

1. 根据目的基因的序列设计引物，详细请参考后面附录

2. PCR 体系的准备（注意操作要在冰盒上进行）

Components	Volume (20ul)
10× buffer	2ul
dNTP	2ul
Primer F	1ul
Primer R	1ul
模板 template	1ul
聚合酶	0.5ul
dd water	12.5ul

3. PCR 循环（体系 20ul，热盖温度 105° C）

95° C 5min-----预变性 （一般不变）
94° C 40s -----变性 （一般不变）
56° C 40s-----退火 （根据引物的 T_m 值变化）
72° C 50s-----延伸 （一般不变）

例：2009-09-26 P 基因 C22orf28(1518bp)

95° C 5min-----预变性
95° C 40s -----变性
55° C 40s-----退火
72° C 90s-----延伸

6 个循环

以上的那一步算的 T_m 值不包括酶切位点，所以退火温度较低，有利于于引物结合上去
由于这次用的 polymerase 的效率是 1 分钟 1kb，所以延伸时间设置了 90 秒

94° C 40s -----变性
70° C 40s-----退火
72° C 90s-----延伸

30 个循环

因为经过以上 6 个循环的 PCR，模板已经加上了酶切位点这一段，因此这时的 T_m 值也是按引物全长来计算，退火温度一般可以减 6~8° C

本次实验还做了 touch down，就是从第二个循环开始，每个循环的退火温度依次降低 0.2° C，以更好的 P 出目的产物。

（结果请参考图片）

附录：目的基因 C22orf28(1518bp)

ATGAGTCGCAGCTATAATGATAGCTGCAGTTCTTGGAGAAGATCAATAAAACTGCTG
GAGGATCAAGAAGGGCTTCGTGCCCAACATGCAGGTTGAAGGTGTTTTCTATGTGAAT
GATGCTCTGGAGAAATTGATGTTTGAGGAATTAAGGAATGCCTGTCGAGGTGGTGGTG
TTGGTGGCTTCCTGCCAGCCATGAAACAGATTGGCAATGTGGCAGCCCTGCCTGGAAT
TGTTTCATCGATCTATTGGGCTTCCTGATGTCCATTCAGGATATGGGTTTGCTATTGGGAA
CATGGCAGCCTTTGATATGAATGACCCTGAAGCAGTAGTATCCCCAGGTGGTGTCTGGGT
TTGACATCAACTGTGGTGTCCGCTTGCTAAGAACCAATTTAGATGAAAGTGATGTCCAG
CCTGTGAAGGAGCAACTTGCCCAAGCTATGTTTGACCACATTCCTGTTGGGGTGGGGT
CAAAAGGTGTCATCCCAATGAATGCCAAAGACTTGGAGGAGGCCTTGGAGATGGGGG
TGGACTGGTCCTTAAGAGAAGGGTATGCCTGGGCTGAAGACAAGGAGCACTGCGAGG
AGTACGGAAGGATGCTGCAGGCTGACCCCAATAAAGTTTCTGCAAGGGCGAAGAAAA
GAGGCCTTCCTCAGTTGGGGACCCTGGGAGCAGGCAACCATTATGCAGAAATCCAGGT
TGTGGATGAGATTTTCAATGAGTATGCTGCTAAAAAATGGGCATCGACCATAAGGGAC
AGGTGTGTGTGATGATCCACAGTGGAAAGCAGAGGCTTGGGCCACCAAGTAGCCACAG
ATGCGCTGGTAGCTATGGAGAAGGCCATGAAGAGAGACAAGATTATAGTCAATGATCG
GCAGTTGGCTTGTGCTCGAATCGCTTCCCCAGAGGGTCAAGACTATCTGAAGGGAATG
GCAGCTGCTGGGAACATATGCCTGGGTCAACCGCTCTTCCATGACCTTCTTAACCCGTCA
GGCTTTCGCCAAGGTCTTCAACACAACCCCTGATGACTTGGACCTACATGTGATCTATG
ATGTTTCTCACAAACATTGCCAAAGTGGAGCAGCATGTGGTGGACGGAAAGGAACGGA
CACTGTTAGTACACAGGAAGGGATCCACCCGCGCTTTCCTCCTCACCATCCCCTCATT
GCTGTTGATTACCAACTCACTGGACAGCCAGTGCTCATTGGTGGCACCATGGGAACCT
GTAGTTATGTTCTTACTGGCACTGAACAGGGCATGACTGAGACCTTTGGAACAACCTG
TCATGGAGCGGGCCGTGCATTGTCCCGAGCAAAATCTCGACGTAAATTTAGATTTCCAGG
ATGTCTTAGACAAATTGGCAGATATGGGAATTGCGATCCGTGTTGCCTCACCCAAACTG
GTTATGGAAGAGGCTCCTGAGTCCTATAAGAATGTGACAGATGTGGTAAATACCTGCCA
TGATGCTGGAATCAGCAAGAAAGCCATTAAACTGAGACCAATTGCTGTGATCAAAGGA
TAG

正向引物：ATA GCGGCCGC A ATGAGTCGCAGCTATAATGAT（其中 ATA 为保护碱基，GCGGCCGC 为酶切位点，A 是为了使 ORF 正确，后面的才是真正配对的部分）

反向引物：GCGGCCGC A TCCTTTGATCACAGCAAT（GCGGCCGC 为酶切位点，A 是为了使 ORF 正确，TAG 为终止密码子不要）

登陆 http://www.finnzymes.com/reagents_index.html

计算 Tm 值（一般来说，退火温度是 Tm 值-5° C，PCR 几个循环后，引物外侧的序列已经参入了扩增片段中，要重新计算 Tm 值，根据经验，此时的 Tm 值可以减低 7~8 度）

跑胶时跑得最前的是引物二聚体噢！