

BOOKS

实验目的

- 了解**PCR**和琼脂糖凝胶电泳实验原理、方法和试剂作用
- 熟悉**PCR**仪器的操作；熟悉琼脂糖凝胶制胶、上样
- 了解其它电泳方法

PCR技术的创建

Kary B. Mullis（穆利斯（美））



- **Khorana(1971)**等提出在体外经**DNA**变性,与适当引物杂交,再用**DNA**聚合酶延伸,扩增**DNA**的设想。
- **1983**年,**Mullis**发明了**PCR**技术,使**Khorana**的设想得到实现。
- **1988**年**Saiki**等将耐热**DNA**聚合酶（**Taq**）引入了**PCR**技术。
- **1989**年美国《**Science**》杂志列**PCR**为十余项重大科学发明之首,比喻**1989**年为**PCR**爆炸年,**Mullis**荣获**1993**年度诺贝尔化学奖。

实验原理

- PCR是聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）简称，指在引物指导下由酶催化的对特定模板的扩增反应，是模拟体内DNA复制过程，在体外特异性扩增DNA片段的技术。
- PCR技术实际上是在模板DNA、引物和4种脱氧核苷酸存在的条件下依赖于DNA聚合酶的酶促合成反应。
- PCR技术的特异性取决于引物和模板DNA结合的特异性。
- 利用PCR技术可在短时间内获得数百万个特异的DNA序列的拷贝。PCR技术在分子克隆、遗传病的基因诊断等方面得到广泛的应用。

DNA聚合酶的特性

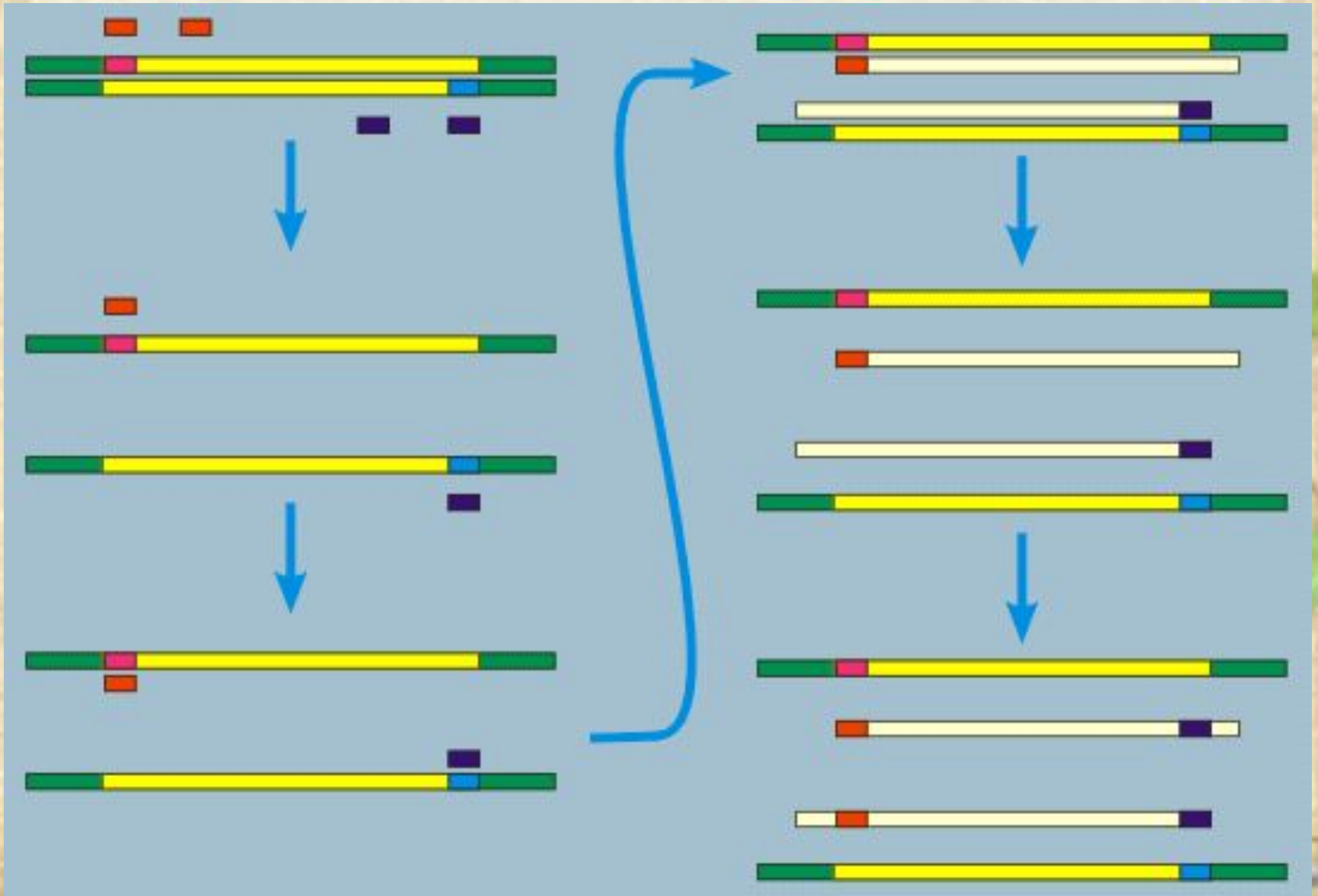
**DNA聚合酶不能从头开始合成DNA，而只能从3'端延伸DNA链。
因此，DNA复制需要引物。**

