

CNGBdb

国家基因库生命大数据平台

PCR 入门之基础篇—追根溯源

徐怀前, 华大科技

xuhuaiqian@bgi.com

问题

1. 影响PCR反应的因素有哪些？
2. 限制引物长度的原因是什么？
3. 引物二聚体形成的原因？
4. PCR扩增的能量来源是什么？
5. PCR buffer含有哪些成份？主要作用是什么？
6. 非特异扩增形成原因？如何避免？
7. 为什么建库过程中是末端修复后加 A"而不是 G" C" T"C？
8. 为什么有些PCR聚合酶需要最后加入？
9. 为什么有些PCR反应需要热启动？PCR热启动的原理是什么？
10. 不同DNA聚合酶聚合错误率差异原因是？

PCR技术起源

Polymerase Chain Reaction-聚合酶链式反应

1973年台湾钱嘉韵分离出耐高温Taq DNA

聚合酶

1983年Mullis 发明PCR

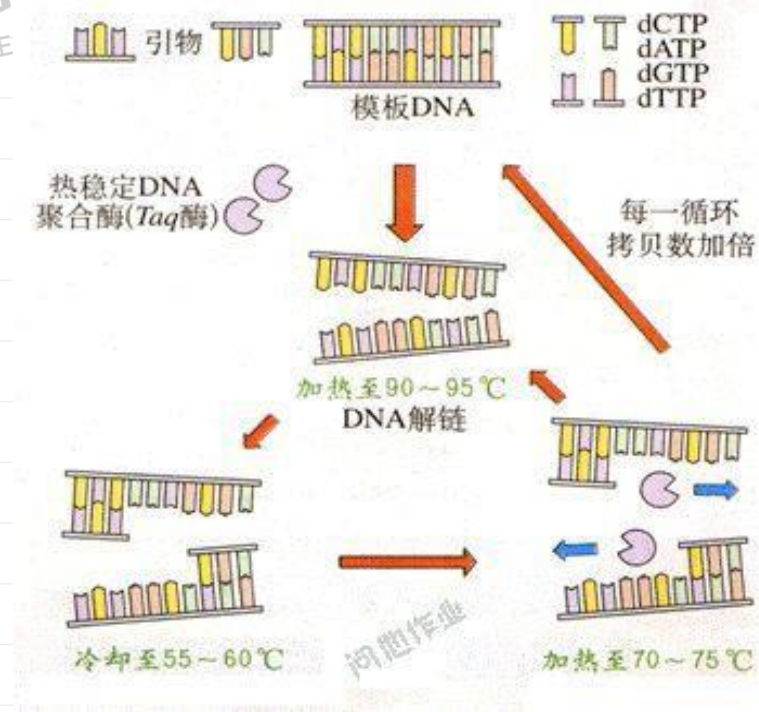
1986年Saiki Taq DNA聚合酶应用于PCR



Kary Banks Mullis

1944年12月-2019年8月7日

PCR反应基本成份



- 引物
- dNTP
- 二价阳离子 (Mg^{2+})
- 一价阳离子 (KCl)
- 模板DNA
- DNA聚合酶
- 反应缓冲液

变性→退火→延伸

— PCR引物设计

- 1. 引物长度：15~30bp，引物过短，复性温度低，非特异性产物增多；引物太长，复性温度太高，导致PCR延伸效率降低

$$K = [g/2]^{G+C} \times [(1-g)/2]^{A+T}$$

K 是该寡核苷酸出现在DNA序列空间中的概率， g 是该DNA序列中G+C的含量， G, C, A, T 是特定的寡核苷酸中相应的核苷酸的数目

— PCR引物设计

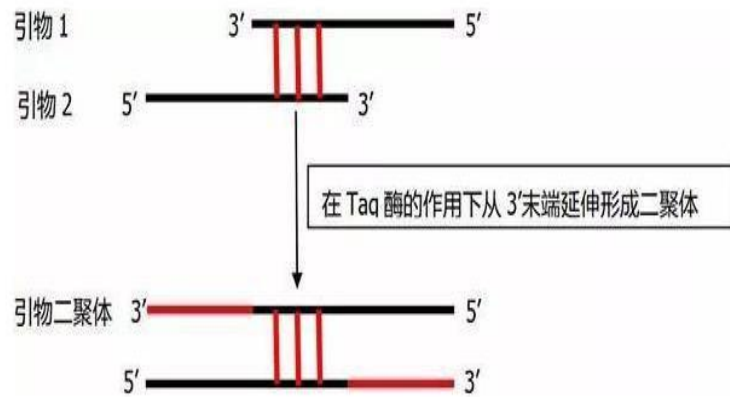
➤ 2. **引物GC含量**：GC含量40%~60%之间，以45%-55%为宜，GC含量过高或过低都不利于引发反应。上下游引物GC含量和 T_m 值要保持接近；

