成都医学院实验课教案首页

级　专业　班　　实验教师：

课程名称	分子生物学实验技术	实验项目名称	PCR 基因扩增和琼脂糖凝胶电泳	学时	5
行课时间	年 月 日 第 - 节			课次	第 次
教材信息	《生物化学与分子生物学实验技术教程》， 杨建雄，科学出版社，2014				
实验目的	1.掌握 PCR 和琼脂糖凝胶电泳实验原理、方法和试剂作用。 2.熟悉 PCR 和琼脂糖凝胶电泳的仪器的操作。 3.了解其他 PCR 实验方法。				
教学组织设计	讲解实验原理、具体步骤及注意事项后，将全班按照 2 人一组进行分组实验，在实验过程中及时回答学生的提问，纠正学生的不规范操作，培养学生的实验技能，最后对本次课的实施情况做出小结，并布置下节课的预习内容及本节课的作业。				
实验所需器材	1. 材料：待鉴定的小提质粒，引物等。 2. 试剂：50×TAE 电泳缓冲液，2×PCR 缓冲液，4 种 dNTP 混和液， DNA 聚合酶，引物，溴酚蓝上样缓冲液等。 3.仪器和设备：PCR 仪，微型水平电泳槽，电泳仪，水浴锅，离心机琼脂糖凝胶电泳系统，凝胶成像系统等。				
重点难点及其解决方案	教学重点: PCR 和琼脂糖凝胶电泳实验原理、方法和试剂作用。 教学难点: PCR 实验原理和琼脂糖凝胶制胶、上样。 解决方案：PCR Flash 操作演示,PCR 仪和琼脂糖电泳操作演示。				
参考资料	1. 魏群 主编，《分子生物学实验指导》，高等教育出版社，2010 年 2. 郑伟娟 主编，《现代分子生物学实验》，高等教育出版社，2008 年 3. 李钧敏 主编，《分子生物学实验》，浙江大学出版社，2009 年				
实验报告撰写要求	实验内容条理清晰；实验步骤完整、详细；实验结果记录真实、准确；实验讨论详细、全面、深入等。				
小结					
审核	实验中心主任：　　年　月　日				

成 都 医 学 院 教 案 续 页

教学过程、内容及时间分配	教学方法与手段
【PCR、琼脂糖凝胶电泳实验定义】（10 min） PCR 是聚合酶链式反应的简称，指在引物指导下由酶催化的对特定模板（克隆或基因组 DNA）的扩增反应，是模拟体内 DNA 复制过程，在体外特异性扩增 DNA 片段的一种技术。 琼脂糖凝胶具有网络结构，蛋白质和核酸根据 pH 不同带有不同电荷，在电场中受力大小不同，因此跑的速度不同，根据这个原理可将其分开。	**提问法：如何在体外对 DNA 进行快速扩增？**
【PCR 技术的发明】（10 min） Khorana（1971）等提出在体外经 DNA 变性，与适当引物杂交，再利用 DNA 聚合酶延伸，扩增 DNA 的设想。 1983 年，Mullis 发明了 PCR 技术，使 Khorana 的设想得到实现。 1989 年美国《Science》杂志列 PCR 为十余项重大科学发明之首，Mullis 荣获 1993 年度诺贝尔化学奖。 通过讲述 Mullis 的生平和发明 PCR 的故事引入一个主题：知识并不代表真理，是人们对客观规律在既有认知体系下的总结，知识随着时代发展在不断被更新（举例，哥白尼之前，人们相信“地心说”）。过去，现在，未来，我们一直在追寻真理的路上，而这条路没有尽头。所以，要保留对既有知识和“权威” 的质疑精神，但是这种质疑不是盲目的质疑，而是以深厚的知识储备和对真理的执着探索精神为支撑的。活到老，学到老，永远保持质疑既有知识的精神和学习新知识的意识，而我们不断学习的目的是为了让自己拥有更新知识的能力。 路漫漫其修远兮，吾将上下而求索。	**通过 Kary B. Mullis 发明PCR技术的故事引入课堂思政内容**
【PCR、琼脂糖凝胶电泳实验原理】（20 min） 模板 DNA 在高温下变性，双链解开为单链状态；然后降低溶液温度，使合成引物在低温下与其靶序列配对，形成部分双链，称为**退火；**再将温度升至合适温度，在 Taq DNA 聚合酶的催化下，以 dNTP 为原料，引物沿 5’→3’方向延伸，形成新的 DNA 片段，该片段又可作为下一轮反应的模板，由高温变性、低温复性和适温延伸组成一个周期，反复循环，目的基因得以迅速扩增。因此 PCR 循环过程为三部分构成：**模板变性、引物退火、热稳定 DNA 聚合酶在适当温度下催化 DNA 链延伸合成。** 蛋白质和核酸会根据 pH 不同带有不同电荷，在电场中受力大小不同，因此跑的速度不同，根据这个原理可将其分开。DNA 分子在琼脂糖凝胶中泳动时有**电荷效应和分子筛效应**。DNA 分子在高于等电点的 pH 溶液中带负电荷，**在电场中向正极移动**。 dNTP 的质量与浓度 dNTP 的质量与浓度和 PCR 扩增效率有密切关系，**注意 4 种 dNTP 的浓度要相等（等摩尔配制），如其中任何一种浓度不同于其它几种时（偏高或偏低），就会引起错配。浓度过低又会降低 PCR 产物的产量。dNTP 能与 Mg^{2+}结合，使游离的 Mg^{2+}浓度降低。**	**结合 flash 动画重点讲授** **提问法：PCR 反应体系里对 dNTP 的浓度有何要求？**