小资料：引物是一小段DNA或RNA，它能与DNA母链的一段碱基序列互补配对。用于PCR的引物长度通常为20~30个核苷酸。

反应分为三步：

- **1.变性：** 在高温条件下，**DNA**双链解离形成单链**DNA**；
- **2.退火：** 当温度突然降低时引物与其互补的模板在局部形成杂交链；
- **3.延伸：** 在**DNA**聚合酶、**dNTPs**和 Mg^{2+} 存在的条件下，聚合酶催化以引物为起始点的**DNA**链延伸反应。
- 以上三步为一个循环，每一循环的产物可以作为下一个循环的模板，几十个循环之后，介于两个引物之间的特异性**DNA**片段得到了大量复制，数量可达到~ **$10^6 \sim 10^7$** 个拷贝。

PCR: 变性—退火—延伸



- PCR技术的参数主要有6个:

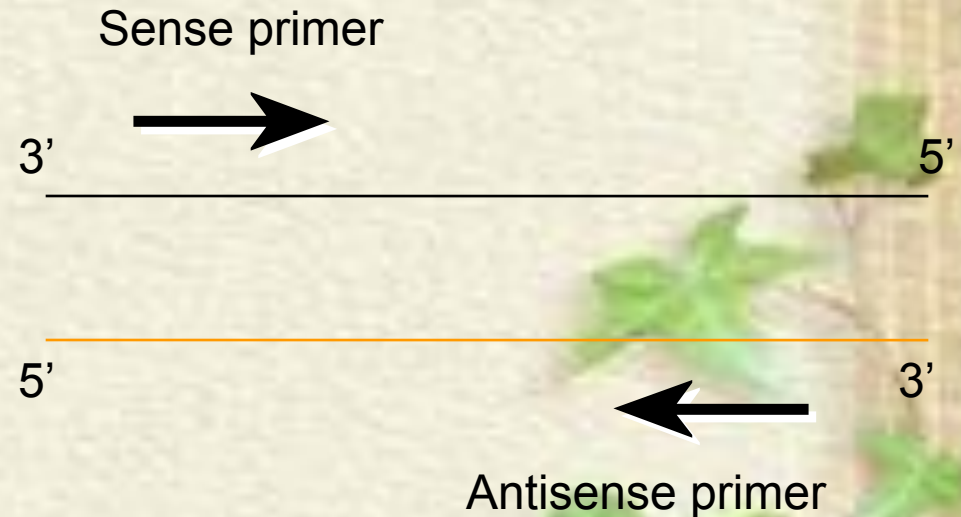
聚合酶、dNTPs、反应buffer、二价离子、引物、模板。

引物设计

- 引物
- 引物的重要性
- 引物设计的原则
- 引物与PCR
- 引物设计软件
- 引物同源性分析

引物 (primers)

- 引物是人工合成的两段寡核苷酸序列，一个引物与感兴趣区域一端的一条DNA模板链互补，另一个引物与感兴趣区域另一端的另一条DNA模板链互补。



引物的重要性

- 在整个PCR体系中,引物占有十分重要的地位。**PCR的特异性要求引物与靶DNA特异结合,不与其他非目的DNA结合,**PCR的灵敏性要求DNA聚合酶能对引物进行有效的延伸,可见引物设计好坏与PCR结果密切相关。

引物设计原则

- 引物长度
- 碱基分布的均衡性
- Tm值
- 引物二级结构
- 引物3'端
- 引物5'端
- 引物的内部稳定性
- 引物的保守性与特异性
- 扩增区域的二级结构



