

聚合酶链式反应(PCR)扩增和扩增产物的克隆

第一节 概述

PCR(Polymerase Chain Reaction,聚合酶链反应)是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 的方法.它包括三个基本步骤: (1) 变性(Denature):目的双链 DNA 片段在 94℃下解链; (2) 退火(Anneal):两种寡核苷酸引物在适当温度(50℃左右)下与模板上的目的序列通过氢键配对;(3) 延伸(Extension):在 TaqDNA 聚合酶合成 DNA 的最适温度下,以目的 DNA 为模板进行合成.由这三个基本步骤组成一轮循环,理论上每一轮循环将使目的 DNA 扩增一倍(图 4),这些经合成产生的 DNA 又可作为下一轮循环的模板,所以经 25-35 轮循环就可使 DNA 扩增达 106 倍。

一、 PCR 反应中的主要成份

1. 引物: PCR 反应产物的特异性由一对上下游引物所决定。引物的好坏往往是 PCR 成败的关键。引物设计和选择目的 DNA 序列区域时可遵循下列原则:

(1) 引物长度约为 16-30bp, 太短会降低退火温度影响引物与模板配对,从而使非特异性增高。太长则比较浪费,且难以合成。

(2) 引物中 G+C 含量通常为 40%-60%,可按下式粗略估计引物的解链温度 $T_m = 4(G+C)+2(A+T)$ 。

(3) 四种碱基应随机分布,在 3'端不存在连续 3 个 G 或 C,因这样易导致错误引发。

(4) 引物 3'端最好与目的序列阅读框架中密码子第一或第二位核苷酸对应,以减少由于密码子摆动产生的不配对。

(5) 在引物内,尤其在 3'端应不存在二级结构。两引物之间尤其在 3'端不能互补,以防出现引物二聚体,减少产量。

(5)两引物间最好不存在 4 个连续碱基的同源性或互补性。

(6)引物 5'端对扩增特异性影响不大,可在引物设计时加上限制酶位点、核糖体结合位点、起始密码子、缺失或插入突变位点以及标记生物素、荧光素、地高辛等。通常应在 5'端限制酶位点外再加 1-2 个保护碱基。引物不与模板结合位点以外的序列互补。所扩增产物本身无稳定的二级结构,以免产生非特异性扩增,影响产量。

(7) 简并引物,选用简并程度低的密码子,例如选用只有一种密码子的 Met, 3'端应不存在简并

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

性。否则可能由于产量低而看不见扩增产物。

一般 PCR 反应中的引物终浓度为 0.2-1.0 μ mol/L。引物过多会产生错误引导或产生引物二聚体, 过低则降低产量。利用紫外分光光度计, 可精确计算引物浓度, 在 1cm 光程比色杯中, 260nm 下, 引物浓度可按下式计算:

$$X \text{ mol/L} = \text{OD}_{260} / (A(16000) + C(70000) + G(12000) + T(9600))$$

X: 引物摩尔浓度, A、C、G、T: 引物中 4 种不同碱基数。

2. 4 种三磷酸脱氧核苷酸(dNTP): dNTP 应用 NaOH 将 pH 调至 7.0, 并用分光光度计测定其准确浓度。dNTP 原液可配成 5-10mmol/L 并分装, -20 $^{\circ}$ C 贮存。一般反应中每种 dNTP 的终浓度为 20-200 μ mol/L。理论上 4 种 dNTP 各 20 μ mol/L, 足以在 100 μ l 反应中合成 2.6 μ g 的 DNA。当 dNTP 终浓度大于 50mmol/L 时可抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。4 种 dNTP 的浓度应该相等, 以减少合成中由于某种 dNTP 的不足出现的错误掺入。