1. GC含量高，高GC含量的片段解链需要较高能量， T_m 值高；
2. 退火时相对正常引物而言更容易配对，但是与相近序列配对的可能性也比正常引物高，更容易出现非特异扩增；引物间、引物内容易引发非特异扩增；
3. GC含量太低， T_m 值低，PCR扩增特异性降低；

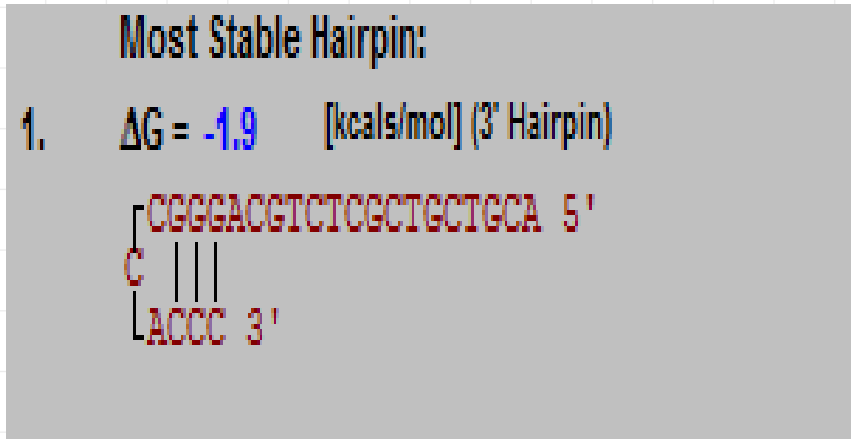
— PCR引物设计

➤ 3. 引物二级结构-引物二聚体

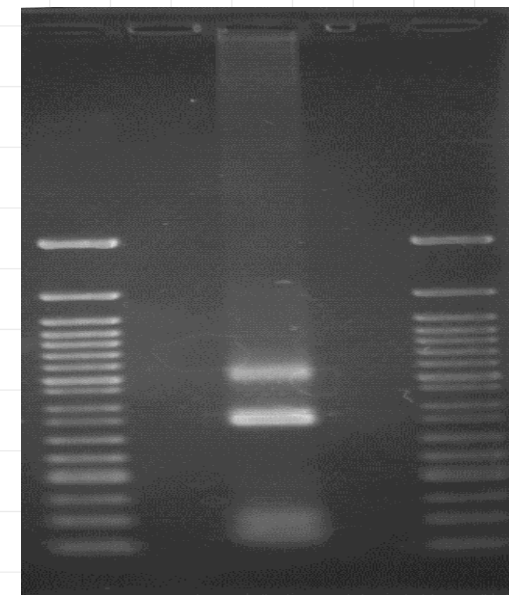
- a. 引物间不能超过连续4个碱基的同源性或互补性
- b. 引物自身内互补碱基不超过3bp，不能形成发卡结构



引物二聚体



引物内发卡结构



— PCR引物设计

➤ 4. 引物3 端碱基

- a. 引物3 端几个碱基必须严格配对；
- b. 引物3 端碱基最好为T，其次为G或者C，A引发错误率偏高（存疑）；
- c. 扩增编码区时，引物3 端不要终止于密码子的第3位，因密码子的第3位易发生简并，会影响扩增的特异性与效率；
- d. 引物 3 端出现连续三个的以上的连续碱基，如GGG、CCC，容易使错误引发几率增加；

— PCR引物设计

➤ 5. 引物5 端碱基

- a. 引物5 端碱基可以不必配对；
- b. 引物5 端可以引入酶切位点；
- c. 引物5 端可以修改某些碱基；
- d. 引物5 端可以进行放射性标记或非放射性标记（如生物素）；

