**以Rad51基因为目的基因设计的PCR实验**

3190034053 王佳琳 2019级医学检验技术

**一、原理：**

在DNA聚合酶和引物的参与下，以靶DNA为模板，按照碱基互补配对原则合成互补链，并对反应产物进行定量和半定量分析。本实验选择Rad51基因为扩增对象。

**二、试剂：**

1、目的基因Rad51；

2、目的基因Rad51特异引物：引物用无菌去离子水配制成浓度1mmol/L的储存液，实验时再稀释至工作浓度。

3、10×PCR缓冲液：100mmol/L Tris-HCl（pH=8.3），500mmol/L KCl，0.1%明胶和15mmol/L MgCl2。一般酶都有自带10×缓冲液。

4、脱氧核苷三磷酸（dNTPs）混合液：含dATP、dCTP、dGTP、dTTP各2mmol/L。

5、Taq DNA聚合酶。

6、其他电泳和Trizol法相关试剂。

**三、器材：**

DNA扩增仪、台式高速离心机、凝胶成像分析系统、琼脂糖凝胶电泳系统、移液器及吸头、PCR反应管、漩涡混匀器、锥形瓶、微波炉以及Trizol法相关器材。

**四、操作步骤：**

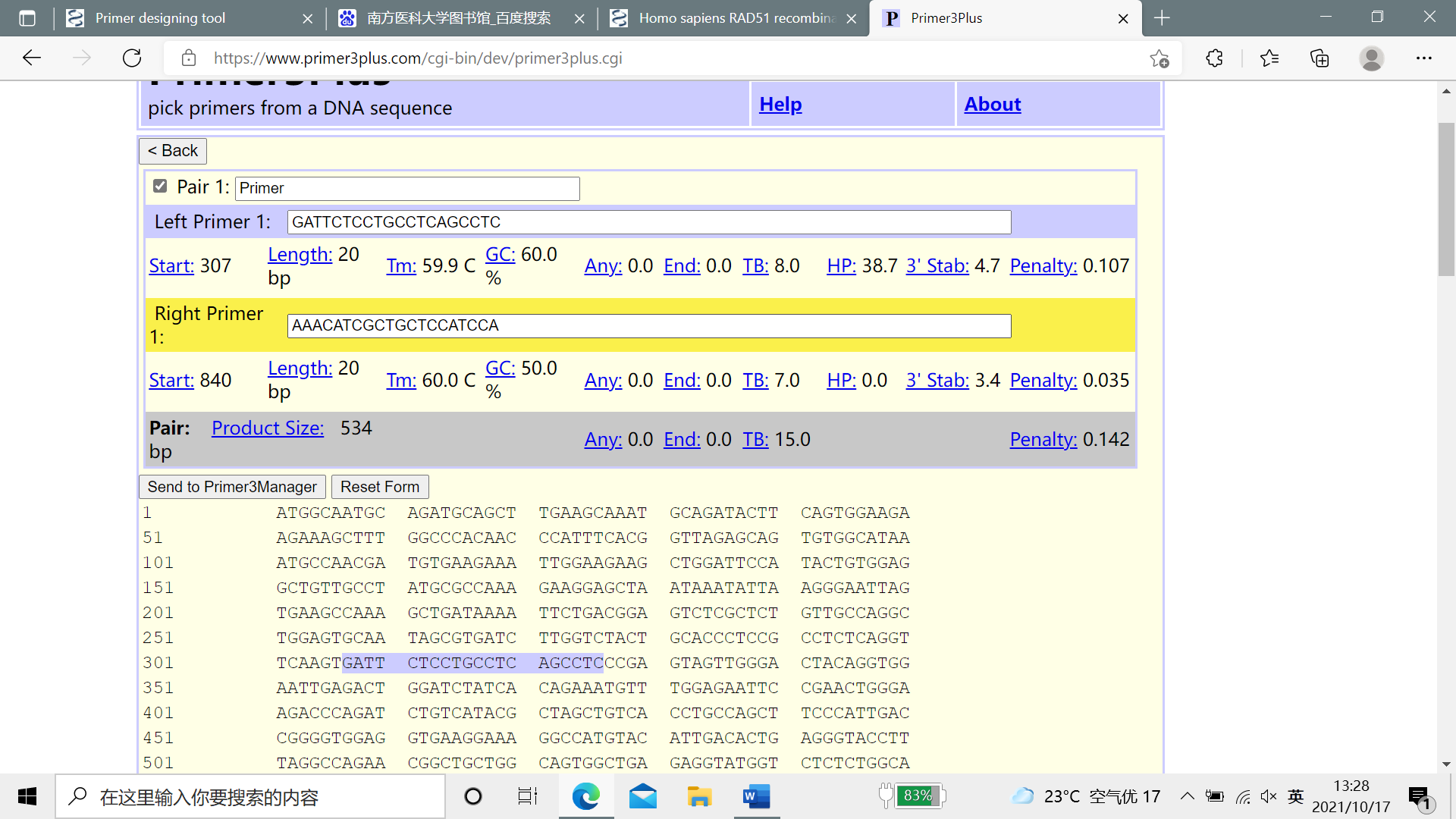