成 都 医 学 院 教 案 续 页

<table>
<tr><th>教学过程、内容及时间分配</th><th>教学方法与手段</th></tr>
<tr><td>
模板（靶基因）核酸
模板核酸的量与纯化程度，是 PCR 成败与否的关键环节之一，传统的 DNA 纯化方法通常采用 SDS 和蛋白酶 K 来消化处理标本。
Mg^{2+}浓度
Mg^{2+}对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响，**Mg^{2+}浓度为 1.5～2.0mmol/L 为宜**。Mg^{2+}浓度过高，反应特异性降低，出现非特异扩增，浓度过低会降低 Taq DNA 聚合酶的活性，使反应产物减少。
<u>【琼脂糖凝胶电泳反应体系】(10 min)</u>
（一）准备干净的配胶板和电泳槽
注意 DNA 酶污染的仪器可能会降解 DNA。
（二）选择电泳方法
一般的核酸检测琼脂糖凝胶电泳就可以；需要分辨率高的电泳，特别是只有几个 bp 的差别应该选择聚丙烯酰胺凝胶电泳；用普通电泳不合适的巨大 DNA 链应该使用脉冲凝胶电泳。
（三）正确选择凝胶浓度
对于琼脂糖凝胶电泳，浓度通常在 0.5～2%之间，低浓度的用来进行大片段核酸的电泳，高浓度的用来进行小片段分析。
（四）适合的电泳缓冲液
常用的缓冲液有 TAE 和 TBE，而 TBE 比 TAE 有着更好的缓冲能力。电泳时使用新制的缓冲液可以明显提高电泳效果。
<u>【PCR 引物反应步骤】(10 min)</u>
● 试剂配置体积：
20 μL 体系中各试剂配置如下表：
<table>
<tr><td>试剂</td><td>H_2O</td><td>P（引物）</td><td>T（模板）</td><td>Mix（2X）</td></tr>
<tr><td>体积/μL</td><td>7</td><td>1+1</td><td>1</td><td>10</td></tr>
</table>
● 程序
预变性 94℃，5-10 min；变性 94℃，45-60 s；退火：50-65℃，30 s。退火温度计算：Tm（解链温度）=4（G+C）+2（A+T）；延伸：72℃，1 min。步骤:变性-延伸，热循环 25-30 个周期；保温：延伸 72℃，10 min。
<u>【琼脂糖凝胶电泳反应步骤】（15 min）</u>
配制 1%的胶进行电泳
1、 称取 0.4 g 琼脂糖放于锥形瓶中，量取 40 mL 的 0.5×TBE 溶液混合，放于微波炉中煮沸，至溶液清彻透明为止。
</td><td>
结合器材现场演示

提问法：循环周期是否越多越好？为什么？通过循环周期有限性问题，引出扩增效率的概率
</td></tr>
</table>

成 都 医 学 院 教 案 续 页

教学过程、内容及时间分配	教学方法与手段
2、 冷却到 60℃时（放于掌心，能感觉到烫但又能忍受），加 2 μL 核酸染料，摇匀。 3、 组装好制胶器，并调至水平。将胶倒于制胶器中，插好梳子。待 40 分钟胶冷却凝固后，就可放于倒好电泳缓冲液的电泳槽中进行点样。 4、 取 5-10 μL 样品溶液，加 1-2 μL 上样缓冲液，混合均匀后进行点样。每排点样孔要点一个 5 μL 的 Marker。 5、 点完后，调电泳仪各参数进行电泳：U：80V；A；200A；T：40min。 **小结(5 min)** **学生实验操作(120 min)** 板书提纲 1. PCR、琼脂糖凝胶电泳实验的主要原理。 2. PCR 实验的主要试剂及作用。	**提问法：上样缓冲液的主要成分及作用？** **根据学生回答进行补充** **归纳** **学生实验操作，进行全程指导**