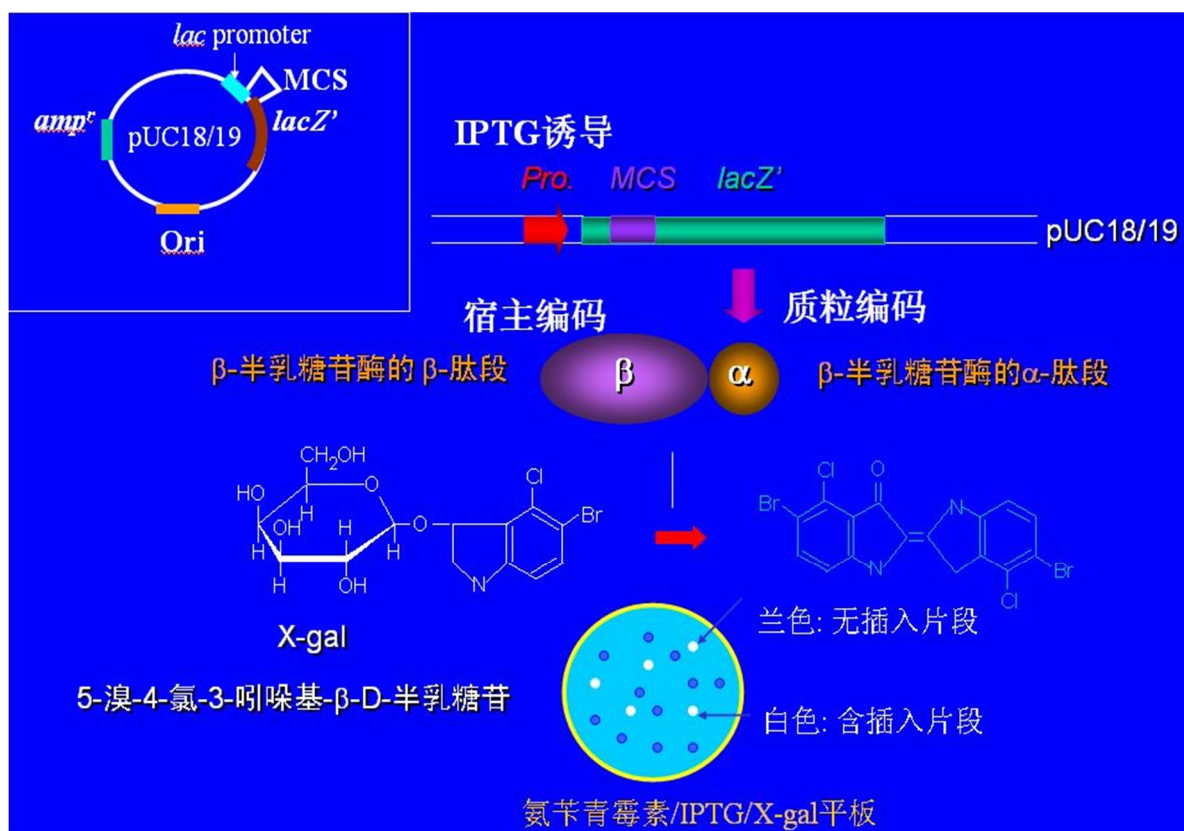


PCR 原理（百度百科）

PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性--退火--延伸三个基本反应步骤构成：①模板 DNA 的变性：模板 DNA 经加热至 93℃左右一定时间后，使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；②模板 DNA 与引物的退火（复性）：模板 DNA 经加热变性成单链后，温度降至 55℃左右，引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合；③引物的延伸：DNA 模板--引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下，以 dNTP 为反应原料，靶序列为模板，按碱基互补配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链，重复循环变性--退火--延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟，2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