1、基因序列与编码序列的查找

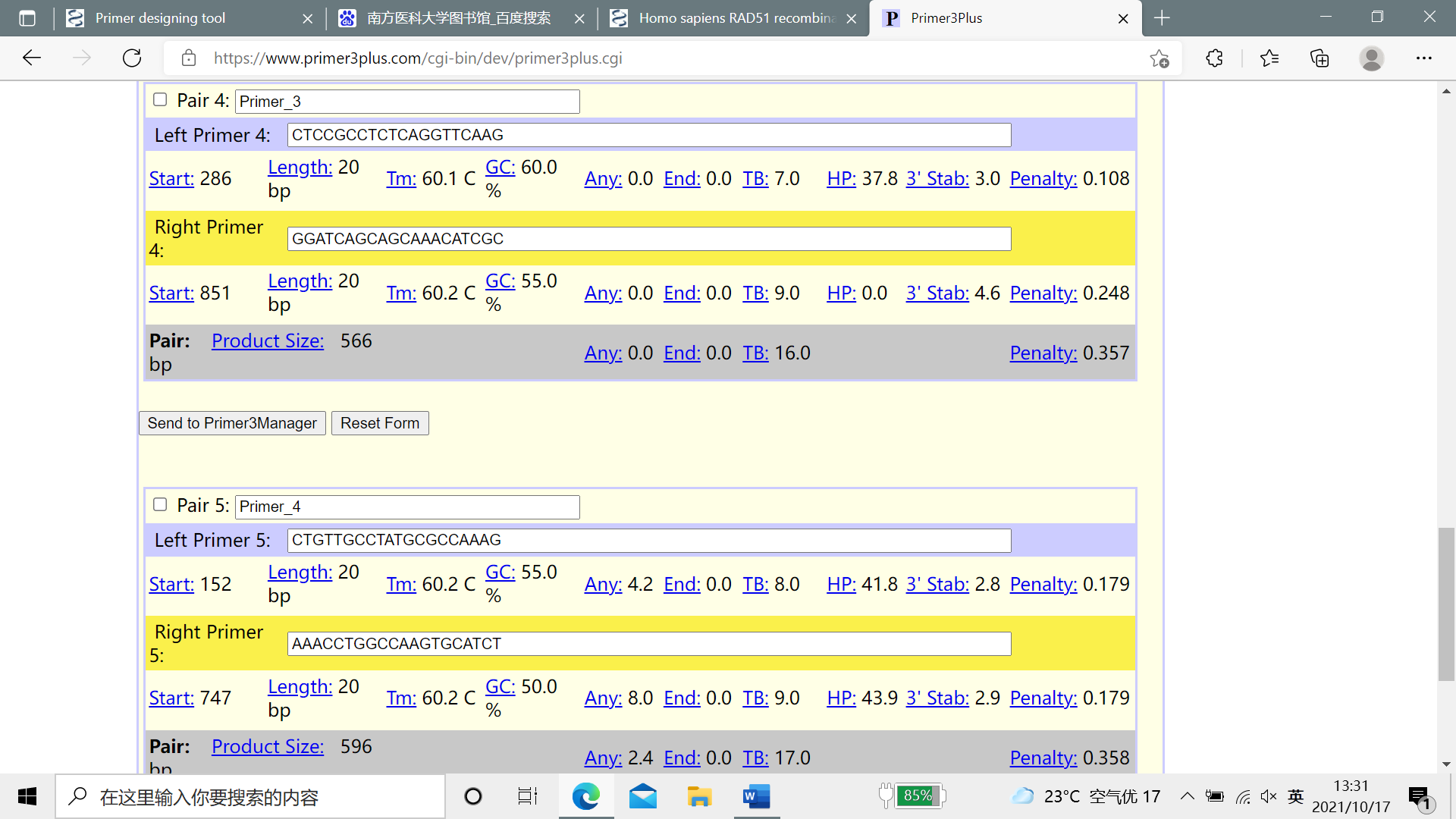
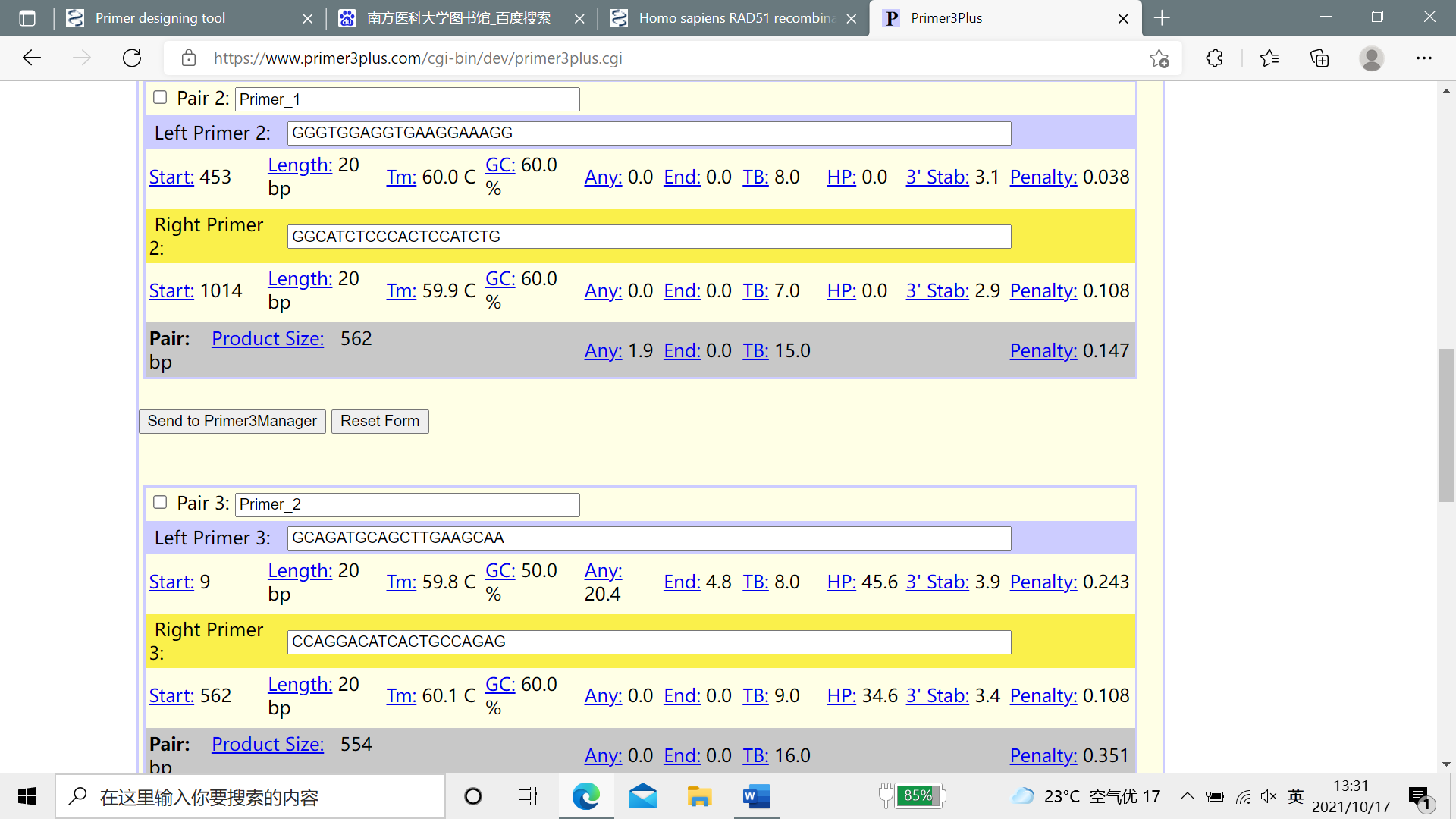
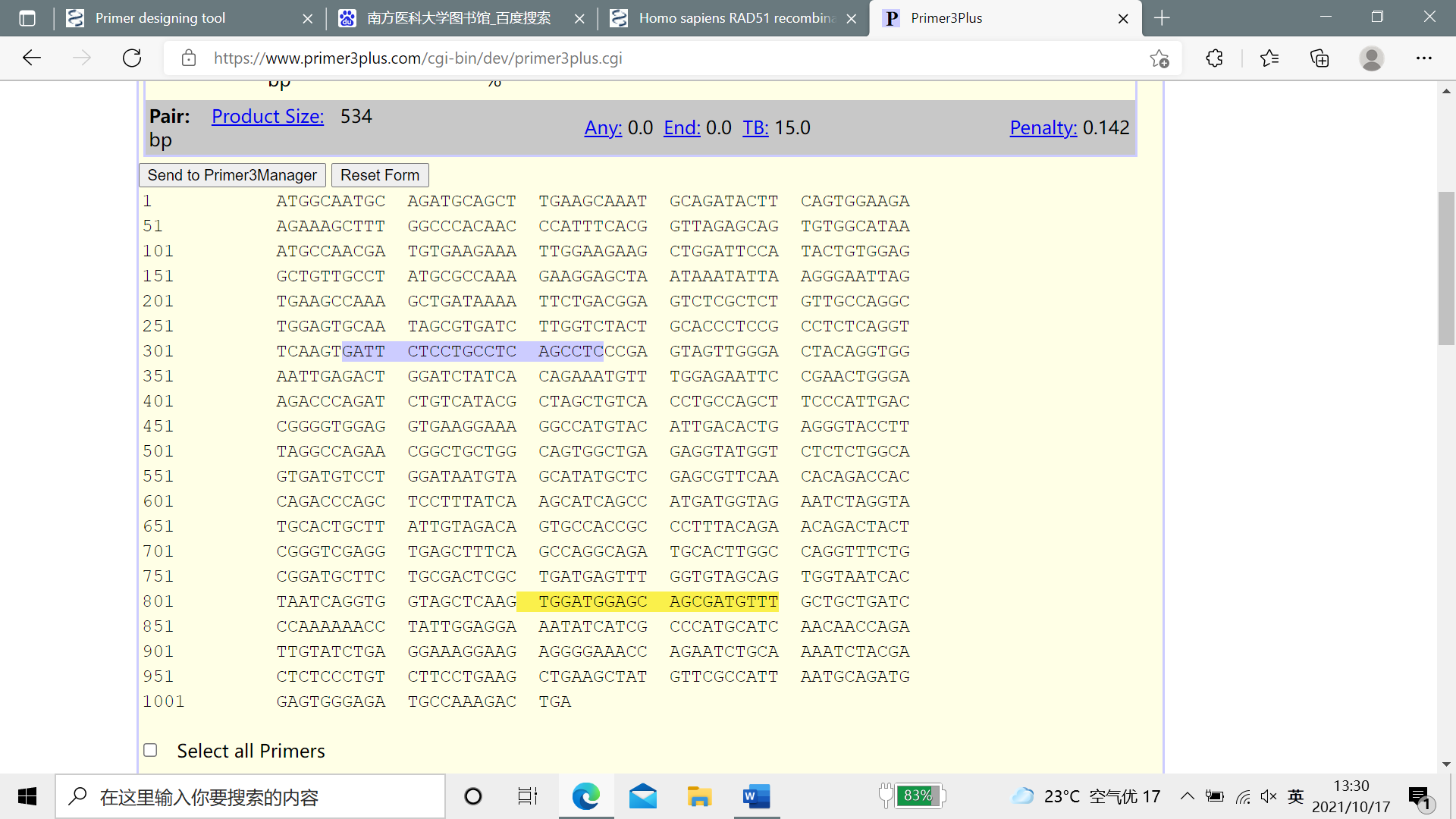
在NCBI查找Rad51的基因序列及编码序列，如下：