引物长度

- 一般为**15-30**个核苷酸，在做长片段**PCR**或做某些特殊的**PCR**时应使用较长的引物，但最多不超过**50**个核苷酸。

碱基分布的均衡性

- 同一碱基连续出现不应超过5个
- **GC含量一般40-60%**
 - **GC含量太低导致引物T_m值较低，使用较低的退火温度不利于提高PCR的特异性**
 - **GC含量太高也易于引发非特异扩增。**

引物T_m值

- 一般要求：55°C–65°C。
- 计算：
 - 对于低于20个碱基的引物，T_m值可根据 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 来粗略估算
 - 对于较长引物，T_m值则需要考虑热动力学参数，从“最近邻位”的计算方式得到，这也是现有的引物设计软件最常用的计算方式。
 - $T_m = \Delta H / (\Delta S + R * \ln (C/4)) + 16.6 \log ([K+] / (1 + 0.7 [K+])) - 273.15$

引物二级结构

- 引物二聚体

- 尽可能避免两个引物分子之间3'端有较多碱基互补

- 发夹结构

- 尤其是要避免引物3'端形成发夹结构，否则将严重影响DNA聚合酶的延伸。

引物3'端

- 引物的延伸从3'端开始，因此3'端的几个碱基与模板DNA均需严格配对，不能进行任何修饰，否则不能进行有效的延伸，甚至导致PCR扩增完全失败。

引物5'端

- 引物5'端可以有与模板DNA不配对碱基，在5'端引入一段非模板依赖性序列。
 - 5'端加上限制性核酸内切酶位点序列（酶切位点5'端加上适当数量的保护碱基）。
 - 5'端的某一位点修改某个碱基，人为地在产物中引入该位点的点突变以作研究。
 - 5'端标记放射性元素或非放射性物质（如生物素、地高辛等）。

引物设计软件

- Primer Premier 5.0
 - 生物软件网下载
 - 安装后，用文本编辑器打开WIN.INI，将
vspace=DU改为vspace=PU便可以使用全部功能。
- Oligo
- primer 3
- The Primer Generator
- NetPrimer

引物同源性分析

- 用Blastn软件进行同源性比较
 - 尽可能选择与非目的基因同源性小的序列作为引物
 - 选择3'端与非目的基因不同源的序列作为引物
 - 选择两个引物3'端与同一非目的基因不同源的序列作为引物

二、琼脂糖凝胶电泳

概念：以**琼脂糖凝胶**作支持体的电泳方式。

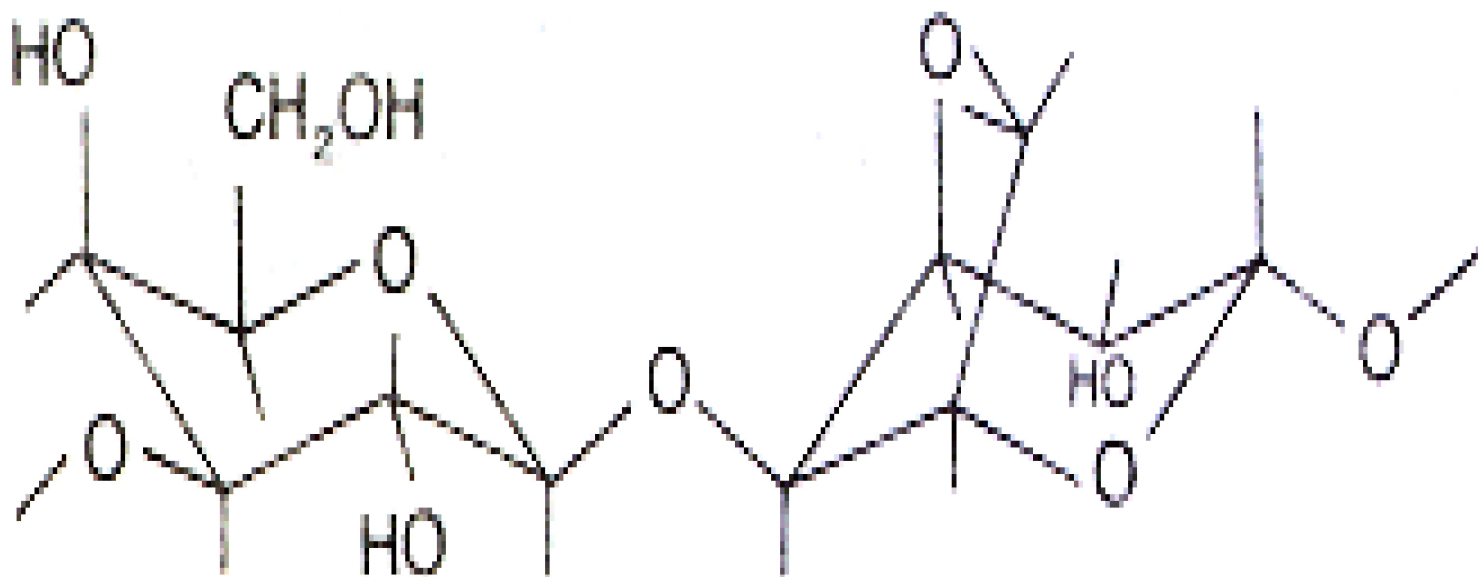
天然琼脂（agar）：又名琼胶、菜燕、冻粉，从石花菜及其它红藻类植物提取出来的一种**线状高聚物**。