3. Mg²⁺: Mg²⁺浓度对 Taq DNA 聚合酶影响很大, 它可影响酶的活性和真实性, 影响引物退火和解链温度, 影响产物的特异性以及引物二聚体的形成等。通常 Mg²⁺ 浓度范围为 0.5-2mmol/L。对于一种新的 PCR 反应, 可以用 0.1-5mmol/L 的递增浓度的 Mg²⁺ 进行预备实验, 选出最适的 Mg²⁺浓度。在 PCR 反应混合物中, 应尽量减少有高浓度的带负电荷的基团, 例如磷酸基团或 EDTA 等可能影响 Mg²⁺ 离子浓度的物质, 以保证最适 Mg²⁺ 浓度。

4. 模板: PCR 反应必须以 DNA 为模板进行扩增, 模板 DNA 可以是单链分子, 也可以是双链分子, 可以是线状分子, 也可以是环状分子(线状分子比环状分子的扩增效果稍好)。就模板 DNA 而言, 影响 PCR 的主要因素是模板的数量和纯度。一般反应中的模板数量为 10² -10⁵ 个拷贝, 对于单拷贝基因, 这需要 0.1 μ g 的人基因组 DNA, 10ng 的酵母 DNA, 1ng 的大肠杆菌 DNA。扩增多拷贝序列时, 用量更少。灵敏的 PCR 可从一个细胞, 一根头发, 一个孢子或一个精子提取的 DNA 中分析目的序列。模板量过多则可能增加非特异性产物。DNA 中的杂质也会影响 PCR 的效率。

5. Taq DNA 聚合酶: 一般 Taq DNA 聚合酶活性半衰期为 92.5 $^{\circ}$ C 130min, 95 $^{\circ}$ C 40min, 97 $^{\circ}$ C 5min。现在人们又发现许多新的耐热的 DNA 聚合酶, 这些酶的活性在高温下活性可维持更长时间。Taq DNA 聚合酶的酶活性单位定义为 74 $^{\circ}$ C 下, 30min, 掺入 10nmol/L dNTP 到核酸中所需的酶量。Taq DNA 聚合酶的一个致命弱点是它的出错率, 一般 PCR 中出错率为 2×10^{-4} 核苷酸/每轮循环, 在利用 PCR 克隆和进行序列分析时尤应注意。在 100 μ l PCR 反应中, 1.5-2 单位的

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

Taq DNA 聚合酶就足以进行 30 轮循环.所用的酶量可根据 DNA、引物及其它因素的变化进行适当的增减.酶量过多会使产物非特异性增加,过少则使产量降低.反应结束后,如果需要利用这些产物进行下一步实验,需要预先灭活 Taq DNA 聚合酶, 灭活 Taq DNA 聚合酶的方法有:

- (1) PCR 产物经酚:氯仿抽提,乙醇沉淀。
- (2) 加入 10mmol/L 的 EDTA 螯合 Mg²⁺ 。
- (3) 99-100℃加热 10min.目前已有直接纯化 PCR 产物的 Kit 可用。

6. 反应缓冲液: 反应缓冲液一般含 10-50mmol/L Tris·Cl (20℃下 pH8.3-8.8), 50mmol/L KCl 和适当浓度的 Mg²⁺ . Tris·Cl 在 20℃时 pH 为 8.3-8.8,但在实际 PCR 反应中,pH 为 6.8-7.8. 50mmol/L 的 KCl 有利于引物的退火.另外,反应液可加入 5mmol/L 的二硫苏糖醇(DTT)或 100μg/ml 的牛血清白蛋白(BSA),它们可稳定酶活性,另外加入 T4 噬菌体的基因 32 蛋白则对扩增较长的 DNA 片段有利.各种 Taq DNA 聚合酶商品都有自己特定的一些缓冲液。