atggcaatgcagatgcagcttgaagcaaatgcagatacttcagtggaagaagaaagctttggcccacaacccatttcacggttagagcagtgtggcataaatgccaacgatgtgaagaaattggaagaagctggattccatactgtggaggctgttgcctatgcgccaaagaaggagctaataaatattaagggaattagtgaagccaaagctgataaaattctgacggagtctcgctctgttgccaggctggagtgcaatagcgtgatcttggtctactgcaccctccgcctctcaggttcaagtgattctcctgcctcagcctcccgagtagttgggactacaggtggaattgagactggatctatcacagaaatgtttggagaattccgaactgggaagacccagatctgtcatacgctagctgtcacctgccagcttcccattgaccggggtggaggtgaaggaaaggccatgtacattgacactgagggtacctttaggccagaacggctgctggcagtggctgagaggtatggtctctctggcagtgatgtcctggataatgtagcatatgctcgagcgttcaacacagaccaccagacccagctcctttatcaagcatcagccatgatggtagaatctaggtatgcactgcttattgtagacagtgccaccgccctttacagaacagactactcgggtcgaggtgagctttcagccaggcagatgcacttggccaggtttctgcggatgcttctgcgactcgctgatgagtttggtgtagcagtggtaatcactaatcaggtggtagctcaagtggatggagcagcgatgtttgctgctgatcccaaaaaacctattggaggaaatatcatcgcccatgcatcaacaaccagattgtatctgaggaaaggaagaggggaaaccagaatctgcaaaatctacgactctccctgtcttcctgaagctgaagctatgttcgccattaatgcagatggagtgggagatgccaaagactga

