



实验二 **GSTZ**基因的**PCR**扩增

Amplifying GSTZ gene by Polymerase Chain Reaction

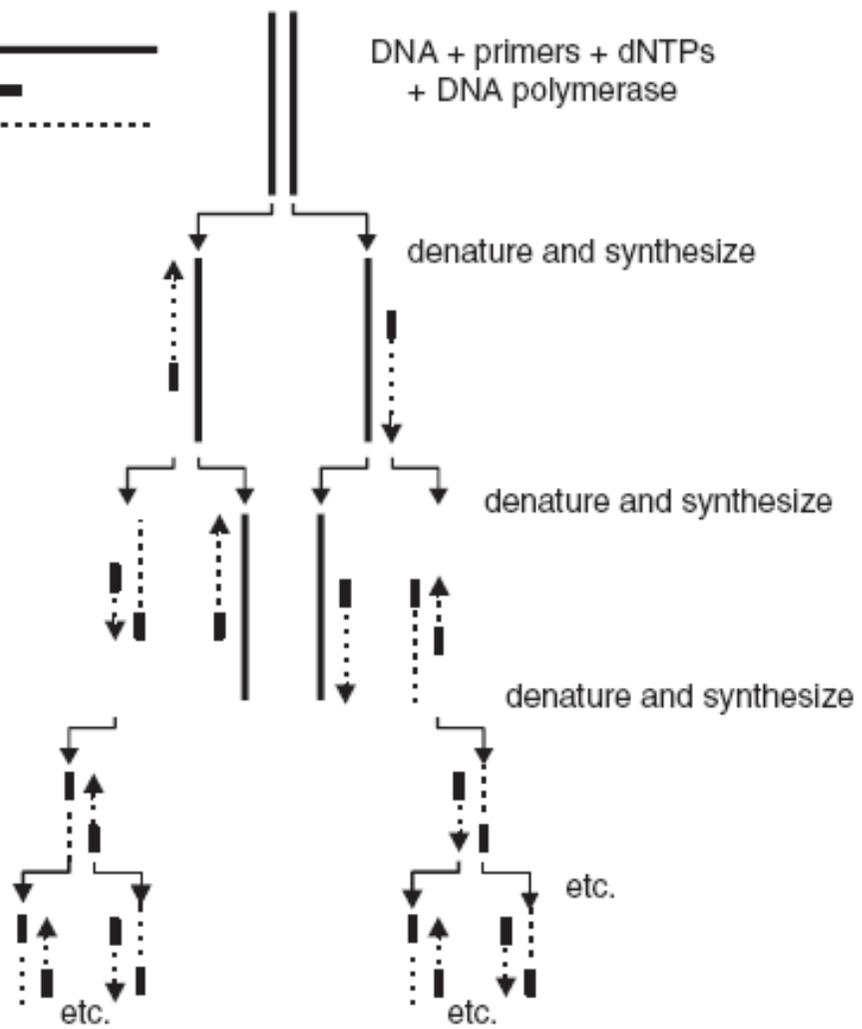


核酸的体外扩增

- ❖ 真核细胞内DNA的复制
- ❖ 聚合酶链反应（ Polymerase Chain Reaction, PCR）

original DNA ———
PCR primer ———
new DNA ·····

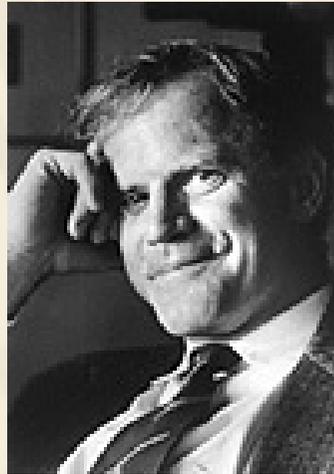
DNA + primers + dNTPs
+ DNA polymerase



The Nobel Prize in Chemistry 1993

"for contributions to the developments of methods within DNA-based chemistry"

"for his invention of the polymerase chain reaction (PCR) method"



Kary B. Mullis
La Jolla, CA, USA
B:1944

一、PCR的基本原理:

一种模拟天然DNA复制的体外扩增法



Pcr.exe

PCR反应三部曲:

