

## 第四次作业

- 1.简述PCR引物的设计原则。
- 2.简述第一、二、三代测序技术的特点。

### 问题分析：

1. (以下内容参考自丁香通<sup>[1]</sup>)

设计PCR引物时，要遵循如下规则：

- (1) 首先要找到DNA序列的保守区，并且保证PCR引物具有特异性（具体而言，要保证引物与非特异扩增序列的同源性不要超过70%或有连续8个互补碱基同源），否则PCR引物会与待扩增序列以外的部分结合，导致扩增不到所需的序列；
  - (2) 要避开产物的二级结构区，因为形成二级结构的DNA片段往往非常稳定，不容易变性而复制；
  - (3) 引物长度一般为15-30碱基，相应的复制片段长度为100-600碱基对，引物太短，识别与结合的特异性下降；太长则使得最适延伸温度明显提高，不能保证产物的特异性；
  - (4) G+C含量一般为40%-60%，以保证 $T_m$ 值尽可能接近72℃，使复性条件最佳；
  - (5) 引物中四种碱基的分布尽量随机，不要有聚嘌呤或聚嘧啶的存在，尤其3'端不应超过3个连续的G或C，因这样会使引物在G+C富集序列区错误引发；
  - (6) 引物自身不应存在互补序列，否则引物自身会折叠成发夹状结构。这种二级结构会因空间位阻而影响引物与模板的复性结合。若用人工判断，引物自身连续互补碱基不能大于3bp；
  - (7) 两引物之间不应互补，尤应避免3'端的互补重叠，以防引物二聚体的形成。一对引物间不应多于4个连续碱基的同源性或互补性；
  - (8) 引物的3'端不能进行任何修饰，也不能有形成任何二级结构可能，除了极少数特殊的PCR（AS-PCR）反应外，引物3'端不能发生错配，这是因为引物的延伸是从3'端开始，若3'端在延伸时发生错误，则PCR产量将大大下降；
  - (9) 引物的5'端限定着PCR产物的长度，它对扩增特异性影响不大，因此能被修饰而不影响扩增的特异性；
  - (10) 引物3'端要避开密码子的第3位，因密码子的第3位易发生简并，会影响扩增特异性与效率。
- 2.第一代测序技术特点：利用化学试剂对特定碱基的特异性切割，或是利用具有特殊结构的核苷酸对DNA复制的终止，结合电泳技术进行测定，具有单次读长长，错误率低的特点。但这类方法测序通量太低，耗时过长，且需要较多的DNA。
- 第二代测序技术特点：基于大规模平行测序技术（边合成边测序，或边连接边测序），其最显著的特征便是高通量，一次能对几十万到几百万条DNA分子进行测序，大大降低了物种全基因组测序的难度，也降低了测序成本。但这些技术单次读长均比较短，限制了通量的提高；边连接边测序法所使用的连接酶效率太低，导致测序时间长；边合成边测序法需要预先构建基因文库，还需要用到相机记录荧光发光顺序。
- 第三代测序技术特点：直接对单个分子进行测序，无需进行PCR扩增，摆脱了扩增误差，提高了单次读长，且对DNA分子和RNA分子均适用。并且在单个遗传分子直接测序时，可以识别出甲基化的碱基，从而直接给出遗传分子表观修饰的结果。但由于单分子信号太弱，信噪比不够大，容易导致准确度下降。

## Reference

- [1] PCR引物设计原则 - 实验方法. 丁香通. <https://www.biomart.cn/experiment/430/457/458/15561.htm> (Accessed April 2, 2020).
- [2] DNA sequencing. Wikipedia. [Online]; [https://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_sequencing](https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_sequencing) (Accessed April 4, 2020).
- [3] [图文]DNA测序技术的发展. 百度文库. <https://wenku.baidu.com/view/55c350a19ec3d5bbfc0a742b.html> (Accessed April 4, 2020).