— PCR引物设计

末端'A

引物长度、T_m值及GC含量

Primer Premier

Primer:

Direct Select:

3' **ATAAGGAGCGCAGCGTAGCGTGAAC** 5'

5' TATTCCTCGCGTCGCATCGCACTTGTAGCTCTGACCCCGCATCTCATCCCTCCTCTCGCTTAGTTCAGATCGAAATCGCA 3'

Y S S R R I A L V A L D P R I S S L L S L S S D R N R K

	Rating	Seq No	Length	T _m [°C]	GC%	Δ G [kcal/mol]	Activity [μg/OD]	Degeneracy	Ta Opt [°C]
Sense	79	48	25	63.4	48.0	-46.1	34.0	1	--
Anti-sense	82	25	25	73.8	56.0	-52.8	30.8	1	--
Product	51	--	--	--	--	--	--	--	33.8

	Hairpin	Dimer	False Priming	Cross Dimer
Sense	Found	Found	Found	Found
Anti-sense	None	Found	None	

Most Stable Hairpin:
ΔG = 0.1 [kcal/mol] (3' Hairpin)

TTCGCTCTCCTCCCTA 5'

AGTTCAGAT 3'

— PCR引物设计

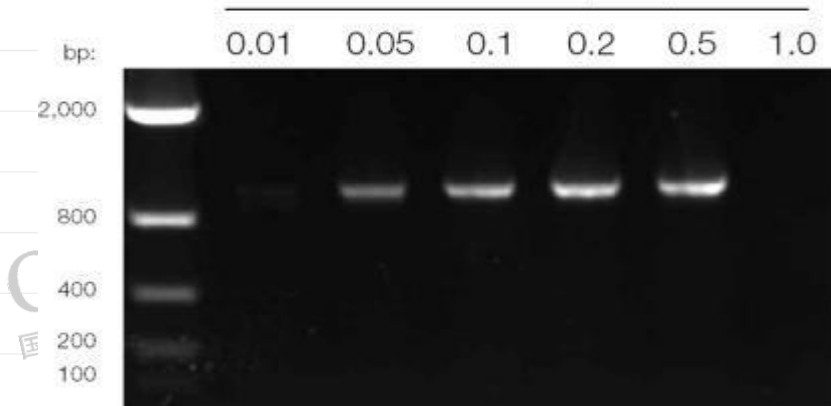
➤ 6. 引物溶解和保存

二 dNTPs

dNTP：脱氧核苷三磷酸，dATP、dTTP、dCTP、dGTP；

dUTP?

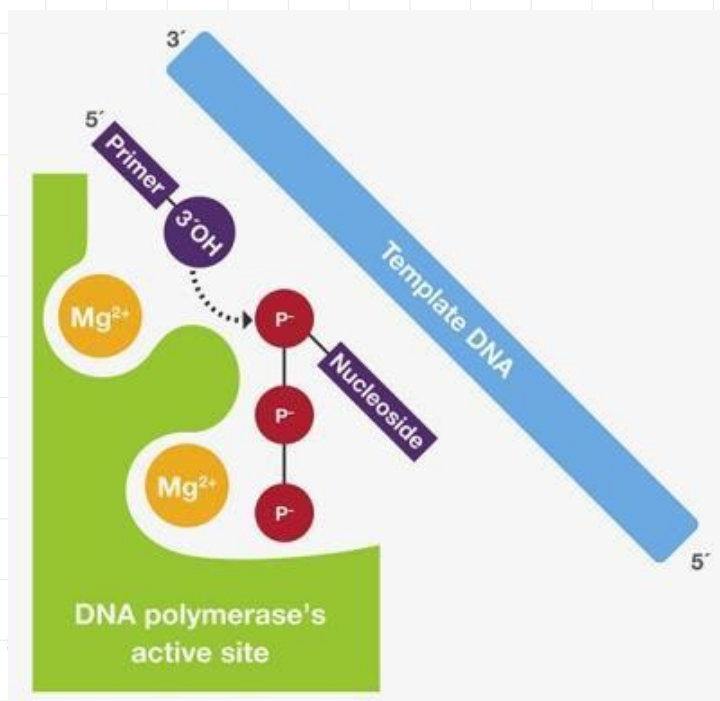
- 标准反应体系包含四种等摩尔浓度的脱氧核苷三磷酸；
- 每种dNTP浓度一般在200~250 μ mol/L左右；
- 高浓度的dNTP (> 4mmol/L) 会抑制扩增反应；?
- dNTP贮存液PH值8.1，储存在-20 $^{\circ}$ C避免反复冻融损坏dNTP分子结构；



