

竞争性 c-myc PCR 定量分析 mRNA 的转录水平

刘革修 万腊香 杨和平

(衡阳医学院分子生物学研究中心 衡阳 421001)

RNA 分析是 PCR 应用的重要方面,传统 mRNA 测定建立在分子杂交的基础上,样品用量大,灵敏度低,难以精确定量。应用逆转录 PCR 法,将微量 RNA 反转录成 cDNA,再通过 PCR 扩增,可检出 mRNA。但 PCR 操作的微小误差可引起扩增产物的很大变化,以克隆的、人工部分缺失的已知相应 DNA 作对照,在同一反应体系中扩增(竞争性 PCR),则可测出样品中 mRNA 含量。为此,我们建立了 c-myc mRNA 表达的定量方法。

1. 突变型 c-myc 外显子 I 人工合成上游引物(5'-TACGGGAGTTGCACTCGAAG-3')和下游引物(5'-GGTGGTGGTCGTCGCTGAGAC-3')扩增大鼠主动脉 DNA $\xrightarrow{\text{产生}}$ c-myc 外显子 I (756bp)
 $\xrightarrow[\text{电泳分离}]{\text{Pst I 酶切}}$ 416、218 和 122bp 三个片段 $\rightarrow$ 回收 218 和 126bp 片段 $\rightarrow$ T₄DNA 连接酶连接 $\xrightarrow{\text{产生}}$ 340 的 c-myc 外显子 I (中间缺失 416bp) $\rightarrow$ PCR 扩增 340

的 c-myc 外显子 I 作为 PCR 定量分析用。

2. 野生型 c-myc(wild-type c-myc)定量分析

抽提组织 RNA $\rightarrow$ 逆转录成 cDNA $\rightarrow$ 加一定量的野生型和突变型 cDNA $\rightarrow$ 扩增产物进行凝胶电泳 $\rightarrow$ 比较二者带型 $\rightarrow$ 图像分析 $\rightarrow$ 确定组织中 c-myc mRNA 的转录水平(如图)。