变性(denature): 加热使双链DNA解开螺旋



退火(annealing) 在退火温度条件下引物同模板杂交



延伸(extend) 在Taq DNA聚合酶, dNTPs, Mg²⁺和合适pH缓冲液存在条件下延伸引物

PCR反应体系



- **DNA模板 template**
- **引物 primers**
- **dNTPs**
- **耐热聚合酶 Taq DNA polymerase**
- **反应缓冲液 reaction buffer**
- **MgCl₂**

试剂	原液浓度	工作浓度	50 μ L体系
PCR缓冲液	10 \times	1 \times	5 μ L
上游引物	10 μ mol/L	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
下游引物	10 μ mol/L	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
dNTPs	2.5mmol/L	200 μ mol/L	4 μ L
MgCl ₂	25mmol/L	1.5mmol/L	3 μ L
DNA模板			0.1~10ng
ddH ₂ O			补足47.5 μ L
Taq酶	1U/ μ L	2.5U/50 μ L体系	2.5 μ L

PCR PARAMETER

❖ Pre-denature: 94 °C 5min

❖ PCR Cycles:

∞ Denature 94 °C 40sec

∞ Annealing 58 °C 35sec

∞ Extend 72 °C 1min30sec

❖ Totally 35~40 cycles

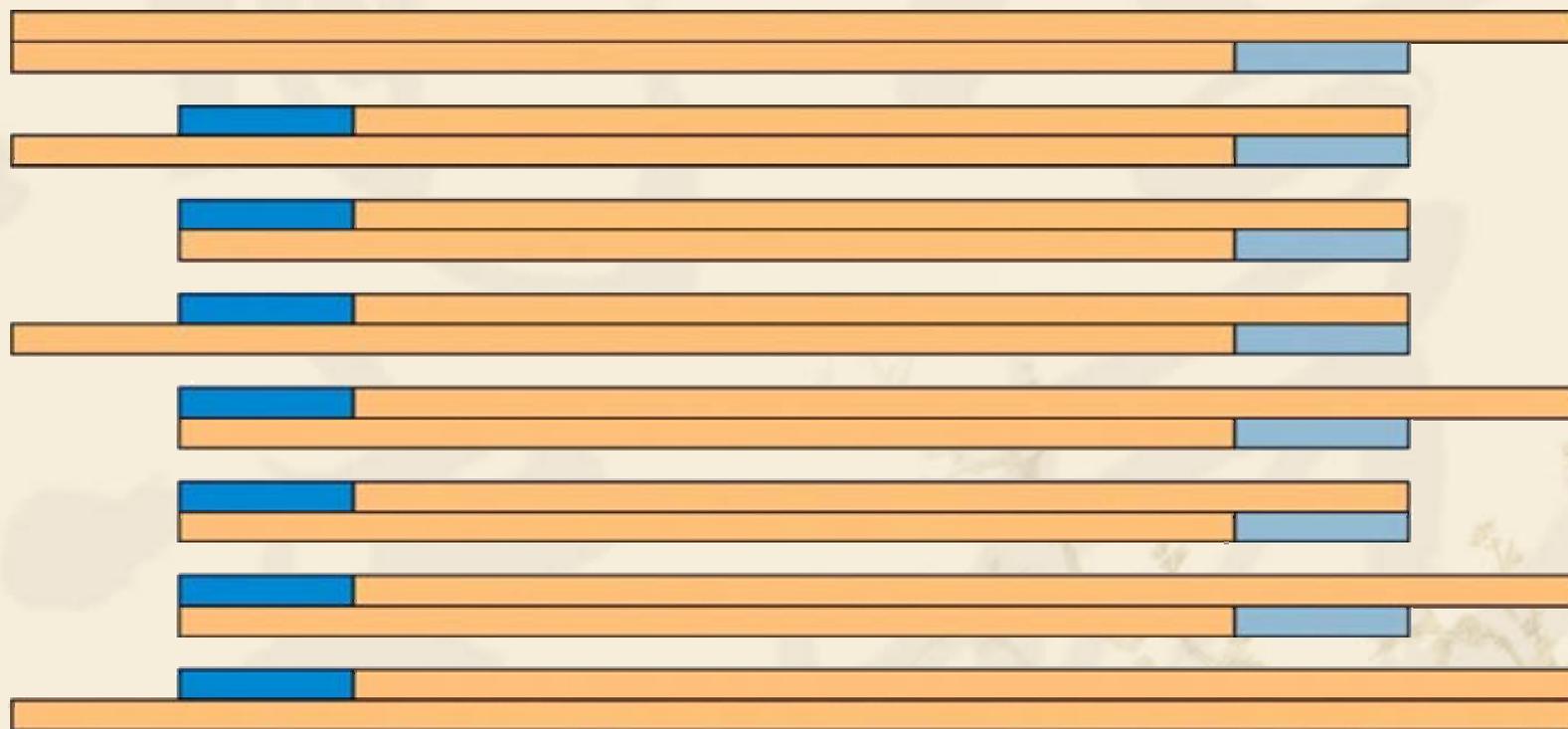
❖ Post-extend: 72 °C 7min

PCR反应体系



- **DNA模板 template**
- **引物 primers**
- **dNTPs**
- **耐热聚合酶 Taq DNA polymerase**
- **反应缓冲液 reaction buffer**
- **MgCl₂**

引物-人工合成的寡核苷酸

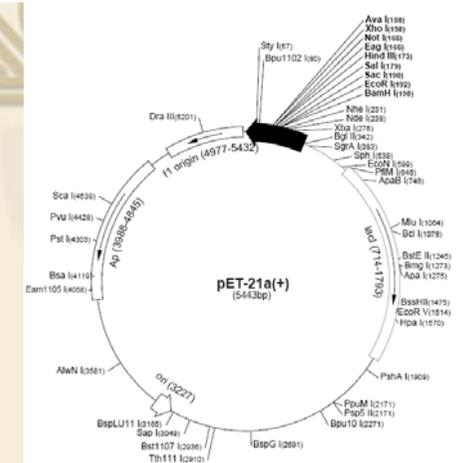


❖ 一般 PCR 反应中引物的终浓度为 0.1-1 $\mu\text{mol/L}$ ，在此范围内产物量基本相同。引物浓度低于 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 时，产物量降低；引物浓度过高会引导非特异产物扩增，还会增加引物二聚体的形成。

引物设计原则：软件+经验

- ❖ 引物长度以**15-30**个碱基为宜；
- ❖ 引物碱基尽可能随机分布，**G+C**含量宜在**45~55%**左右；