预变性



循环数

大多数 PCR 含 25-35 循环，过多易产生非特异扩增。

最后延伸

在最后一个循环后，反应在 72℃ 维持 7~10 分钟，使引物延伸完全，并使单链产物退火成双链。

蓝白斑筛选是重组子筛选的一种方法：是根据载体的遗传特征筛选重组子，如 α -互补、抗生素基因等。现在使用的许多载体都带有一个大肠杆菌的 DNA 的短区段，其中有 β -半乳糖苷酶基因 (*lacZ*) 的调控序列和前 146 个氨基酸的编码信息。在这个编码区中插入了一个多克隆位点 (MCS)，它并不破坏读框，但可使少数几个氨基酸插入到 β -半乳糖苷酶的氨基端而不影响功能，这种载体适用于可编码 β -半乳糖苷酶 C 端部分序列的宿主细胞。因此，宿主和质粒编码的片段虽都没有酶活性，但它们同时存在时，可形成具有酶学活性的蛋白质。这样，*lacZ* 基因在缺少近操纵基因区段的宿主细胞与带有完整近操纵基因区段的质粒之间实

现了互补，称为 α -互补。由 α -互补而产生的 LacZ+细菌在诱导剂 IPTG 的作用下，在生色底物 X-Gal 存在时产生蓝色菌落，因而易于识别。然而，当外源 DNA 插入到质粒的多克隆位点后，几乎不可避免地导致无 α -互补能力的氨基端片段，使得带有重组质粒的细菌形成白色菌落。这种重组子的筛选，又称为蓝白斑筛选。

RACE 是采用 PCR 技术由已知的部分 cDNA 顺序来扩增出完整的 cDNA 3'和 5'端的方法，又被称为单边 PCR(one-sided PCR)和锚定 PCR(anchored PCR)。

3'-RACE 的一般过程是：以 oligo(dT)17 和在许多文章中被称为锚引物(anchor primer)或接头(adaptor)的序列组成的引物 QT 逆转录 mRNA 得到第一条 cDNA 链，然后用含部分锚引物序列的引物 Q0 与基因特异性引物 GSP1 进行第一轮扩增得到双链 cDNA，第二轮扩增则采用内部引物(nested primer)Q1 和 GSP2，以防止产生非特异性扩增产物。

采用同样的原理可以进行 5'-RACE，

先用基因特异性引物 GSP-RT 逆转录 mRNA 获得 cDNA 第一条链 I

然后用末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)和 dATP 在 cDNA 5'端加上 poly(A)尾巴再使用

(1)QT 引物合成 cDNA 第二条链；

(2)Q0 和一个在 GSP-RT 上游的引物 GSP1 扩增 cDNA,最后采用内部引物 Q1 和 GSP2 进行第二轮 PCR 扩增以提高特异性。

扩增后得到的双链 cDNA 用限制性内切酶酶切和 Southern 杂交分析并克隆，得到 5'特异性和 3'特异性的 cDNA 文库。从两个有相互重叠顺序的 5'和 3' RACE 产物中可以获得全长 cDNA，或者可以分析 5'和 3'端顺序，合成相应引物扩增出全长 cDNA。

反转录

两步法

1)在 ProE K 处理的 PCR 管中（冰上操作）

RNA 1ul

Oligo(dT)18 Primer 2ul

RNase Free H2O 9ul

总体积 12ul

2)70℃保温 10min 后迅速在冰上急冷 2min 以上

3) 在 PCR 管中配置下列反转录溶液

5×M-MLV Buffer 4ul

dNTP mixture (10mM) 1ul

RNase Inhibitor	0.5ul
RTase M-MLV (RHase H)	0.8ul
RNase Free H2O	1.7ul
总体积	8ul

4) 42°C 延伸 60min, 70°C 保温 15min, 冰上冷却得到 cDNA -20°C 报存。

一步法

5×Reaction Buffer	4.0ul
SupermoIII M-MLV	1.0ul
RRI(40U/ul)	0.5ul
dNTP mixture (10mM)	2.0ul
RNase Free H2O	10ul
引物 (Oligo(dT)18 Primer)	1.0 ul
RNA	1.5ul
总体积	20ul