琼脂糖（agarose）

琼脂胶（agarpectin）



天然琼脂 (agar) 是一种多聚糖，主要由**琼脂糖** (约占80%) 及**琼脂胶**组成。琼脂糖是由半乳糖及其衍生物构成的**中性物质**，不带电荷。而琼脂胶是一种含硫酸根和羧基的**强酸性多糖**，由于这些基团带有电荷，在电场作用下能产生较强的**电渗**现象，加之硫酸根可与某些蛋白质作用而影响电泳速度及分离效果。



D-半乳糖

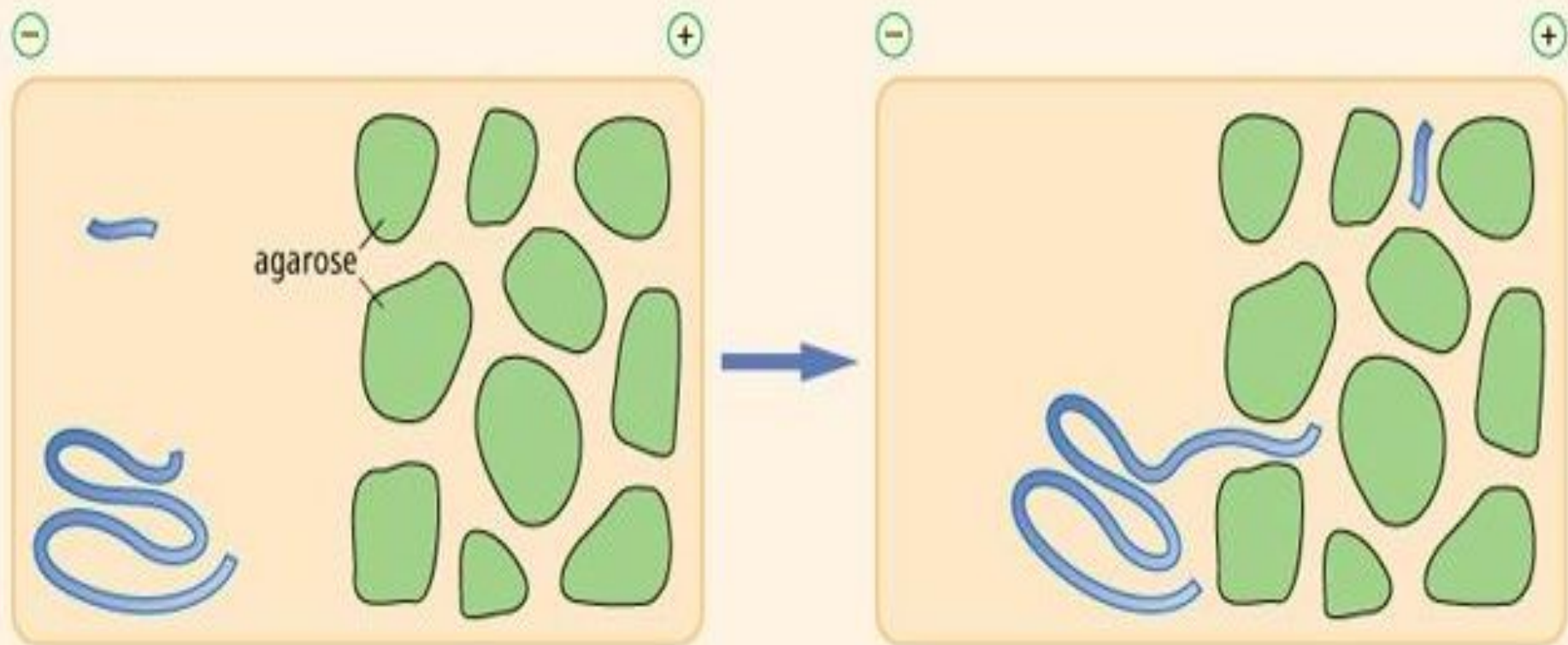
3, 6-脱水-L-半乳糖

琼脂糖链依分子内和分子间氢键及其它力的作用使其互相盘绕形成绳状琼脂糖束，构成大网孔型凝胶。

1. 核酸分子大小及琼脂糖的浓度的关系

(1) DNA分子的大小:

DNA分子在琼脂糖凝胶中泳动时有**电荷效应**和**分子筛效应**。DNA分子在高于等电点的pH溶液中带负电荷，在电场中向正极移动。由于**糖-磷酸骨架**在结构上的重复性质，相同数量的双链DNA几乎具有等量净电荷，因此在一定的电场强度下，DNA分子的迁移速度取决于分子筛效应，即DNA分子本身的大小和构型。



在凝胶中，DNA片段迁移距离(迁移率)与碱基对的对数成反比，因此通过已知大小的标准物移动的距离与未知片段的移动距离进行比较，便可测出未知片段的大小。

但是当DNA分子大小超过20kb时，普通琼脂糖凝胶就很难将它们分开。此时电泳的迁移率不再依赖于分子大小，因此，应用琼脂糖凝胶电泳分离DNA时，分子大小不宜超过此值。

(2) 琼脂糖的浓度:

不同大小的DNA需要用不同浓度的琼脂糖凝胶进行电泳分离,如下表所示:

凝胶浓度 (%)	线性 DNA 长度 (bp)
0.5	1000~30000
0.7	800~12000
1.0	500~10000
1.2	400~7000
1.5	200~3000
2.0	50~2000

2. 核酸构型与琼脂糖凝胶电泳分离的关系

不同构型DNA的移动速度次序为：共价闭环

DNA (covalently closed circular, 简称cccDNA)

> 直线DNA > 开环的双链环状DNA。当琼脂糖浓度太高时，环状DNA (一般为球形) 不能进入胶中，相对迁移率为0 ($R_m=0$)，而同等大小的直线双链DNA (刚性棒状) 则可以 长轴方向前进 ($R_m>0$)，由此可见，这3种构型的相对迁移率主要取决于凝胶浓度，但同时，也受到电流强度、缓冲液离子强度等的影响。

(一) 选择电泳方法

一般的核酸检测只需要琼脂糖凝胶电泳就可以；如果需要分辨率高的电泳，特别是只有几个bp的差别应该选择聚丙烯酰胺凝胶电泳；用普通电泳不合适的巨大DNA链应该使用脉冲凝胶电泳。注意巨大的DNA链用普通电泳可能跑不出胶孔导致缺带。

(二) 正确选择凝胶浓度

对于琼脂糖凝胶电泳，浓度通常在0.5~2%之间，低浓度的用来进行大片段核酸的电泳，高浓度的用来进行小片段分析。低浓度胶易碎，小心操作和使用质量好的琼脂糖是解决办法。注意高浓度的胶可能使分子大小相近的DNA带不易分辨，造成条带缺失现象。

(三) 适合的电泳缓冲液

常用的缓冲液有TAE和TBE，而TBE比TAE有着更好的缓冲能力。

(二) 材料

- 模板DNA
- 引物: (载体: pGEX-6P-1)

PrimerGST6p1-cyc-Up:

- 5' CGGGATCCATGGATGAACCCCCCCCAGAGCC -3'
BamH1

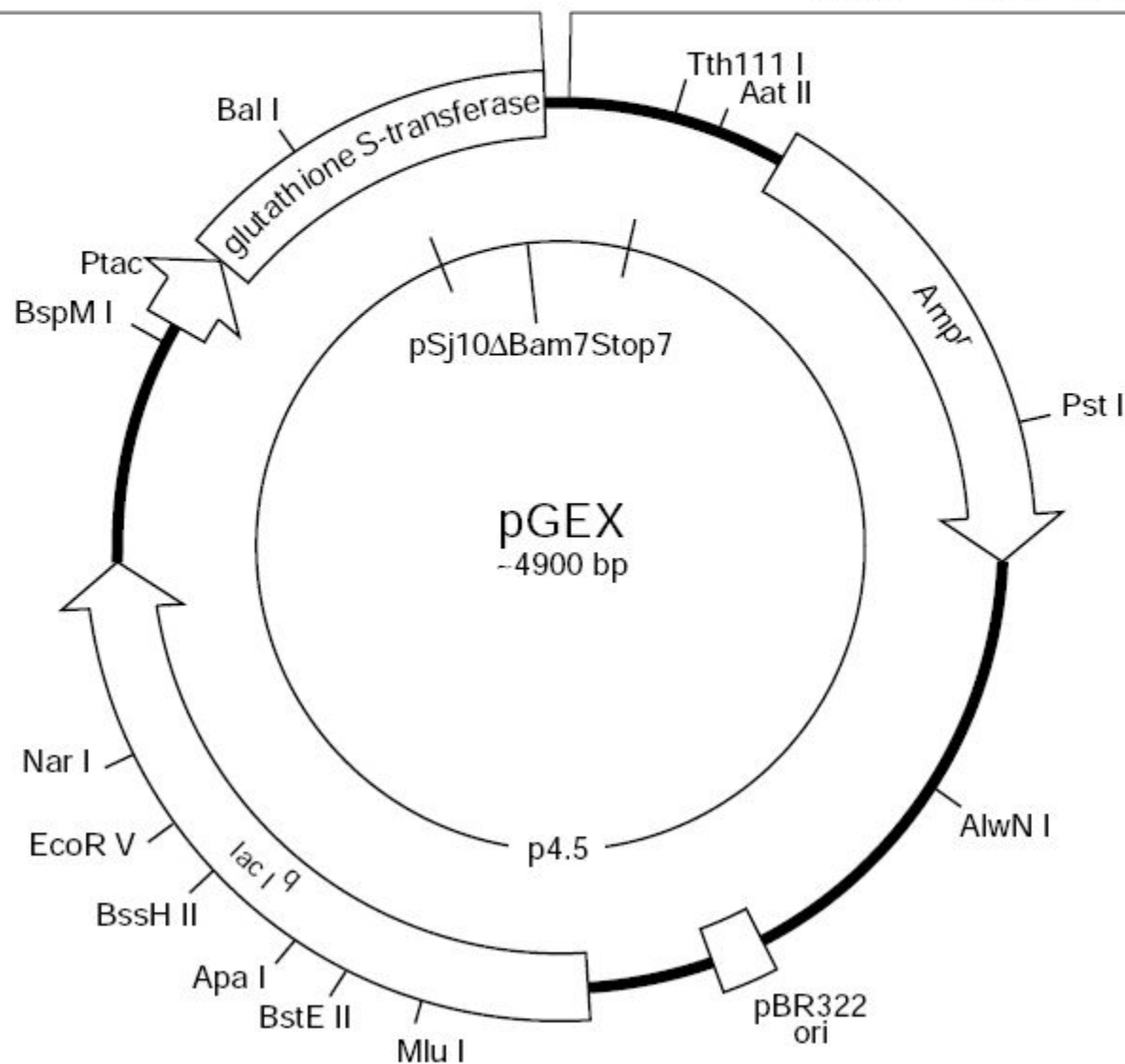
PrimerGST6p1-cyc-down:

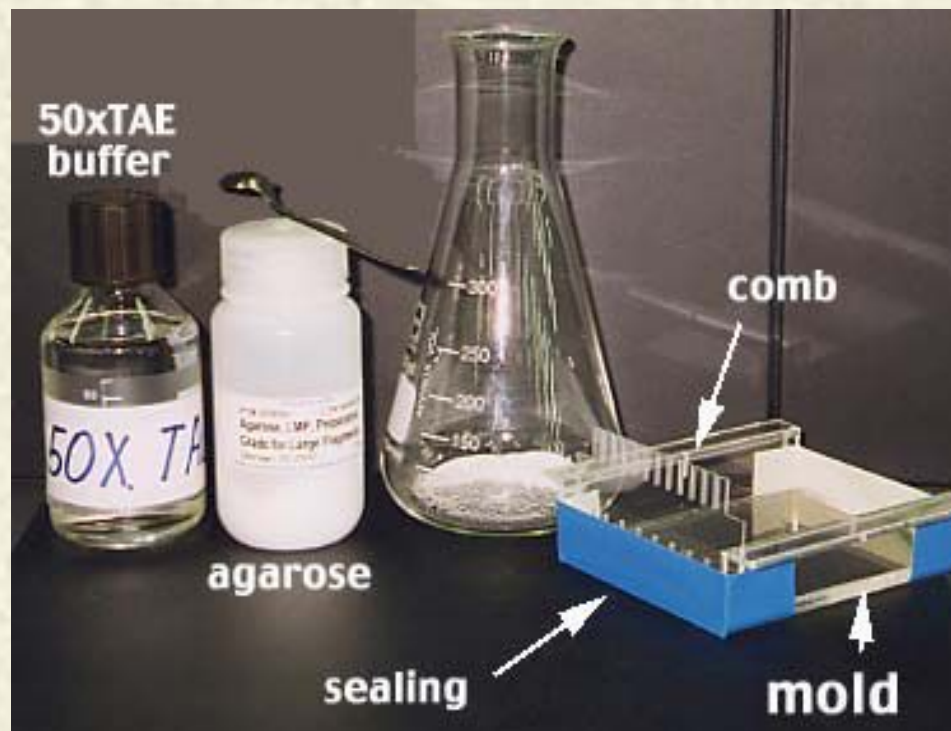
- 5' CCCTCGAGTCA CTG GGT GTT GAG CTT CT-3'
Xho1