使用不同浓度的dNTP对1 kb
lambda DNA进行PCR扩增。每个
反应中的MgCl₂ 终浓度为4 mM。

三 二价阳离子

- a. DNA聚合酶发挥作用需要游离的二价阳离子， $Mg^{2+} > Mn^{2+}$ ， Ca^{2+} 无效；
- b. Mg^{2+} 与寡核苷酸和dNTPs会结合，反应体系中阳离子的浓度超过dNTP和引物来源的磷酸基团的摩尔浓度；



在DNA聚合期间， Mg^{2+} 可帮助协调引物的3'-OH与dNTP的磷酸基团间发生相互作用

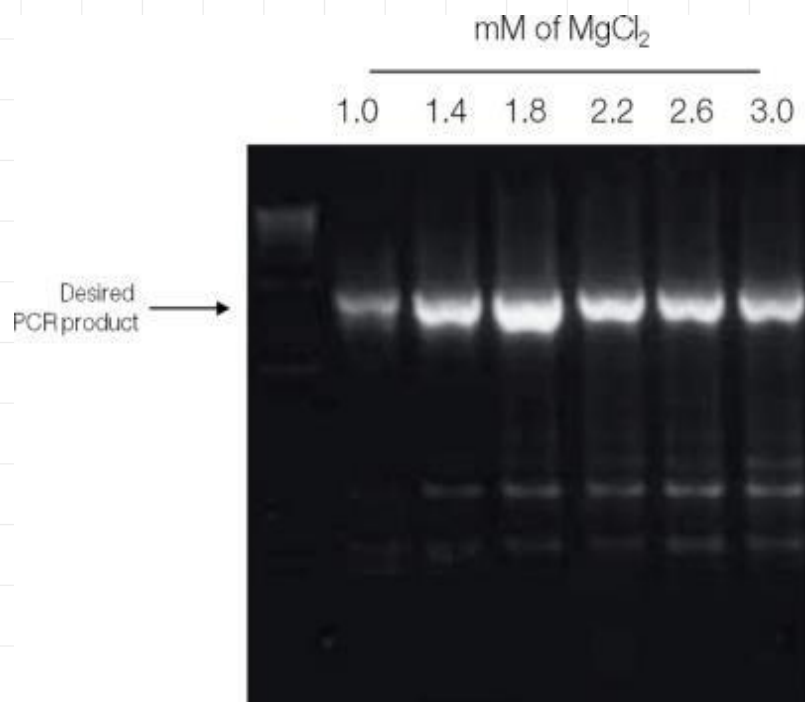
三 二价阳离子

c. Mg^{2+} 浓度范围0.5mmol/L~5mmol/L，常用1.5mmol/L，浓度过高，非特异性

扩增产物增多，过低影响DNA聚合酶活性，产物降低；

d. DNA模板中不应该含有高浓度的螯合剂，如EDTA，也不含有高浓度的带负

电荷的离子基团，如磷酸根；

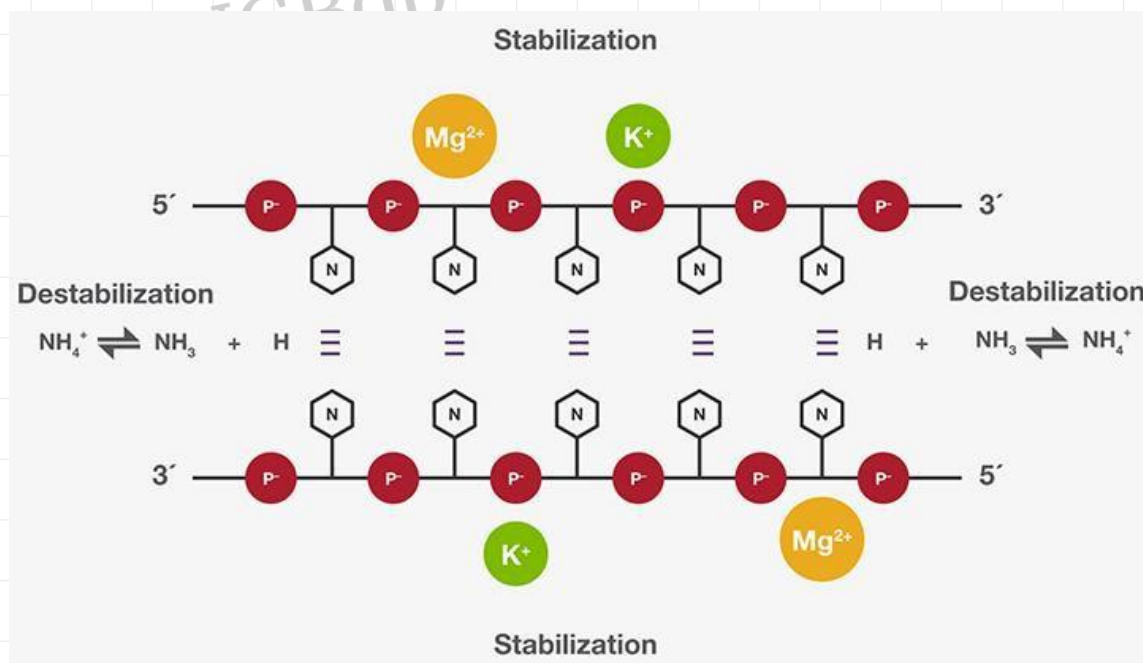


使用不同浓度的 $MgCl_2$ 进行PCR扩增。

最上方条带代表从人类gDNA扩增得到的2.8 kb目标片段。

四 PCR缓冲液

- 10mmol/L Tris-Cl，PH值8.3~8.8之间。72°C时反应体系的pH值下降1个多单位，缓冲液pH值接近7.2；
- 包含50mmol/L的KCl，促进引物退火，离子强度过高抑制DNA聚合酶活性；