50°C 60min 70°C 10min 置冰上

cDNA 内参检测 内参引物用 Efl α , 或者 GAPDH, ACTIN

10× buffer	2.5 μ l	94°C	3min	} 30~35 轮
dNTP mix (2.5mM)	2 μ l	94°C	30s	
MgCL ₂ (25mM)	1.5	55°C	30s	
引物 1 (10pM)	1 μ l	72°C	30s	
引物 2 (10pM)	1 μ l	72°C	7min	
Taq 酶	0.2 μ l	4°C	∞	
cDNA	1 μ l			
ddH2O	16 μ l			
总体积	25ul			

PCR

10× buffer (不含 MgCL ₂)	2.5 μ l	25
dNTP mix (2.5mM)	2 μ l	20
MgCL ₂ (25mM)	1.5	
引物 1 (10pM)	1 μ l	10
引物 2 (10pM)	1 μ l	10
Taq 酶 (2U/ μ l)	0.2 μ l	2
DNA 模板 (50ng-1 μ g/ μ l)	1 μ l	
ddH2O	16 μ l	160
总体积	25ul	

94°C	3~5min	} 28~35 轮
94°C	30s	
50~65°C	30s	
72°C	30s~2min	
72°C	7~10min	
4°C	∞	

退火温度根据设计的引物设定，72℃延伸根据片段长度设定
一般先缓冲液，dNTP mix，水，引物（若相同），Taq 酶配成混样，混匀后分装到 PCR 管中。
若使用排管，加石蜡。
结束反应，PCR 产物放置于 4℃待电泳检测或-20℃长期保存。

电泳检测

凝胶电泳

1%的琼脂糖凝胶：称取 1g 琼脂糖，加 100ml TAE 缓冲液，微波加热后待温度降至 60 度以下，加入适量 EB(一般是两滴，视 EB 浓度而定)，倒入板子上，插上梳子。
一般检测用小号梳子（一排 25 个），加 10ulPCR 产物；产物胶回收用中号（18 个）或大号梳子（13 个），一般分别加 20ul 产物或 50ul 产物。

产物凝胶回收

采用胶回收试剂盒，方法详见说明书，按步骤操作

注意：提前将 Eluent 或去离子水 放入 80 度烘箱

BUFFER W2 确保使用前已经加入指定体积的无水乙醇

最后洗脱时，一般加 20ul Eluent 或去离子水，可延长静置时间

PCR 产物回收

采用产物回收试剂盒，方法详见说明书，按步骤操作

连接

目的片段 2.0ul (根据条带亮度酌量添加)

Solution I 2.5 ul

PMD19-T 0.5ul

总体积 5ul

离心

16℃ 30~60min (使用金属浴或 PCR 仪,片段长可增加延伸时间)

转化

1.将连接产物加入大肠杆菌感受态 100ul(至少 50ul)，混匀后冰浴 30min

2.热激；42℃ 60~90s

3.冰浴 3min，加入 LB 液体 600~800ul，37℃摇床 1~2h

4.涂板：离心 4000rpm/min 5min 或者 12000rpm/min 1min 在提前灭过菌的组培台上，将上清液吸出，留 100~200ul 上清，吸打沉淀至混匀后加到板子上，涂布至完全吸收（刚开始涂布感觉是光滑的，完全吸收后感觉是粘的，自己体验吧）

5.37 度烘箱，放置 12~16h

若板长模糊多可能是抗生素失效，也可能是感受态污染

若板未长出

当跑胶条带不亮时，板未长出菌时，跑胶检测是否胶回收到产物，可增加目的片段至 2.5ul, solution I 加入 2ul，或者将体系扩大到 10ul, 或者以胶回收产物为模板，PCR 扩增胶回收后再连接转化

菌液检测(仅适用大肠杆菌)

在 1.5ml 离心管中加入适量含抗生素的 LB(600ML)

用白枪头挑取单克隆(白斑)，放入含抗生素 LB 中，用 parafilm 包住离心管后，放入摇床摇 2h 以上，吸取 1~2ul 作模板，引物是采用跑出条带的引物，普通 PCR 程序。