二、PCR 反应参数

1. 变性: 在第一轮循环前,在 94℃下变性 5-10min 非常重要,它可使模板 DNA 完全解链,然后加入 Taq DNA 聚合酶(hot start),这样可减少聚合酶在低温下仍有活性从而延伸非特异性配对的引物与模板复合物所造成的错误.变性不完全,往往使 PCR 失败,因为未变性完全的 DNA 双链会很快复性,减少 DNA 产量.一般变性温度与时间为 94℃ 1min.在变性温度下,双链 DNA 解链只需几秒钟即可完全,所耗时间主要是为使反应体系完全达到适当的温度.对于富含 GC 的序列,可适当提高变性温度.但变性温度过高或时间过长都会导致酶活性的损失。
2. 退火: 引物退火的温度和所需时间的长短取决于引物的碱基组成, 引物的长度、引物与模板的配对程度以及引物的浓度.实际使用的退火温度比扩增引物的 T_m 值约低 5℃.一般当引物中 GC 含量高,长度长并与模板完全配对时, 应提高退火温度.退火温度越高, 所得产物的特异性越高.有些反应甚至可将退火与延伸两步合并,只用两种温度(例如用 60℃和 94℃)完成整个扩增循环, 既省时间又提高了特异性.退火一般仅需数秒钟即可完成,反应中所需时间主要是为使整个反应体系达到合适的温度.通常退火温度和时间为 37℃-55℃,1-2min.
3. 延伸: 延伸反应通常为 72℃,接近于 Taq DNA 聚合酶的最适反应温度 75℃.实际上,引物延伸在退火时即已开始,因为 Taq DNA 聚合酶的作用温度范围可从 20℃-85℃.延伸反应时间的

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体, 由钟鼎生物专业技术人员整理汇总, 所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明, 其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难, 钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权, 也不对其可靠性、真实性承担任何责任, 特此声明。

长短取决于目的序列的长度和浓度.在一般反应体系中,Taq DNA 聚合酶每分钟约可合成 2kb 长的 DNA。延伸时间过长会导致产物非特异性增加.但对很低浓度的目的序列,则可适当增加延伸反应的时间。一般在扩增反应完成后,都需要一步较长时间(10-30min)的延伸反应,以获得尽可能完整的产物,这对以后进行克隆或测序反应尤为重要。

4. 循环次数: 当其它参数确定之后,循环次数主要取决于 DNA 浓度。一般而言 25-30 轮循环已经足够。循环次数过多,会使 PCR 产物中非特异性产物大量增加。通常经 25-30 轮循环扩增后,反应中 Taq DNA 聚合酶已经不足,如果此时产物量仍不够,需要进一步扩增,可将扩增的 DNA 样品稀释 103-105 倍作为模板,重新加入各种反应底物进行扩增,这样经 60 轮循环后,扩增水平可达 109-1010 。

扩增产物的量还与扩增效率有关,扩增产物的量可用下列公式表示: $C=C_0(1+P)^n$ 。其中:C 为扩增产物量, C_0 为起始 DNA 量,P 为增效率,n 为循环次数。

在扩增后期,由于产物积累,使原来呈指数扩增的反应变成平坦的曲线,产物不再随循环数而明显上升,这称为平台效应。平台期会使原先由于错配而产生的低浓度非特异性产物继续大量扩增,达到较高水平。因此,应适当调节循环次数,在平台期前结束反应,减少非特异性产物。

三、PCR 产物的克隆

在许多研究中,需要将 PCR 产物克隆,以获得目的 DNA 片段。此时,所用 PCR 循环数应尽量小,以减少平台效应或非特异性扩增产物的干扰。通常将 PCR 产物插入到载体中有下列一些方法。

1. 平末端连接: 由于 Taq DNA 聚合酶往往在 PCR 产物 3'端加上多余的非模板依赖碱基,在用平末端连接克隆 PCR 产物前,可用 Klenow 片段或 T4 DNA 聚合酶处理补平末端。
2. 在 PCR 产物尾部加 dT 或 ddT: Taq DNA 聚合酶会在 3'端加上多余的非模板依赖碱基,而且对 A 优先聚合,所以 PCR 产物末端的多余碱基大部分都是 A。利用这一特点,可以经限制酶切割产生的平末端用酶加上 dT 或 ddT,使载体与 PCR 产物末端互补并进行连接.载体末端加 dT 尾可直接用 Taq DNA 聚合酶和 dTTP 或 ddTTP,ddTTP 因缺少 3-OH 而不能再形成磷酸二酯键,保证在载体 3'端只加上一个 ddTTP,而其 5'端所含的磷酸基团可与 PCR 产物的 3'端 OH 连接,连接产物在载体和 PCR 产物之间的双链上带两个切口,这种重组 DNA 仍可转化合适的受体菌,并在细菌体内修复.目前一些公司已开发出可直接用于克隆 PCR 产物的带 3'-T 的