- ❖ 引物内部、引物之间不应形成二级结构；
- ❖ 避免重复多聚碱基；
- ❖ 引物与核酸序列数据库的其他序列无明显同源性；
- ❖ 两个引物的**T_m**值要尽可能接近；

重组时引物设计的其它几个问题:



1. 移码突变
2. 酶切位点
3. 保护碱基

引物A **ATTGGATCCATGGCGAATTCCGGCGAAGA (BamH I)**
 引物B **ACCAAGCTTGATGGTGGGAAGAAGGAGC (Hind III)**

	<u>Nde I</u>	<u>Nhe I</u>	T7*Tag	pET-21a	<u>BamH I</u>	<u>EcoR I</u>	<u>Sac I</u>	<u>Sal I</u>	<u>Hind III</u>	<u>Eag I</u>	<u>Not I</u>	<u>Ava I</u>	<u>Xho I</u>	His*Tag
	TATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTCGGCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCGCACTCGAGCACCACCACCACCACC													
	MetAlaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgThrArgAlaProProProProPr													
pET-21d	pET-21b ... GGTCCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCGCACTCGAGCACCACCACCACCACC/													
<u>Nco I</u>	... GlyArgAspProAsnSerSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHis													
...TACCATGGCTAGC...	pET-21c,d ... GGTCCGGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGCGGCGCACTCGAGCACCACCACCACCACC													
MetAlaSer...	... GlyArgIleArgIleArgAlaProSerThrSerLeuArgProHisSerSerThrThrThrThrThrTh													

Nde I Nhe I T7*Tag pET-21a Bam H I Eco R I Sac I Sa I Hind III Eag I Not I Ava I Xho I His*Tag