pGEX-6P-1 (27-4597-01)

PreScission™ Protease

Leu	Glu	Val	Leu	Phe	Gln	Gly	Pro	Leu	Gly	Ser	Pro	Glu	Phe	Pro	Gly	Arg	Leu	Glu	Arg	Pro	His
CTG	GAA	GTT	CTG	TTC	CAG	GGG	CCC	CTG	GGA	TCC	CCG	GAA	TTC	CCG	GGT	CGA	CTC	GAG	CGG	CCG	CAT
								BamH I		EcoR I		Sma I		Sal I		Xho I		Not I			





(三) 试剂

PCR

- 10x PCR buffer
 - dNTPs 2.5mM
 - Taq 酶 5u/ μ l
 - 引物1和2(2 μ mol/L) —上、下游引物
 - 模板
- 2xPCR mix

琼脂糖凝胶电泳

- 5x TBE (Tris 54g, 硼酸 27.5g, 0.5mol/L EDTA 溶液 (PH=8.0) 20ml, 定容1L。
- 琼脂糖
- 核酸染料
- Loading Buffer

注意!

溴化乙锭 (**EB**) 为强致癌剂，操作时应戴手套，尽量减少台面污染。

目前实验室一般用相对安全的**GoldenView**等核酸荧光染料代替。

上样缓冲液

电泳指示剂溴酚兰在碱性液体中呈紫兰色，一般与蔗糖、甘油或聚蔗糖400组成上样缓冲液。

作用：

- ①增加样品比重，以确保DNA均匀沉入加样孔内。
- ②形成肉眼可见的指示带，预测核酸电泳的速度和位置。
- ③使样品呈色，使加样操作更方便。

实验步骤

1. 在200ul Eppendorf 管内配制25 μ l反应体系

2xPCR mix: 12.5ul

上游引物 (20uM): 0.5ul

下游引物 (20uM): 0.5ul

模板: 1ul

无菌水: 9.5ul

混匀，稍甩一下使溶液沉于管底。

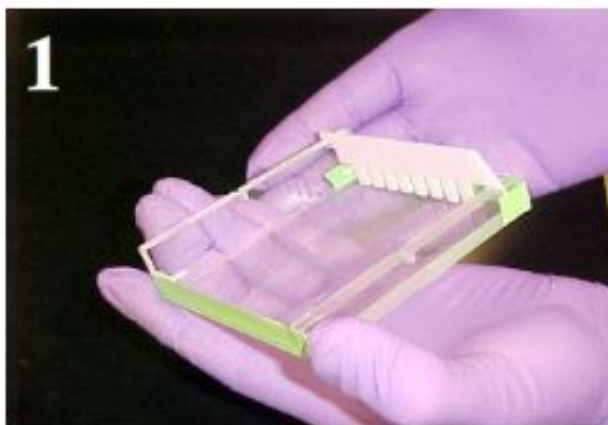
2. 按下述循环程序进行扩增

- 94℃ 5分钟，1个循环；
- 94℃ 30秒，52℃ 30秒，72℃ 30秒，30个循环；
