**PCR实验步骤**

一、 引物设计

1. 请尽量使用22~35mer（Tm值\*＞63℃）的引物。
2. GC含量请设计为45~60%。并请确认GC的位置（偏向）。GC如靠近3'端，则容易出现弥散、杂带等现象。（按5'端一侧的为60~70%，3'端一侧的为40~50%制作比较理想。）
3. 3'末端设计为G或C可提高引物与模板结合效率。但如前所述，如果GC过于偏向3'端，则容易出现弥散、杂带等现象，请注意。
4. 请注意不要使其形成分子内二级结构､引物二聚体等现象｡
5. 扩增长片段时，请使用长度为25~35mer、Tm值为65℃以上的引物。使用25mer以上（Tm值≧65℃）的引物成功率较高。

二、实验流程

反应体系

所有操作请在冰上进行，PCR相关组分解冻后请充分混匀，用完之后请及时放回-20℃保存。

|  |  |
| --- | --- |
| 组分 | 体积 |
| Nuclease-free ddH2O | up to 50 μl |
| 2X普通或者高保真taq酶 | 25 μl |
| 上游引物(10 μM) | 2 μl |
| 下游引物(10 μM) | 2 μl |
| 模板\* | x μl |

不同模板最佳反应浓度有所不同，下表为50μl体系推荐模板使用量：

|  |  |
| --- | --- |
| 模板种类 | 模板使用量 |
| 基因组DNA | 5 - 500 ng |
| 质粒或病毒DNA | 10 pg - 20 ng |
| cDNA | 1 - 5 μl (不超过PCR反应总体积的1/10) |

反应程序

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 温度 | 时间 | 循环数 |
| 98℃ | 10 sec | 28 - 35 cycles |
| Tm\* | 5 sec |
| 72℃ | 5 sec/kb |

\* 请根据引物Tm值设置退火温度，如引物Tm值≥72℃，可删除退火步骤，直接进行后续的延伸步骤(两步法PCR)。如果需要，推荐通过建立温度梯度寻找引物与模板结合的最适温度。此外，退火温度直接决定扩增特异性，如发现扩增特异性差，可适当提高退火温度。

视频链接：https://www.bilibili.com/video/BV1i7411Z7YW/