TATACATATGGCTAGCATGACTGGTGGACAGCAAATGGGTGCGCGATCCGAATTCGAGCTCCGTCGACAAGCTTGGGGCCGCACCTCGAGCACCACCACCACCACCAC
 MetaIaSerMetThrGlyGlyGlnGlnMetGlyArgGlySerGluPheGluLeuArgArgGlnAlaCysGlyArgIhrArgAlaProProProProProL

Gene Runner - [d:\generunr\work\nuc1.seq *]

File Edit View Analysis Tables Graph Options Window Help

5'	4	7	10	13	16	19	22	25	28	31	34	37	40	43	46	49	52	55	58	61	64	67	70	
+1	I	G	S	M	A	N	S	G	E	E	K	L	K	L	Y	S	Y	W	R	S	S	C	A	H
1	ATT	GGA	TCC	ATG	GGG	AAT	TCC	GGC	GAA	GAG	AAG	TTG	AAG	CTC	TAC	TCT	TAC	TGG	AGA	AGC	TCG	TGT	GCT	CAT
	TAA	CCT	AGG	TAC	CGC	TTA	AGG	CCG	GTT	CTC	TTC	AAC	TTC	GAG	ATG	AGA	ATG	ACC	TCT	TCG	AGC	ACA	CGA	GTA
+1	R	U	R	I	A	L	A	L	K	G	L	D	Y	E	Y	I	P	U	N	L	L	K	G	D
73	CGT	GTC	CGT	ATC	GGC	CTC	GCT	TTG	AAA	GGG	CTT	GAT	TAT	GAG	TAT	ATA	CCA	GTG	AAT	TTG	CTC	AAG	GGT	GAT
	GCA	CAG	GCA	TAG	CGG	GAG	CGA	AAC	TTT	CCC	GAA	CTA	ATA	CTC	ATA	TAT	GGT	CAC	TTA	AAC	GAG	TTT	CCA	CTA
+1	Q	F	D	S	D	F	K	K	I	N	P	M	G	T	U	P	A	L	U	D	G	D	U	U
145	CAA	TTC	GAT	TCA	GAT	TTC	AAG	AAG	ATC	AAT	CCA	ATG	GGA	ACT	GTA	CCA	GCT	CTG	GTG	GAT	GGG	GAT	GTT	GTG
	GTT	AAG	CTA	AGT	CTA	AAG	TTT	TTT	TAG	TTA	GGT	TAC	CCT	TGA	CAT	GGT	CGA	GAC	CAC	CTA	CCT	CTA	CAA	CAC
+1	I	N	D	S	F	A	I	I	M	Y	L	D	E	K	Y	P	E	P	P	L	L	P	R	D
217	ATT	AAT	GAT	TCT	TTT	GCG	ATA	ATA	ATG	TAT	CTG	GAT	GAG	AAG	TAC	CCT	GAG	CCA	CCT	TTG	TTA	CCT	CGT	GAC
	TAA	TTA	CTA	AGA	AAA	CGC	TAT	TAT	TAC	ATA	GAC	CTA	CTC	TTT	ATG	GGA	CTC	GGT	GGA	AAC	AAT	GGA	GCA	CTG
+1	L	H	K	R	A	U	N	Y	Q	A	M	S	I	U	L	S	G	I	Q	P	H	Q	N	L
289	CTC	CAT	AAA	CGA	GCT	GTG	AAT	TAC	CAG	GCA	ATG	AGT	ATT	GTC	TTG	TCT	GGC	ATA	CAG	CCT	CAT	CAA	AAT	CTG
	GAG	GTA	TTT	GCT	CGA	CAC	TTA	ATG	GTC	CGT	TAC	TCA	TAA	CAG	AAC	AGA	CCG	TAT	GTC	GGA	GTA	GTT	TTA	GAC
+1	A	U	I	R	Y	I	E	E	K	I	N	U	E	E	K	T	A	W	U	N	N	A	I	T
361	GCT	GTT	ATT	AGG	TAT	ATC	GAG	GAA	AAG	ATA	AAT	GTG	GAG	GAG	AAG	ACT	GCC	TGG	GTT	AAT	AAT	GCT	ATC	ACA
	CGA	CAA	TAA	TCC	ATA	TAG	CTC	CTT	TTT	TAT	TTA	CAC	CTC	CTC	TTT	TGA	CCG	ACC	CAA	TTA	TTA	CGA	TAG	TGT
+1	K	G	F	T	A	L	E	K	L	L	U	N	C	A	G	K	H	A	T	G	D	E	I	Y
433	AAA	GGA	TTT	ACA	GCT	CTC	GAG	AAA	CTG	TTG	GTG	AAT	TGC	GCT	GGG	AAA	CAT	GCG	ACT	GGT	GAT	GAA	ATT	TAC
	TTT	CCT	AAA	TGT	CGA	GAG	CTC	TTT	GAC	AAC	CAC	TTA	ACG	CGA	CCC	TTT	GTA	CGC	TGA	CCA	CTA	CTT	TAA	ATG
+1	L	A	D	L	F	L	A	P	Q	I	H	G	A	I	N	R	F	Q	I	N	M	E	P	Y
505	CTG	GCT	GAT	CTC	TTT	CTA	GCA	CCA	CAG	ATC	CAC	GGA	GCA	ATC	AAC	AGA	TTC	CAG	ATT	AAC	ATG	GAA	CCG	TAC
	GAC	CGA	CTA	GAG	AAA	GAT	CGT	GGT	GTC	TAG	GTG	CCT	CGT	TAG	TTG	TCT	AAG	GTC	TAA	TTG	TAC	CTT	GGC	ATG
+1	P	T	L	A	K	C	Y	E	S	Y	N	E	L	P	A	F	Q	N	A	L	P	E	K	Q
577	CCA	ACT	CTT	GCA	AAA	TGT	TAC	GAA	TCA	TAC	AAC	GAA	CTG	CCT	GCG	TTT	CAA	AAT	GCA	CTA	CCG	GAA	AAG	CAG
	GGT	TGA	GAA	CGT	TTT	ACA	ATG	CTT	AGT	ATG	TTG	CTT	GAC	GGA	CCG	AAA	GTT	TTA	CGT	GAT	GGC	CTT	TTC	GTC
+1	P	D	A	P	S	S	T	I	K	L	G													
649	CCA	GAT	GCT	CCT	TCT	TCC	ACC	ATC	AAG	CTT	GGT													
	GGT	CTA	CGA	GGA	AGA	AGG	TGG	TAG	TTC	GAA	CCA													