- 72℃ 延伸10 分钟。
- 4℃ 保温。

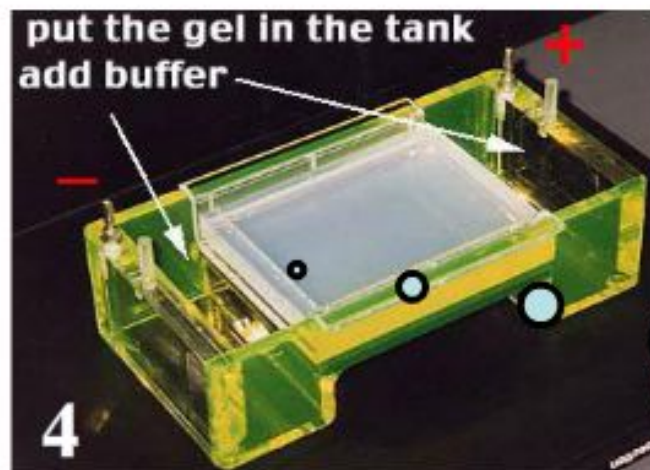
PCR产物加入loading buffer混合指示剂（含溴酚蓝）后，以琼脂糖凝胶为支持介质，在电泳缓冲液中电泳，根据**DNA片段大小、构型**分离成不同的条带，在紫外灯下观察，观察时间不可过长，或者容易导致碱基突变。

实验步骤-琼脂糖凝胶电泳

- 1、洗净电泳槽、制胶槽、梳子、挡板，晾干
- 2、插好挡板、梳子。
- 3、称取0.5g琼脂糖，放入三角瓶中，加入50ul的0.5xTBE电泳液，混匀。
- 4、加热煮沸至琼脂糖完全溶
- 5、待胶冷却至60℃不烫手时，加入核酸染料，轻轻摇匀，导入制胶槽，检查是否有气泡。
- 6、室温下约30min后，琼脂糖凝胶完全凝固，小心垂直拔出梳子和挡板，清除碎胶，将凝胶放入电泳槽中，加入0.5xTBE电泳缓冲液至胶槽中，液面高于胶面1mm。
- 7、DNA样品中加入Loading buffer，混匀，稍甩一下，使溶液处于管底。
- 8、用移液器将溶液转移至胶孔中，小心不要碰坏上样孔，不要插入上样孔的底部。
- 9、120V电泳 30-40min。
- 10、取下胶紫外灯下观察。



待温度为50 °C左右，不烫手时，加入核酸染料



点样孔
朝负极

制样

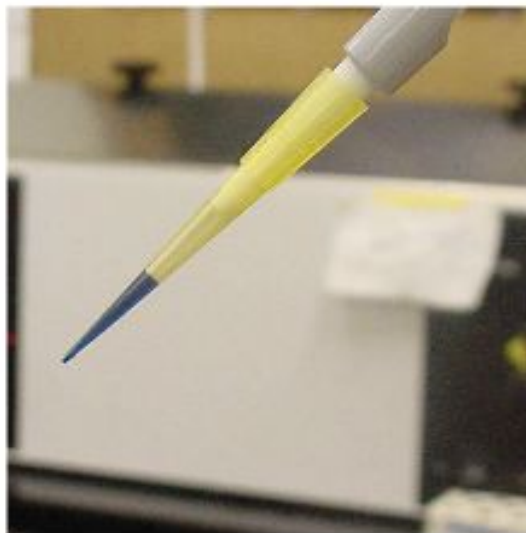


制胶

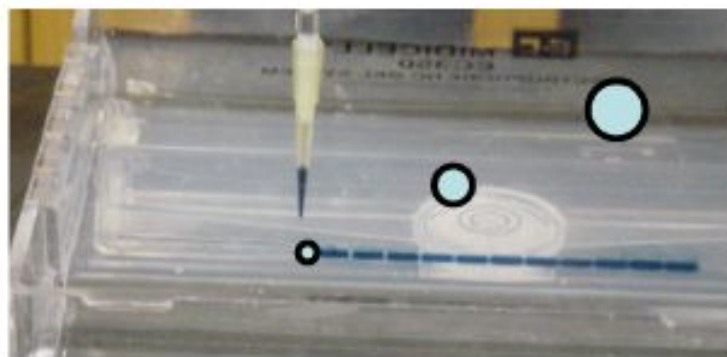
倒上缓冲液，使其没过点样孔。



点样



样品 ($5\mu\text{L}$)



小心!!!
点样孔不要戳破

制样



80—100V, 15min, 负极向正极。结束后, 取出琼脂糖凝胶, 置于紫外观察箱中观察。

思考题

- 1、如果经PCR反应后未获得目的长度片断或者特异性不强，从那几个方面调整PCR程序以获得特异性强的目的片断？
2. 下图是某PCR反应后的琼脂糖凝胶电泳，最左侧为Maker2000，右侧为PCR产物，其中1为非特异性条带，2为目的条带。请问①2号目的条带的大小大概为多少②1号非特异性条带及拖尾现象产生的原因可能有哪些？③请阐述核酸染料EB与DNA结合的原理。

