

PCR 原理和操作 良好证书



张三 于 2016 年 10 月 参加 生物技术实践能力考试(PCR 原理和操作), 成绩合格 (理论 良好, 实验操作 良好, 实验结果 合格 , 综评 良好), 特发此证。

证实编号: 51034620161011302

身份证号码: 4303221995500166

PCR THEORY & OPERATION EXAMINATION CERTIFICATE

Rank: Basic

Grade: B

ID Number: 4303221995500166

Certificate Number: 51034620161011302

Biotechnology Department, Guangzhou Medical University Authority



更多细节访问



PCR 原理和操作良好证书

姓名：张三
证书编号：51034620161011302
身份证号码：4303221995500166

实验过程：设计引物，利用 PCR 扩增细菌 E.coR 16s rRNA 基因

成绩：由生技老师集体评判

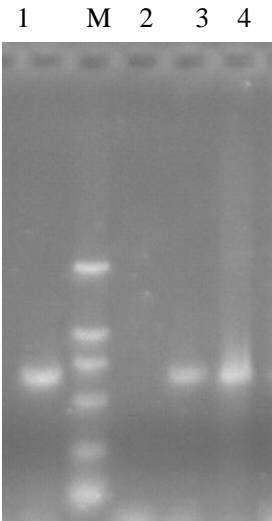
	原理	操作			实验结果
		试剂配制	仪器操作	实验习惯实验安全	
评分	良好	良	优秀	良	合格
结论	良				

以下部分，全部由张三完成。

PCR 原理：PCR 技术的基本原理 类似于 DNA 的 天然复制过程，其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 是一种体外 DNA 扩增技术，是在模板 DNA、引物和 4 种脱氧核苷酸存在的条件下，依赖于 DNA 聚合酶的酶促合反应，将待扩增的 DNA 片段与其两侧互补的寡核苷酸链引物经“高温变性—低温退火—引物 PCR 扩增仪 延伸”三步反应的多次循环，使 DNA 片段在数量上呈指数增加，从而在短时间内获得我们所需的大量的特定基因片段。

实验步骤：1. 设计引物，上游引物：aatgagaggctagtcattc，下游引物：tacgagtcaacgtagg；送公司合成；2. PCR 体系：premix：15ul，上游引物，下游引物 1ul（100uM），模板 DNA，1uL，dH2O 12uL，PCR 条件：退火温度 55 度，35 循环。

结果：



Lane 1 阳性对照（指导老师样品）；2 H₂O；3, 4 自己样品

讨论：基于 PCR 原理三步骤而设置变性-退火-延伸三个温度点。在标准反应中采用三温度点法，双链 DNA 在 90~95℃变性，再迅速冷却至 40 ~60℃，引物退火并结合到靶序列上，然后快速升温至 70~75℃，在 Taq DNA 聚合酶的作用下，使引物链沿模板延伸。对于较短靶基因(长度为 100~300bp 时)可采用二温度点法，除变性温度外、退火与延伸温度可合二为一，一般采用 94℃变性，65℃左右退火与延伸(此温度 Taq DNA 酶仍有较高的催化活性)。①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℃~94℃1min 足以使模板 DNA 变性，若低于 93℃则 需延长时间，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。

②退火(复性)温度与时间：退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至 40℃~60℃，可使引物和模板发生结合。由于模板 DNA 比引物复杂得多，引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。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。对于 20 个核苷酸，G+C 含量约 50%的引物，55℃为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：

$$T_m \text{ 值(解链温度)}=4(G+C)+2(A+T)$$

$$\text{复性温度}=T_m \text{ 值}-(5\sim 10^{\circ}\text{C})$$

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。

③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

高于 90℃时，DNA 合成几乎不能进行。

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。