1 681 DNA LIN DS NO_LOCUS Lok

PCR反应体系



- DNA模板 template
- 引物 primers
- dNTPs
- 耐热聚合酶 Taq DNA polymerase
- 反应缓冲液 reaction buffer
- MgCl₂

三磷酸脱氧核苷（dNTPs）

❖ 四种三磷酸脱氧核苷（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）是DNA合成的基本原料，工作浓度应为20~200 μ mmol/L。所用的四种dNTP的浓度应相等，以使错误掺入率降至最低。dNTPs浓度过低则反应速度下降，dNTPs浓度过高则扩增特异性降低，而且当dNTP浓度高于50mM时也会抑制Taq DNA聚合酶的活性。

PCR反应体系



- DNA模板 template
- 引物 primers
- dNTPs
- 耐热聚合酶 Taq DNA polymerase
- 反应缓冲液 reaction buffer
- MgCl₂

耐热DNA聚合酶

❖ Taq聚合酶是从耐热菌（*thermus aquatious*）中提取出来的耐热酶，95℃仍有活性。该酶的应用浓度一般为1~2.5U/50μL反应体系，然而，酶的用量可依据不同的模板分子或引物而变化。酶浓度过高时，会出现非特异性扩增；过低时扩增产物量很

反应缓冲液

- ❖ Tris-HCl
- ❖ KCl
- ❖ 酶的稳定剂

A typical reaction buffer for PCR would something like:

10mM Tris, pH 8.3

50mM KCl

0.01% gelatin

PCR反应体系



- **DNA模板 template**
- **引物 primers**
- **dNTPs**
- **耐热聚合酶 Taq DNA polymerase**
- **反应缓冲液 reaction buffer**
- **MgCl₂**

Mg²⁺

❖ Mg²⁺ 是Taq DNA聚合酶活性所必需的。

Mg²⁺浓度直接影响着酶的活性与忠实性、产物的特异性以及引物二聚体的形成等

等 The MgCl₂ concentration in the final reaction mixture is usually between 0.5 to 5.0mM,

Generally,
low Mg²⁺ leads to low yields (or no yield)
high Mg²⁺ leads to accumulation
of nonspecific products (mispriming).

