

实验三、引物设计原则和 PCR 实验

一、实验目的：掌握 PCR 引物设计原则和 PCR 方法

二、引物设计原则

- 1、**长度**：15—30bp，其有效长度 $[L_n=2(G+C)+(A+T)]$ 一般不大于 38，否则 PCR 的最适延伸温度会超过 Taq 酶的最佳作用温度(74 度)，从而降低产物的特异性。
- 2、**G + C 含量**：应在 40%— 60%之间，PCR 扩增中的复性温度一般是较低 T_m 值引物的 T_m 值减去 5—10 度。引物长度小于 20 时，其 T_m 恒等于 $4 \times (G+C) + 2 \times (A+T)$ 。
- 3、**碱基分布的随机性**：应避免连续出现 4 个以上的单一碱基。尤其是不应在其 3'端出现超过 3 个的连续 G 或 C，否则会使引物在 G + C 富集序列区错误引发。
- 4、**引物自身**：不能含有自身互补序列，否则会形成发夹样二级结构。
- 5、**引物之间**：两个引物之间不应有多于 4 个的互补或同源碱基，不然会形成引物二聚体，尤应避免 3'端的互补重叠。
- 6、**上下游引物的互补性**：一个引物的 3'末端序列不允许结合到另一个引物的任何位点上。
- 7、**3'末端**：如果可能的话，每个引物的 3'末端碱基应为 G 或 C。
- 8、引物应当超出限制性内切酶识别位点至少 3 个核苷酸。

三、PCR 实验步骤

1、配制 20 μ L 反应体系，在 PCR 板中依次加入下列溶液：

模板 DNA 2 μ L

引物 1 1 μ L

引物 2 1 μ L

dNTP 1.5 μ L

MgCl₂ 2 μ L

10 \times buffer 2 μ L

ddH₂O 10 μ L

Taq 酶 0.5

2、设置 PCR 反应程序。

94℃	3min	
94℃	45s	} 30 个循环
55℃	45s	
72℃	45s	
72℃	5min	
4℃	1h	

3、上机，启动反应程序。

4、扩增产物的电泳检测。