跑胶查看是否可以跑出目的条带片段长度

基因克隆

中间片段获得

1) 从转录组中获得中间片段

2) 设计简并引物，以 cDNA 为模板，PCR 后胶回收连接转化测

3'RACE

利用 mRNA 的 3'末端的 poly(A) 尾巴作为一个引物结合位点，以末端 poly(T)通用引物作为锁定引物反转录合成标准第一链 cDNA。然后用基因特异引物 GSP1(gene specific primer, GSP) 作为上游引物，用一个含有部分接头序列的通用引物作为下游引物，以 cDNA 第一链为模板，进行 PCR 循环，把目的基因 3'末端的 DNA 片段扩增出来。

1) 反转录 以 Adaptor 或者 B26 代替 OligodT(18)进行反转录得到 cDNA

2) 进行三轮 PCR

第一轮：模板 cDNA 引物：GSP1, Adaptor-R/B26-R

第二轮：模板 第一轮产物 引物：GSP2, Adaptor-R/B26-R

第三轮：模板 第二轮产物 引物：GSP3, Adaptor-R/B26-R

10× buffer	2.5 μl	94°C	3~5min	} 35 轮
dNTP mix (2.5mM)	2 μl	94°C	30s	
MgCl ₂ (25mM)	1.5	50~65°C	30s	
引物 1 (10pM)	1 μl	72°C	30s~2min	
引物 2 (10pM)	1 μl	72°C	10min	
Taq 酶	0.2 μl	4°C	∞	
模板	1 μl			
ddH ₂ O	16 μl			
总体积	25ul			

5'RACE

- 1) 反转录: 引物为设计的特异引物 SP1
- 2) PCR 产物回收
- 3) cDNA TdT 加尾

DEPC-ddH ₂ O	6.5ul	}	离心, 94°C 2~3min	→	冰浴 1min
5×Tail Buffer	5.0ul				
2mM dCTP	2.5ul				
纯化的 cDNA	10ul		稍离心置冰上		0.8~1ul TdT
			稍混匀		37°C 10~30min
			离心, 于冰上		65°C 10min

- 4) 第一轮巢式 PCR

10× buffer	2.5 μl
dNTP mix (10mM)	0.5 μl
MgCl ₂ (25mM)	1.5
GSP2(10pM)	1 μl
AAP	1 μl
Taq 酶	0.2 μl
dc-tailed cDNA	2.5 μl
ddH ₂ O	16 μl
总体积	25ul

94°C	1~2min	}	35 轮
94°C	0.5~1min		
50~65°C	0.5~1min		
72°C	1~2min		
72°C	10min		
4°C	∞		

- 5) 第二轮巢式 PCR

将第一轮产物稀释 100 倍

10× buffer	2.5 μl
dNTP mix (10mM)	0.5 μl
MgCL ₂ (25mM)	1.5ul
GSP3(10pM)	0.5 μl
AUAP	0.5 μl
Taq 酶	0.2 μl
稀释 PCR 产物	2.5 μl
ddH ₂ O	17 μl
总体积	25ul

高保真全长验证

所用反应组分置于冰上，DMSO 常温融化

RNA Free H ₂ O	12 ul	27ul
5× phusion HF 或 GC Buffer	4 ul	10ul
10mM dNTPs	0.4 ul	1ul
10uM 正向引物	1 ul	2.5ul
10uM 反向引物	1 ul	2.5ul
模板 (cDNA 或基因组 DNA)	1~2ul	5ul
DMSO(可选)	0.6 ul	1.5ul
Phusion DNA 聚合酶	0.2ul	0.5ul
总体积	20ul	50ul

离心混匀

98°C	30s	} 25~ 35 轮
98°C	5~10s	
45~72°C	10~30s	
72°C	15~30s/Kb	
72°C	5~10min	
4°C	∞	

跑胶回收

加 A 尾 PCR 回收产物加入下述混合液

10× buffer	2.5 μl
dNTP mix (2.5mM)	2.0 μl
MgCL ₂ (25mM)	1.5ul
rTaq	0.2ul

离心，72℃ 30min
产物回收

也可以先用 2~3ul 确定是否有目的条带，再产物回收，加 A 尾，胶回收