试剂	原液浓度	工作浓度	50 μ L体系
PCR缓冲液	10 \times	1 \times	5 μ L
上游引物	10 μ mol/L	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
下游引物	10 μ mol/L	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
dNTPs	2.5mmol/L	200 μ mol/L	4 μ L
MgCl ₂	25mmol/L	1.5mmol/L	3 μ L
DNA模板			0.1~10ng
ddH ₂ O			补足47.5 μ L
Taq酶	1U/ μ L	2.5U/50 μ L体系	2.5 μ L

2010.3.26日PCR试剂盒:

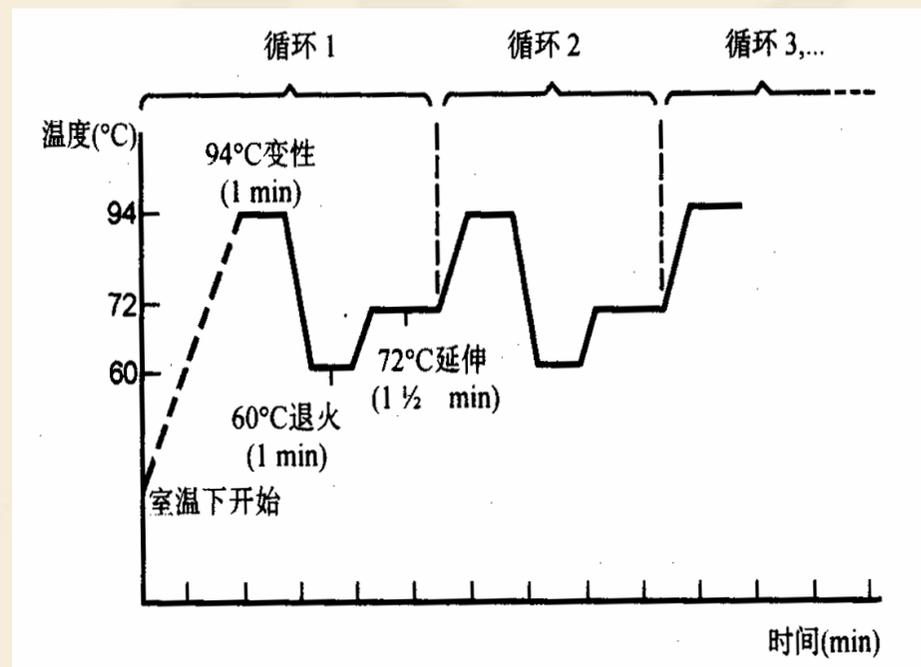
试剂	原液浓度	工作浓度	50 μ l体系
PCR试剂	2 \times	1 \times	25 μ L
含 (Taq酶	0.1U/ μ L	2.5U/50 μ L体系	2.5U)
上游引物	10 μ mol/L	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
下游引物	10 μ mol/L	0.5 μ mol/L	2.5 μ L
DNA模板			0.1~10ng
ddH ₂ O			补足? μ L

2010.3

试剂	原液浓度	工作浓度	50 μ l体系
PCR缓冲液	2 \times	1 \times	25 μ L
上游引物	100 μ mol/L	10 μ mol/L	2.5 μ L
下游引物	100 μ mol/L	10 μ mol/L	2.5 μ L
DNA模板			0.1~10ng
ddH ₂ O			补足47.5 μ L
Taq酶	0.1U/ μ L	2.5U/50 μ L体系	
	2.5 μ L		

