

降落 PCR

降落 PCR (touchdown PCR), 一种 PCR 技术, 主要用于 PCR 的条件优化。在许多情况下引物的设计使得 PCR 难以进行, 例如特异性不够易错配等。退火温度过高会使 PCR 效率过低, 但退火温度过低则会使非特异扩增过多。

实验材料:

基因样品

仪器、耗材:

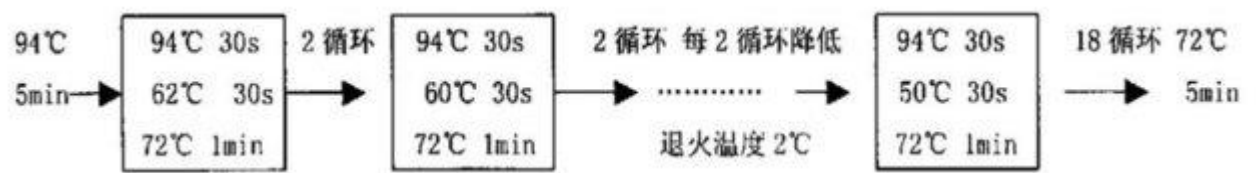
PCR 仪

实验步骤:

1. 反应体积为 50 μl 。
2. 人 CD137 胞膜外区基因的 PCR 扩增体系: CD137-pCDNA3 质粒 4 μl , P1, P2 各 0.5 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 2 mmol/L, dNTP 0.4 mmol/L, Taq 5 U。
3. hIgG1Fc 片段的 PCR 扩增体系: 含人 hIgG1Fc 的 PGEM-T 质粒 4 μl , P3、P4 各 0.4 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 2 mmol/L, dNTP 0.4 mmol/L, Taq 5 U。
4. HBVDNA 多聚酶基因的 PCR 扩增体系:
 - (1) 第一轮: HBVDNA 模板 4 μl , P5、P6 各 0.25 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, Taq 0.8 U。

(2)第二轮:取 5 倍稀释的第一轮 PCR 产物 4 μ l 为模板, P7、P8 各 0.25 μ mol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, Taq 0.8 U。

5. 分别在各灭菌 PCR 管加入上述各反应成分, 100 $^{\circ}$ C煮沸 5 min, 立即冰浴 5 min, 加入 TaqDNA 聚合酶, 混匀, 离心, PCR 程序如下:



6. 取 10 μ l PCR 扩增产物, 在 2%或 3%琼脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察扩增产物。

注意事项:

由于目标是在较早的循环中避免低 T_m 值配对, 在 TD—PCR 中最好应用热启动技术。设计时, 退火温度的范围应跨越 15 $^{\circ}$ C左右, 从高于估计 T_m 值至少几度到低于它 10 $^{\circ}$ C