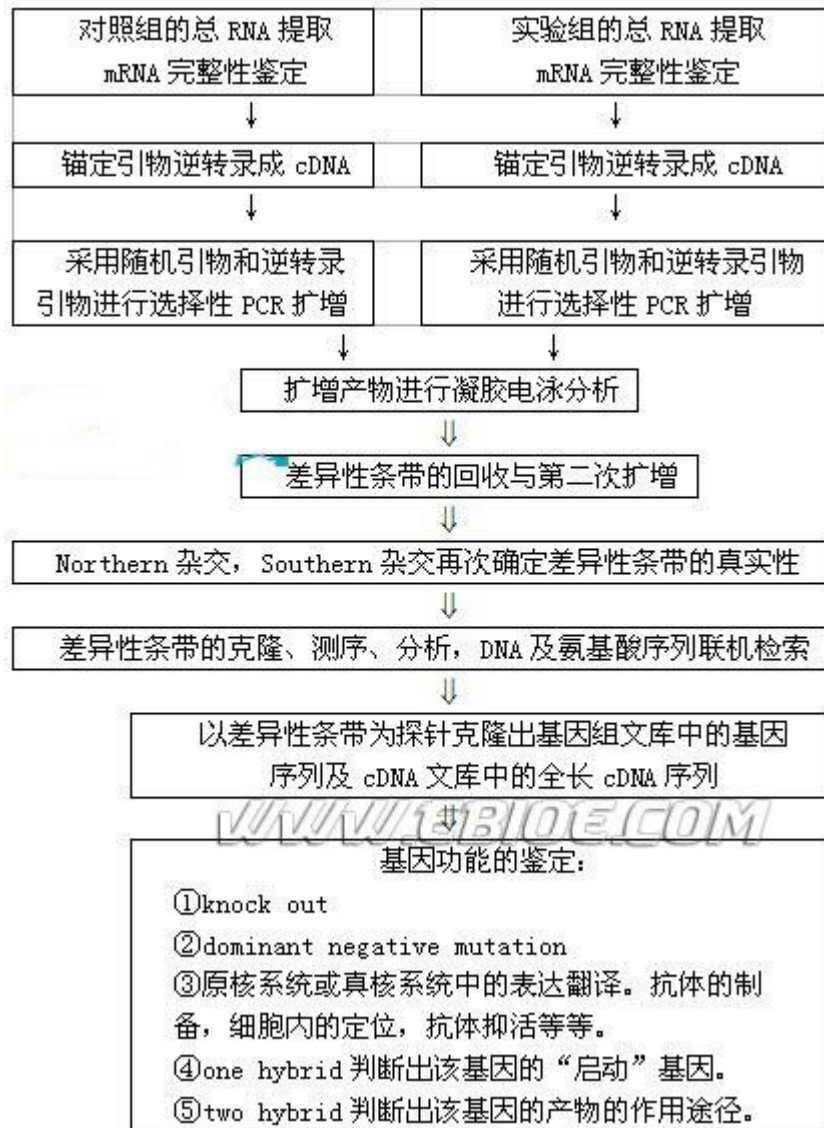
mRNA 差别显示技术也称为差示反转录 PCR (Differential Display of reverse Transcriptional PCR) 简称为 ddRT-PCR。它是将 mRNA 反转录技术与 PCR 技术二者相结合发展起来的一种 RNA 指纹图谱技术。

目前已广泛应用于分离鉴定组织特异性表达的基因。差别基因表达 (differential gene express) 是细胞分化的基础。mRNA 差别显示技术正是对组织特异性表达的基因进行分离的一种快速而行之有效的方法。该方法的基本原理是首先选取不同的组织样品或不同发育阶段的同一组织样品或同一组织样品经不同药物处理诱导的样品, 经总 RNA 提取后, 进行 mRNA 反转录合成 cDNA。

此 cDNA 的合成是采用 Oligo (dT) 12 MN 为引物, 其中 M 为 A, C, G 中的任意一种, N 为 A, C, G 或 T 中的任意一种, 所以共有 12 种 oligo (dT) 12 MN 引物, 其中 M 称为锚定碱基, 起增大引物 Tm 值的作用, N 称为分类碱基, 对反转录进行分类。用这 12 种引物分别对同一总 RNA 样品进行 cDNA 合成, 即进行 12 次不同的反转录反应, 从而使反转录的 cDNA 具有 12 种类型, 也就是对 cDNA 进行 12 种归类 (目前较为流行的方法是进行 4 种归类, 即 M 为简并碱基的形式存在), 在此基础上对每一类 cDNA 进行随机引物和反转录引物 PCR 扩增, 通过对组织样品的同一类 cDNA 的 PCR 选择性扩增产物凝胶电泳分析, 从而反映出不同样品间基因的时间和空间上组织特异性的表达。

如此众多种类的 mRNA 反转录产物经 PCR 选择扩增后其类型依然为数众多, 很难用电泳系统加以快速准确地分离。因而需要对反转录产物 cDNA 进行归类处理, 减轻不同 PCR 产物电泳分离的难度, 提高分离的准确率。(见示意图)

一、实验流程:



这里以 CLONTECH 公司生产的 Delta™ Differential Display Kit 为例, 介绍具体的实验

步骤。该试剂盒中含有 10 种任意引物和 9 种 Oligo(dT)引物。

## 二、操作步骤

1. 总 RNA 的提取 (见 Northern 杂交)

2. 第一链合成:

(1)总 RNA 样品 2μg; cDNA 合成引物 1μl; 加 ddH<sub>2</sub>O 补至 5μl。将管标号为 1A,2A,PC

A 等。PC 为阳性对照。

(2)混匀后稍离心。

(3) 70℃孵育 3min, 冰浴 2min 后稍离心。

(4) 准备 dNTP mix (以 5 管为例 )

5×第一链缓冲液	2μl	10μl
dNTPmix (各 5mM)	2μl	10μl
MMLV 逆转录酶 (200u/μl)	1μl	5μl
	5μl	25μl

(5) 每管加入 5μl, 混匀后稍离心。

(6) 42℃孵育 1hr。

(7) 75℃ 10min 终止反应后置冰上, 稍离心。

(8)将 2μl 反应液分别转至新管中 (新管标号为 1B,2B,PC B 等)。

(9) 将 78μl ddH<sub>2</sub>O 分别加入 B 管中,混匀。

(10) 将 72μl ddH<sub>2</sub>O 分别加入 A 管中, 混匀。

(11) 将所有 cDNA 稀释液 -20℃保存待用。

3. dd-PCR: 以 引物 P1,T9 为例说明

(0.5ml PCR 管,1 代表对照组,2 代表实验组)

管号 cDNA 样品 引物

(1) 1A P1,T9

(2) 1B P1,T9

(3) 2A P1,T9

(4) 2B P1,T9

(5) H<sub>2</sub>O P1,T9

(6) RNA1 P1,T9

(7) RNA2 P1,T9

以下为阳性对照反应体系

(8) PC 1A P10,T8

(9) PC 1B P10,T8

(10) PC 2A P10,T8

(11) PC 2B P10,T8

(12) H<sub>2</sub>O P10,T8

(13) PC RNA1 P10,T8

(14) PC RNA2 P10,T8

在 PCR 管中加入:

① cDNA 样品 1 $\mu$ l

P 引物 1 $\mu$ l

T 引物 1 $\mu$ l

② 准备其它 PCR 试剂的混合液: (在另一管中加入)

成分	每管( $\mu$ l)	所需管数( n=14)
10 $\times$ buffer	2.0	2n
ddH <sub>2</sub> O	14.0	14n
dNTPmix	0.2	0.2n
$\alpha$ - <sup>32</sup> P dATP	0.4	0.4n
Taq 酶	0.4	0.4n
终体积	17.0	17 n

混匀后稍离心。

③ 将 17 $\mu$ lPCR 混合液加入各反应管, 则各管总体积为 20 $\mu$ l。

④ 开始 PCR 扩增。

⑤ PCR 循环参数:

在 GeneAmp PCR Systems 2400 & 9600 扩增仪上执行以下程序：

1 cycles	{	94℃ 5min
		40℃ 5min
		68℃ 5min
2 cycles	{	94℃ 30sec
		40℃ 30sec
		68℃ 5min
23 cycles	{	94℃ 20sec
		40℃ 30sec
		68℃ 2min
1 cycles		68℃ 7 min.

⑥ 反应结束后置-20℃保存备用。

#### 4. 电泳和放射自显影

(1) 配制 6%变性聚丙烯酰胺凝胶，灌注测序板。

(2) 预电泳 30min。

(3) 每个 dd-PCR 反应取出 5μl 于一新微量离心管中，加 5μl loading buffer，混匀，离心，置 94℃变性 2min。立即置冰浴。

(4) 停止预电泳，冲洗加样孔。

(5) 加样 2μl。70W 电泳 2.75hr 至二甲苯青到达胶的底部。

(6) 下胶：(同测序胶)

(7) 干胶：在胶表面覆上保鲜膜，80℃干胶 30min。

(8) X 光片-70℃曝光过夜或更长时间(根据射线强度而定)。

图 2-6 显示了 dd-PCR 放射自显影的 X 光片

#### 5. 差异条带回收再扩增

(1) X 光片经 D72 显影、酸性定影液定影后，水洗晾干。置 X 光片灯上比较寻找差异条带。

(1) 用一次性手术刀片在胶上切割差异条带，加 ddH<sub>2</sub>O 20μl，沸水浴 15min，离心取上清为模板。

(3) 以原引物扩增:

回收 DNA 7  $\mu$ l

10 $\times$ PCR buffer 5  $\mu$ l

5mM dNTPmix 0.5  $\mu$ l

引物 P 2.5  $\mu$ l

引物 T 2.5  $\mu$ l

Taq 酶 2  $\mu$ l

加 ddH<sub>2</sub>O 至总体积为 50 $\mu$ l

(4) 执行 PCR 程序:

93°C3min; 93°C1min $\rightarrow$ 60°C1min $\rightarrow$ 68°C2min, 20 次循环; 68°C5min。

(5) 取 PCR 产物 10 $\mu$ l 2%琼脂糖电泳检测。

(6) PCR 产物乙醇沉淀, 10 $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O 溶解。

6. 以 PCR 产物为探针, 标记后进行 Northern 杂交, 证实基因的真实性。

7. PCR 产物的 TA 克隆。

8. DNA 序列测定。

9. 检索分析。

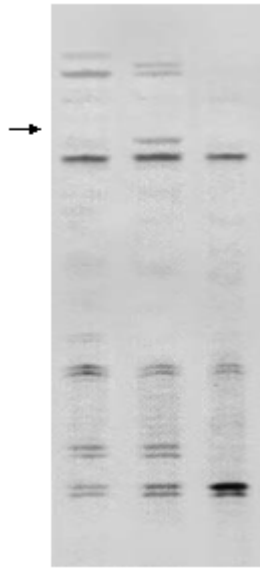


图 2-6 dd-PCR 放射自显影图

(三个泳道中反应了不同处理样品中 mRNA 表达的差异)