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

T-Vector。

3. 粘性末端连接：利用引物中附加在 5'端的限制酶位点,直接将 PCR 产物经适当的限制酶切割后产生粘性末端,与载体连接,产生重组 DNA.如果下游两个引物中含有两个不同的限制酶位点,经酶切后定向克隆到载体中。

第二节 材料、设备及试剂

一、材料

不同来源的模板 DNA。

二、设备

移液器及吸头，硅烷化的 PCR 小管，DNA 扩增仪(PE 公司)，琼脂糖凝胶电泳所需设备(电泳槽及电泳仪)，台式高速离心机。

三、试剂：

- 1、10×PCR 反应缓冲液：500mmol/L KCl, 100mmol/L Tris-Cl, 在 25℃下, pH9.0, 1.0% Triton X-100。
- 2、MgCl₂ : 25mmol/L。
- 3、4 种 dNTP 混合物:每种 2.5mmol/L。
- 4、Taq DNA 聚合酶 5U/μl。
- 5、T4 DNA 连接酶及连接缓冲液：配方见第五章。
- 6、经 Sma I 酶切和加 dT 的 pUC 质粒。
- 7、其它试剂：矿物油（石蜡油），1% 琼脂糖，5×TBE，酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)，无水乙醇和 70% 乙醇。

第三节 操作步骤

一、PCR 反应

1. 依次混匀下列试剂

35μl H₂O

5μl 10×PCR 反应缓冲液

4μl 25mmol/L MgCl₂

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。

4 μ l 4 种 dNTP

0.5 μ l 上游引物（引物 1）

0.5 μ l 下游引物（引物 2）

0.5 μ l 模板 DNA(约 1ng)

混匀后离心 5 秒。

2. 将混合物在 94 $^{\circ}$ C 下加热 5 分钟后冰冷,迅速离心数秒,使管壁上液滴沉至管底,加入 Taq DNA 聚合酶 (0.5 μ l 约 2.5U),混匀后稍离心,加入一滴矿物油覆盖于反应混合物上。

3. 用 94 $^{\circ}$ C 变性 1 分钟, 45 $^{\circ}$ C 退火 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 分钟, 循环 35 轮,进行 PCR。最后一轮循环结束后,于 72 $^{\circ}$ C 下保温 10 分钟,使反应产物扩增充分。

二、电泳

按第二章所述,取 10 μ l 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶进行电泳分析,检查反应产物及长度。

三、PCR 产物的纯化

扩增的 PCR 产物如利用 T-Vector 进行克隆,可直接使用,如用平末端或粘性末端连接,往往需要将产物纯化。

（一）酚/氯仿法

1.取反应产物加 100 μ l TE。。

2.加等体积氯仿混匀后用微型离心机 10000rpm 离心 15 秒,用移液器将上层水相吸至新的小管中.这样抽提一次,可除去覆盖在表面的矿物油。

3.再用酚:氯仿:异戊醇抽提二次,每次回收上层水相。

4.在水相中加 300 μ l 95%乙醇,置-20 $^{\circ}$ C 下 30min 沉淀。

5.在小离心机上 10000rpm 离心 10min,吸净上清液。加入 1ml 70%乙醇,稍离后,吸净上清液.重复洗涤沉淀 2 次。将沉淀溶于 7ml ddH₂O 中,待用。

（二）Wizard PCR DNA 纯化系统

Wizard PCR DNA 纯化系统可以快速、有效、可靠地提取 PCR 扩增液中的 DNA,提纯后的 DNA 可用于测序、标记、克隆等。

该系统中含有的试剂和柱子可供 50 次 PCR 产物的纯化,试剂包括:

免责声明: 以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体,由钟鼎生物专业技术人员整理汇总,所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明,其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难,钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权,也不对其可靠性、真实性承担任何责任,特此声明。