循环参数

- ❖ 变性温度和时间
- ❖ 复性温度和时间
- ❖ 延伸温度和时间
- ❖ 循环数



变性温度与时间

变性温度低，解链不完全是导致PCR失败的最主要原因。一般情况下， $93^{\circ}\text{C} \sim 94^{\circ}\text{C}$ 1min 足以使模板DNA变性，若低于 93°C 则需延长长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或PCR产物完全变性，就会导致PCR失败。

退火 (复性)温度与时间

- ❖ 退火温度与时间，取决于引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：

$$T_m \text{值(解链温度)} = 4(G+C) + 2(A+T)$$

$$\text{复性温度} = T_m \text{值} - (2 \sim 10^\circ\text{C})$$

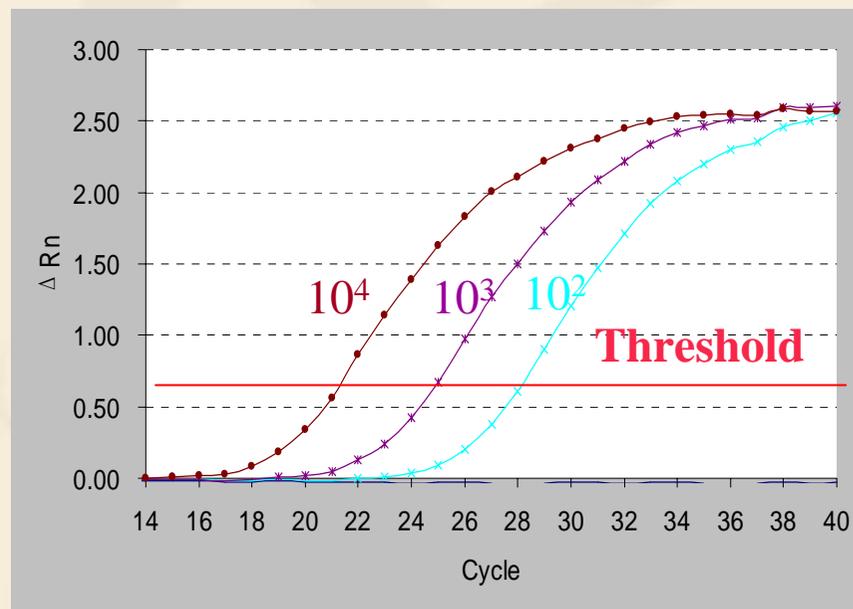
- ❖ 在 T_m 值允许范围内，选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合，提高PCR反应的特异性。
- ❖ 复性时间一般为30~60sec，足以使引物与模板之间完全结合。

延伸温度与时间

- ❖ Taq DNA聚合酶的生物学活性：
 - ❧ 70~80℃ 150核苷酸/S/酶分子
 - ❧ 70℃ 60核苷酸/S/酶分子
 - ❧ 55℃ 24核苷酸/S/酶分子
- ❖ PCR反应的延伸温度一般选择在70~75℃之间，常用温度为72℃，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。
- ❖ PCR延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般1Kb以内的DNA片段，延伸时间1min是足够的。3~4kb的靶序列需3~4min；扩增10Kb需延伸至15min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。

循环次数

循环次数决定PCR扩增程度。
PCR循环次数主要取决于模板DNA的浓度。一般的循环次数选在30~40次之间，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。



PCR PARAMETER

❖ Pre-denature: 94 °C 3min

❖ PCR Cycles:

⌘ Denature 94 °C 30sec~1min

⌘ Annealing $T_m - (2 \sim 10^\circ\text{C})$ 30sec~1min

⌘ Extension 72 °C based on the length of amplicon

❖ Totally 30-40 cycles

❖ Post-extension: 72 °C 7min

PCR常见问题

- 无扩增产物
- 非特异性扩增
- 拖尾
- 假阳性

PCR常见问题之一

● 无扩增产物

➤现象：正对照有条带，而样品则无；

原因

1. 模板：含有抑制物，含量低
2. Buffer对样品不合适
3. 引物设计不当或者发生降解
4. 反应条件：退火温度太高，延伸时间太短

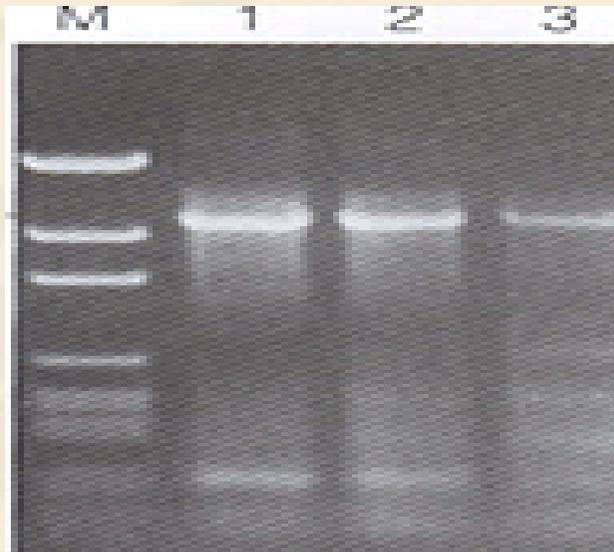
对策

1. 纯化模板或者使用试剂盒提取模板DNA或加大模板的用量
2. 更换Buffer或调整浓度
3. 重新设计引物（避免链间二聚体和链内二级结构）或者换一管新引物
4. 降低退火温度、延长延伸时间

PCR常见问题之二

- 非特异性扩增

➤ **现象：** PCR扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。



PCR常见问题之二

● 非特异性扩增

原因

1. 引物特异性差
2. 模板或引物浓度过高
3. 酶量过多
4. Mg^{2+} 浓度偏高
5. 退火温度偏低
6. 循环次数过多

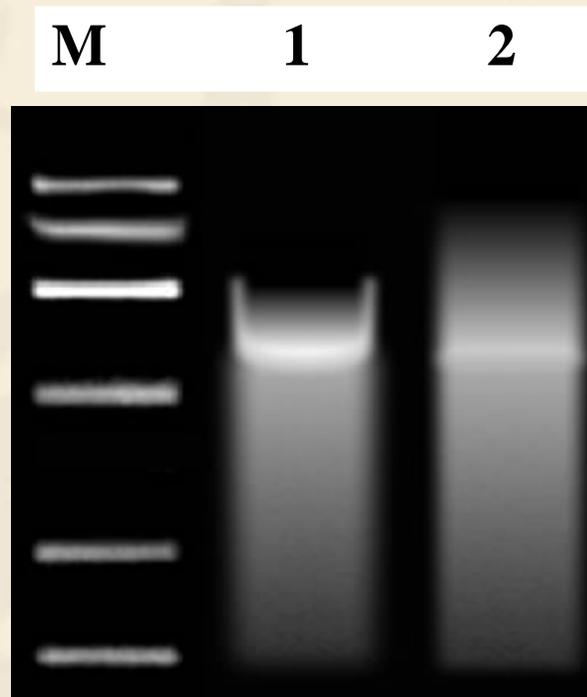
对策

1. 重新设计引物或者使用巢式PCR
2. 适当降低模板或引物浓度
3. 适当减少酶量
4. 降低镁离子浓度
5. 适当提高退火温度或使用二阶段温度法
6. 减少循环次数

PCR常见问题之三

- 拖尾

➤ 现象：产物在凝胶上呈Smear状态。



PCR常见问题之三

• 拖尾

原因

1. 模板不纯
2. Buffer不合适
3. 退火温度偏低
4. 酶量过多
5. dNTP、 Mg^{2+} 浓度偏高
6. 循环次数过多

对策

1. 纯化模板
2. 更换Buffer
3. 适当提高退火温度
4. 适量用酶
5. 适当降低dNTP和镁离子的浓度
6. 减少循环次数

PCR常见问题之四

• 假阳性 (筛选转基因、检测基因表达情况)

➤ 现象：空白对照出现目的扩增产物

➤ 原因：靶序列或扩增产物的交叉污染

➤ 对策：

1. 操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外；
2. 除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及加样枪头等均应一次性使用。
3. 各种试剂最好先进行分装，然后低温贮存。

PCR的应用

- ❖ 高特异性
- ❖ 高灵敏度
- ❖ 简便快速
- ❖ 用途广泛：

防止污染

生命学科

医学工程

遗传工程

疾病诊断

法医学

考古学