2、引物的设计

应用Primer3plus输入Rad51的基因序列，可得多组引物序列如下：



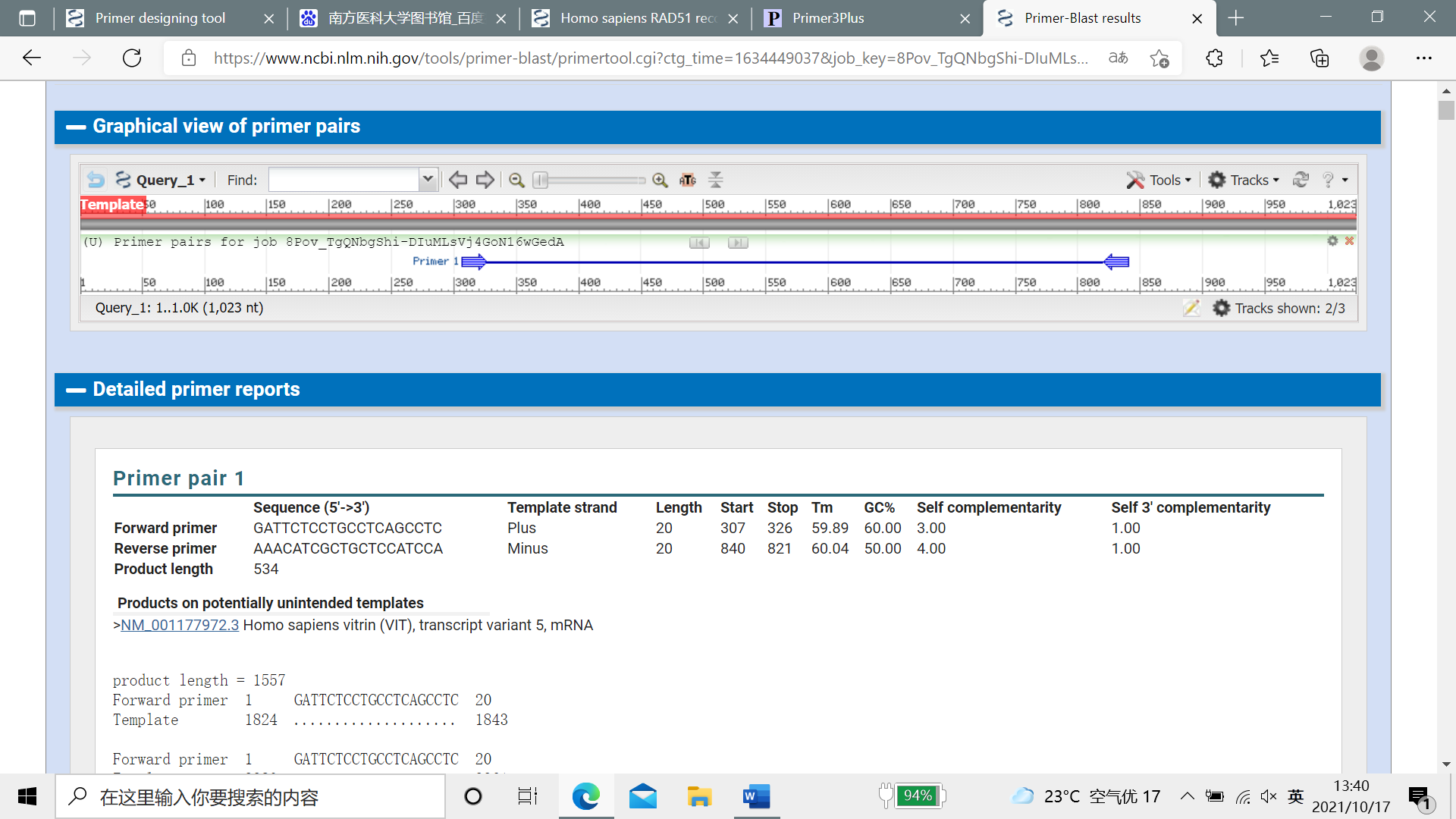


3、应用BLAST评估引物的特异性

应用BLAST输入Rad51基因序列以及与多组引物序列比对可知，最佳引物序列如下：

上游引物序列：5’-GATTCTCCTGCCTCAGCCTC-3’

下游引物序列：5’-AAACATCGCTGCTCCATCCA-3’



4、Rad51基因的提取

RNA的提取采用TRIzol法，步骤如下：

（1）液氮速冻：新鲜组织块快速放入液氮中速冻。

（2）组织研磨：将组织直接放入研钵中，加入液氮，迅速研磨，待组织变软，再加入少量液氮，再研磨，直至研磨完全。

（3）匀浆：组织样品按50-100mg/ml Trizol，用电动匀浆器充分匀浆约需1-2min。

（4）将Trizol补足到1ml，室温放置5min，使其充分裂解。

（5）12000rpm离心5min，弃沉淀。

（6）按200μl氯仿/ml Trizol加入氯仿，振荡混匀后室温放置2min。

（7）在4℃，12000rpm条件下离心15min。

（8）小心吸取上层至新的离心管中。

（9）按0.5ml异丙醇/ml Trizol加入异丙醇混匀，-80℃过夜沉淀RNA。

（10）在4℃，12000rpm条件下离心30min，RNA沉于管底。

（11）小心弃上清，按1ml 75%乙醇/ml Trizol加入预冷的75%乙醇，温和震荡离心管，悬浮沉淀。

（12）在4℃，8000g离心5min，尽量弃上清。

（13）室温晾干或真空干燥5-10min。

（14）可用20μl ddH2O溶解RNA样品。

（15）测OD值定量RNA浓度。

5、PCR体系的优化

体系优化的基本策略是在保持其他因素一致的条件下，通过变化单一因素（模板浓度、Mg2+浓度、引物浓度、dNTP浓度、Taq DNA聚合酶浓度）来筛选每个参数的最优条件。

6、配制PCR反应体系

在冰浴中，按下列表格配制反应液：

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 浓度（μl） |
| DNA模板 | 5.0 |
| 10×PCR缓冲液 | 5.0 |
| dNTPs（每种dNTP各2.5mmol/L）  Taq DNA聚合酶 | 4.0  0.4 |
| 上游引物（20μmol/L） | 0.5 |
| 下游引物（20μmol/L） | 0.5 |
| 蒸馏水 | 补至50μl |

7、PCR反应

按如下条件进行PCR扩增：94℃预变性2min；94℃变性45s；48℃退火45s；72℃延伸60s；共进行35个循环；最后72℃延伸5min。

8、结束反应

收集反应管，离心15s，取扩增产物进行电泳分析。

9、产物检测

通过琼脂糖凝胶电泳检测Rad51基因的扩增结果。