50ml Wizard PCR DNA 纯化树脂 5ml 直接提取缓冲液 50 支 Wizard 微型柱

- 1、吸取 PCR 反应液水相放于 1.5ml eppendorf 管中。
- 2、加 100ml 直接提取缓冲液，涡旋混匀。
- 3、加 1ml PCR DNA 纯化树脂，1 分钟内涡旋混合 3 次。
- 4、取一次性注射器，取出注塞，并使注射筒与 Wizard 微型柱连接，用移液枪将上述混合液加入注射筒中，并用注塞轻推，使混合物进入微型柱。
- 5、将注射器与微型柱分开，取出注塞，再将注射筒与微型柱相连，加入 2ml 80%异丙醇，对微型柱进行清洗。
- 6、取出微型柱置于 eppendorf 管中，12000g 离心 20 秒，以除去微型柱中的洗液。
- 7、将微型柱放在一个新 eppendorf 管中，加 50 μ l TE 或水，静止 1 分钟后，12000g 离心 20 秒。
- 8、丢弃微型柱，eppendorf 管中的溶液即为纯化 DNA，存放于 4 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C。

[注意] 1、纯化树脂在使用前必须充分混匀。

2、PCR 产物中矿物油应尽量吸去，否则会影响提取 DNA 的产量。

四、载体加 dT 尾

- 1.将 1 μ g pUC19 用 Sma I 全酶切。
- 2.在小管中按上述 PCR 反应,加入各种混合物,除将 4 μ l 4 种 dNTP 改为 4 μ l 25mM dTTP。
- 3.加入 1 μ l(5U)的 Taq DNA 聚合酶在 72 $^{\circ}$ C下加热 2h。
- 4.按前面三中所述,用酚:氯仿:异戊醇抽提二次。
- 5.加入 2 倍体积 95%乙醇,在-20 $^{\circ}$ C下沉淀 1hr。
- 6、离心，用 70%乙醇漂洗后，真空抽干，溶于 10ml ddH₂O 中。

五、PCR 产物与载体粘末端连接

- 1、在 7ml PCR 产物中加 1ml 带 dT 尾的 pUC 质粒。
- 2、加 1ml T4DNA 连接酶，1ml 10 \times 连接缓冲液，混匀，16 $^{\circ}$ C连接过夜。
- 3、取 5ml 连接产物转化感受态细胞并筛选重组子。

六、PCR 产物 3'突出端切平及平末端连接

1. 在 50ml 的 PCR 产物中,直接加 0.5ml T4 DNA 聚合酶混匀。
2. 37 $^{\circ}$ C反应 10 分钟后,70 $^{\circ}$ C灭活 10 分钟。

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。

3. 用酚:氯仿抽提 2 次。
4. 乙醇沉淀。沉淀用 70%乙醇漂洗后，真空抽干，溶于 7ml ddH₂O 中。
5. 质粒用 SmaI 切开后，70℃ 15 分钟灭活酶，取 1ml（约 0.1mg）加入上述 PCR 产物中。
加 T4 DNA 连接酶 1ml，连接缓冲液 1ml。
6. 取 5ml 连接产物转化感受态细胞并筛选重组子。

[注意]1.PCR 非常灵敏，操作应尽可能在无菌操作台中进行。

- 2.吸头、离心管应高压灭菌，每次吸头用毕应更换，不要互相污染试剂。
- 3.加试剂前，应短促离心 10 秒钟，然后再打开管盖，以防手套污染试剂及管壁上的试剂污染吸头侧面。
- 4.应设含除模板 DNA 所有其它成分的负对照。

免责声明：以上资料来源于网络、专业书籍、发表论文、学术期刊且不限于上述媒体，由钟鼎生物专业技术人员整理汇总，所有整理的实验方法和技术路线以及理论说明，其目的在于帮助科研工作者解决实验等各种困难，钟鼎生物对上述技术资料不具备任何专利保护和所有权，也不对其可靠性、真实性承担任何责任，特此声明。