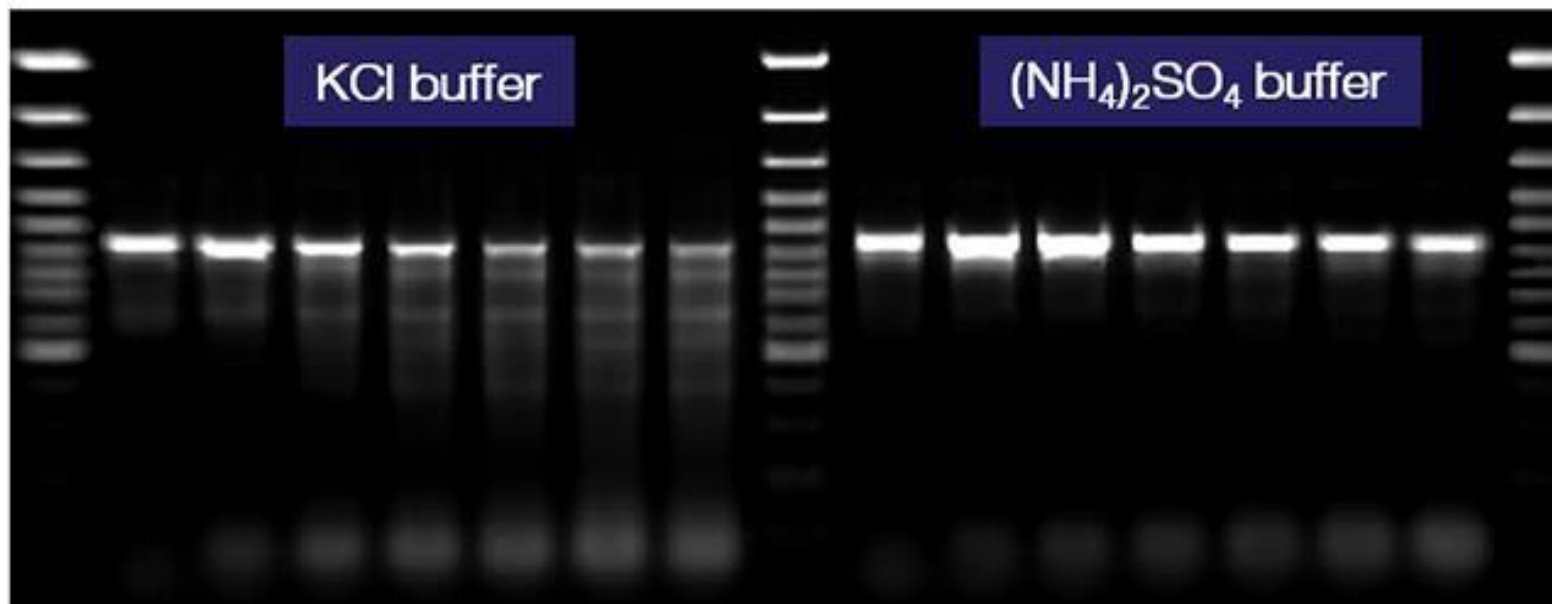
缓冲液离子对DNA双链形成的影响。

钾离子和镁离子 (K⁺和 Mg²⁺) 能够与DNA骨架上的磷酸基团 (P⁻) 结合

并稳定双链形成，而铵离子 (NH₄⁺) 能够与碱基 (N) 之间的氢键相互作用并破坏双链形成

四 PCR缓冲液

mM of MgCl_2 : 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0



使用含不同 MgCl_2 浓度的两种不同缓冲液获得的PCR结果，表明选择合适缓冲液对于PCR扩增特异性的**重要性**。在该反应中，使用 *Taq* DNA 聚合酶从人类gDNA扩增0.95 kb的片段。

