

多聚酶链式反应（PCR）基因扩增及电泳检测

一、 实验目的

1. 学习和掌握 PCR 实验原理及操作步骤
2. 掌握移液枪和 PCR 仪操作技术
3. 了解核酸琼脂糖凝胶电泳的原理及操作步骤

二、 实验原理

PCR 技术，即聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）是在体外中通过酶促反应有选择地大量扩增（包括分离）一段目的基因的技术。PCR 是体外酶促合成特异 DNA 片段的方法，主要由高温变性、低温退火和适温延伸三个步骤反复的热循环构成：

1. 模板 DNA 的高温变性：模板 DNA 经加热至 95℃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，为下轮反应做准备；

2. 模板 DNA 与引物的低温退火：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. 引物的适温延伸 DNA 模板：在 Taq DNA 酶的最适温度（72℃）下，以引物 3'端为合成的起点，以单核苷酸为原料，沿模板以 5'→3'方向延伸，合成 DNA 新链。这样每一双链的 DNA 模板，经过一次解链、退火、延伸三个步骤的热循环后就成了两条双链 DNA 分子。

如此反复进行，每一次循环所产生的 DNA 均能成为下一次循环的模板，每一次循环都使两条人工合成的引物间的 DNA 特异区拷贝数扩增一倍，PCR 产物

得以 $2n$ 的批数形式迅速扩增，经过 25~30 个循环后，理论上可使基因扩增 10^9 倍以上，实际上一般可达 $10^6 \sim 10^7$ 倍。

由于 PCR 产物不能直接观察到，所以为了检测 PCR 是否扩增出目的基因，一般要进行电泳检测。

琼脂糖凝胶电泳以琼脂糖凝胶作为支持介质的区带电泳法，是基因工程中最基本的技术，DNA 制备及浓度测定、目的 DNA 片段的分离等均需要这一技术。琼脂糖是由琼脂分离制备的链状多糖，由 1,3 连接的吡喃型 β -D-半乳糖和 1,4-连接的 3,6 脱水吡喃型 α -L-半乳糖组成，形成相对分子量为 10^4 - 10^5 的长链。琼脂糖加热溶解后分子随机线团状分布，当温度降低时链间糖分子上的羟基通过氢键作用相互盘绕成绳状琼脂糖束，构成孔径结构，而随着琼脂糖浓度不同形成不同大小的孔径。DNA 分子在碱性环境中带负电荷，在外加电场作用下向正极泳动。因此，可根据待分离 DNA 片段的大小选用不同的琼脂糖胶浓度。一般而言，0.5-0.6%的凝胶可以分离 20bp-50kb 范围内的 DNA 片段。

琼脂糖凝胶电泳对核酸的分离作用主要依据它们的相对分子质量及分子构型，同时和凝胶的浓度也有密切关系。DNA 片段迁移距离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时比较，便可测出未知片段的大小。

三、 实验试剂与器材

模板DNA

Taq DNA酶

引物-F、引物-R

dNTP mix、灭菌水、琼脂糖、50×TAE缓冲液、10000×GelRed染料、

DNA marker、6 ×Loading buffer

PCR 仪、PCR 管、枪头、移液枪、电泳仪、电泳槽、制胶器、凝胶层相仪、微波炉

四、 实验步骤

1. PCR 扩增反应

1) 配制 50 μ L 反应体系，在 PCR 管中依次加入下列溶液：

模板DNA	1 μ L
引物-F	1 μ L
引物-R	1 μ L
dNTP mix、Taq酶 等	25 μ L
加灭菌水至	50 μ L

2) 设置 PCR 反应程序

95℃预变性 5 min	
95℃变性 30 s	} 30 个循环
55℃退火 30 s	
72℃延伸 40 s	
72℃延长 5 min	
12℃保持 2 min	

3) 上样，启动 PCR 反应程序。

2. PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测

1) 1×TAE 电泳缓冲液的配制

取 20 ml TAE (50×) 溶液，加入二次水至 1L。

2) 琼脂糖凝胶的制备

称取 1g 琼脂糖于 250mL 锥形瓶中，加入 100mL 1×TAE 电泳缓冲液，在微波炉中加热，使琼脂糖完全溶解。当琼脂糖溶液降至 50-60℃时，加入 10 μL 的 GelRed (10000×) 染色液。把琼脂糖溶液倒入制胶器中，然后把梳子放在合适的位置。室温下，琼脂糖凝固约需 20 至 40 分钟，待胶凝固后，小心地把梳子拔出。把托盘及胶放置于电泳槽内，样品孔置于负极一侧，调整缓冲溶液液面高度，使胶面在缓冲液 2-6mm 下。

将 50μLPCR 反应溶液与 10μL Loading buffer(6×)混合后，用移液枪将 10μL 混合溶液小心缓慢注入琼脂糖凝胶板的样品孔中。然后用移液枪将 10μLmarker 溶液小心缓慢注入琼脂糖凝胶板的样品孔中。

加样后，盖上电泳槽盖子，打开电源，连接电泳槽设备，设置电压 200 V 后，进行电泳。当 loading buffer 移动到距离胶板下沿约 1-2 cm 处时，停止电泳。取出胶后，用凝胶成像系统观察，并拍照记录。

五、 注意事项

1. 每吸取一个试剂，都要更换枪头，防止溶液的污染。
2. 使用移液枪吸取液体时，尽可能紧贴液面吸取防止产生气泡。放液时也尽可能紧贴液面放液。
- 3 移液枪使用完毕后，需要将其调回量程最大处。

4. 电泳使用时，注意红色正极（+）与红线连接，黑色负极（-）与黑线相连。

六、思考题

1. PCR 技术的基本实验原理？
2. 引物设计上应考虑哪些方面？
3. 琼脂糖凝胶电泳技术的基本原理？