**实验三 PCR**

**一、实验目的**

了解PCR的基本原理，掌握PCR的基本操作技术。

**二、实验原理**

PCR (Polymerase Chain Reaction)是80年代中发展起来的一种DNA特定片段体外扩增技术。它已广泛应用于基因克隆、文库构建、DNA序列分析、生化检测、基因定位等领域。最初PCR是用E.coli DNA聚合酶I的Klenow片段进行，但Klenow片段高温下迅速失活，因此每一轮反应都需要加一份新酶，这不仅麻烦，还往往导致产量低，产物长短不一等现象。随后，从噬热细菌(Thermas aquaticus)中分离到热稳定的Taq聚合酶，才解决了这一问题。由于Taq DNA聚合酶高温下稳定，在整个扩增过程中不需要添加新的酶，从而保证了PCR技术的实用性，使其得以迅速发展。

PCR的原理及过程如下

 (1) 高温变性，解链：将反应体系(模板DNA、引物1、引物2、Mg2+、4种dNTP和Taq DNA聚合酶)置于高温(94℃)下变性，使模板双链DNA解链为两条单链；

(2) 在低温(37~65℃)下退火，使引物与模板链3’端结合，形成部分双链DNA；(3) 在中温(~72℃)下，通过Taq DNA聚合酶使引物从5’端向3’端延伸，随着4种dNTP的掺入合成新的DNA互补链，完成第一轮变性、退火和聚合反应循环。反复进行这种变性、退火和聚合反应循环，可使两端引物限定范围内的DNA序列以指数形式扩增。循环的次数主要取决于模板的浓度，从理论上讲一个目的DNA分子经20轮扩增后，可达106。

**三、实验材料及仪器用具**

1. 实验材料

拟南芥基因组DNA、gfp基因

2. 实验试剂

ddH2O、dNTP、Taq酶、hhl1及gfp基因引物、光敏启动子引物、Mg2+、10×Buffer

3. 实验仪器

DNA热循环仪、电泳仪、电泳槽、紫外检测仪、台式离心机、0.5ml离心管10个、吸管头若干个、微量取液器(20 ×l)一支、1.5ml离心管20个、离心管架两个

**四、实验步骤**

1. 模板DNA的抽提：按碱裂解法抽提得到质粒DNA。

2. PCR操作：

(1) PCR反应混合液的配制 （n为反应数）：

n x 2.0 µl反应缓冲液(含15 mM MgCl2)

n x 1.0 µl dNTPs (2 mM)

n x 1.0 µl上游引物(5 µM) （引物在反应液中的浓度通常为0.2~0.5µM）

n x 1.0 µl下游引物(5 µM)

n x 0.5~0.8单位Taq酶

加无菌水至总体积 n x 19 µl

每个PCR管中加入19 µl反应混合液，1 µl稀释质粒DNA（~2 ng），再加2滴矿物油，防止水分蒸发。稍离心。

含有重组质粒的菌体也可直接用于PCR扩增：用牙签点取少量菌体在空的PCR管底部插几下，加入反应混合液和滴矿物油即可。注意：菌体不可太多，太多的菌体(即杂质)会抑制Taq酶的活性。

(2)  PCR反应过程：

94℃×2min + （94℃×30s + 退火温度×30s + 72℃×35s）×35 + 72℃×5min + 4℃

3. PCR产物的检测：取5 l PCR产物在琼脂糖凝胶中电泳，然后放在紫外检测仪下观察，记录结果。

**五、注意事项**

由于PCR灵敏度非常高，所以应当采取措施以防反应混合物受痕迹量DNA的污染。因而在实验中应注意下列事项：

1. 所有的与PCR有关的试剂，只作PCR实验用，而不挪作它用。

2. 操作中所用的PCR管、离心管、吸管头等都只能一次性使用。

3. 特别注意防止引物受到用同一引物扩增的DNA的污染。应从引物母液中取一小 部分稀释成工作液作平常用，以避免污染引物母液。