五 反应促进剂

二甲基亚砜 (DMSO)

降低双链结合力量，减少DNA的二级结构，有利于高GC模板变性，浓度过高时抑制PCR酶活性

甲酰胺

甜菜碱

甘油

二硫苏糖醇 (DTT)

牛血清白蛋白 (BSA)

Tween20

Triton-100

稳定酶活性，提高产量，高浓度抑制酶活性

六 DNA模板

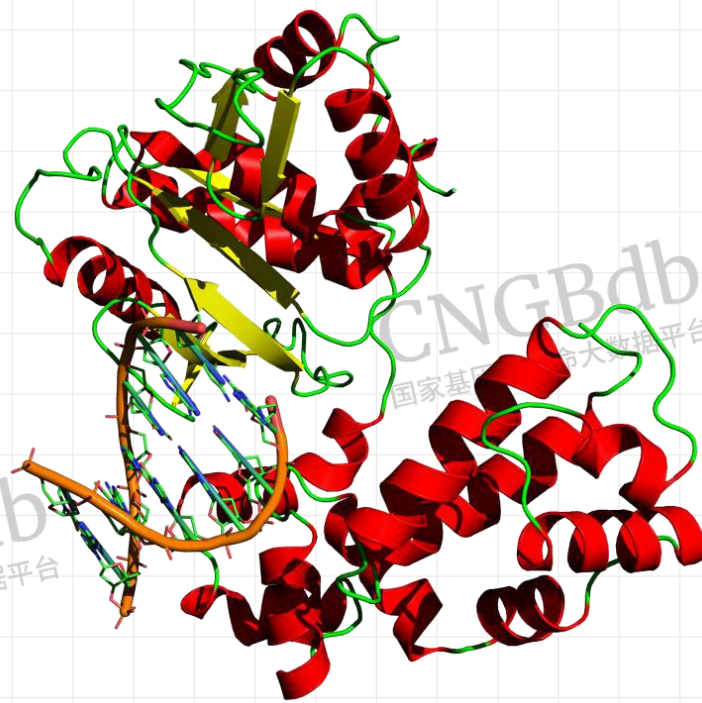
- a. 模板可以是单链也可以是双链DNA；
- b. 闭环DNA扩增效率低于线性DNA；
- c. PCR变性时间与模板GC含量及长度成正相关；
- d. 杂质如苯酚、蛋白酶K、离子型去垢剂、乙醇、异丙醇、肝素、血红蛋白、
溴酚蓝等，抑制PCR反应；
- e. 模板量？

七 DNA聚合酶

7.1 热稳定DNA聚合酶来源

- a. 嗜热和高度嗜热真细菌DNA聚合酶
- b. 嗜热古细菌——*Taq* DNA聚合酶、*Pfu*聚合酶

DNA聚合酶功能和生物学意义是什么？



七 DNA聚合酶

7.2 热稳定DNA聚合酶特性

酶	5' → 3' 外切酶活性	3' → 5' 外切酶活性	保真度	错误率	延伸速率
<i>Taq</i>	有	无	低	1×10^{-4} - 2.28×10^{-5}	1kb/min
Phusion	无	有	高	$> 50 \times Taq$	4kb/min
Q5® 超保真 DNA 聚合酶	无	有	高	$> 280 \times Taq$	6kb/min
Pfu	无	有	高	$8 \times Taq$	0.5~1kb/min
KAPA HiFi DNA Polymerase,	无	有	低	$4 \times Taq$	4kb/min
PfuUltra II Fusion	无	有	搞	$20 \times Taq$	2~4kb/min

七 DNA聚合酶

不同DNA聚合酶经过30个PCR循环后错误率

Polymerase	1 kb template	3 kb template
Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (HF Buffer)	1.32%	3.96%
Phusion High-Fidelity DNA Polymerases (GC Buffer)	2.85%	8.55%
Pyrococcus furiosus DNA polymerase	8.4%	25.2%
Taq DNA polymerase	68.4%	205.2%

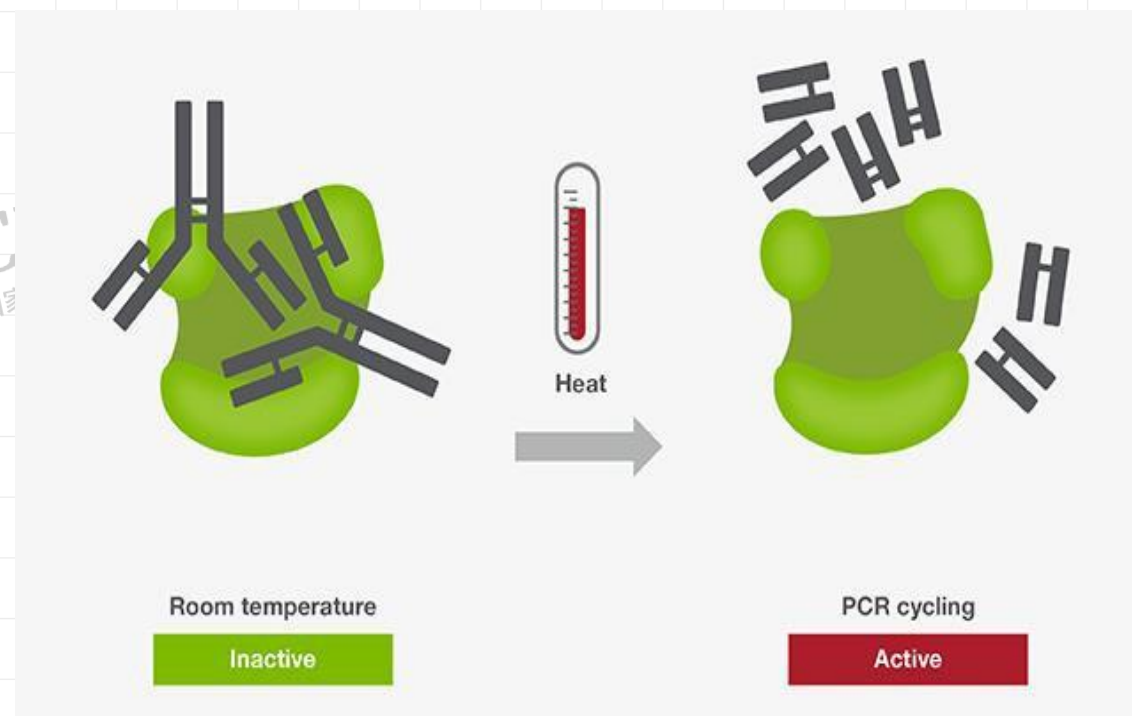
七 DNA聚合酶

7.2 热启动DNA聚合酶

室温&低温条件下，DNA聚合酶活性被抑制，94℃~98℃下聚合酶活性被激活

修饰类型

- a. 抗体封闭DNA聚合酶活性位点
- b. 寡核苷酸修饰
- c. 化学修饰—醛基多聚糖、酸酐修饰等



THANKS

共有、共为、共享

Owned by All, Completed by All and Shared by All

