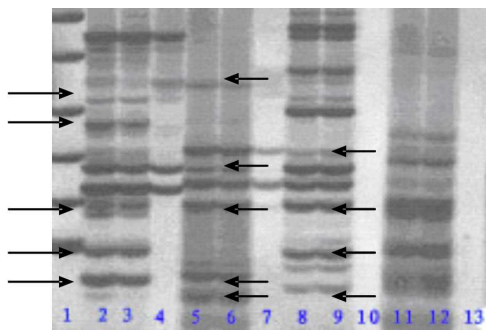




注:箭头所示为放大的非特异谱带;其中,泳道1为Marker;

泳道2和3分别是以图4中的1.5 μl和1.0 μl的D为模板的巢式PCR;泳道4等于D;

泳道5和6分别是以图4中的1.5 μl和1.0 μl的A为模板的巢式PCR;泳道7等于A;

泳道8和9分别是以图4中的1.5 μl和1.0 μl的B为模板的巢式PCR;泳道10为空白;

泳道11和12分别是以图4中的1.5 μl和1.0 μl的C为模板的巢式PCR;

泳道13为空白。

图5 以图4中部分扩增产物为模板进行巢式PCR的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)图谱

3 讨论

前面两种PCR方法(梯度PCR和降落PCR)应用比较广泛,在很多PCR实验中都可以找到它们的成功应用例子^[9]。现在很多厂家的较高型号的PCR仪都实现了梯度功能和降落功能,只需要简单的编程就可以实现梯度PCR和降低PCR的反应,大大地提高了实验的效率。

根据Bahram Arezi等^[8]计算反应产物的公式: $N = N_0 \times (1 + E)C_i$,反应产物除了与扩增效率E和循环次数 C_i 有关之外,还有一个较为关键的因素决定反应产物的得率,那就是反应开始时的模板量 N_0 。当 N_0 差异较大时,扩增产物就会存在较大的差别。我们在准备PCR反应体系时,有两个方面的可能性使反应体系的模板量产生较大的差别:一是各样品的DNA浓度很难精确定量,只能取近似值,从而造成反应体系模板量的差异;第二个可能的原因是在PCR反应体系的配制过程中产生的。在配制PCR反应体系时,往往都是先配制除模板外的PCR Master,分装后再独立加各样品的模板DNA,所以反应体系的各组分(除模板DNA外)都是较均一的。但在反应样品较多的情况下,重复加样过程的繁琐有时会导致加入了不等量的模板DNA到各反应体系中,于是由于反应体系配制过程加样的误差使得反应产物得率受到很大的影响,可能有些反应没有得到可检测水平的产物,在辨别谱带时往往把该样品的基因型定义为零。当发生这种情况时,样品的基因型并没有得到正确的分辨,用巢式PCR接着再扩增可以得到特异性产物。但巢式PCR实验方法在有效的扩增特异性产物的同时,也有效地把原来未检测到的非特异产物扩增到非常显著的水平,所以在辨别谱带时要非常小心。

参考文献

- [1] Krutovsky K V, et al. Comparative mapping in the Pinaceae[J]. Genetics, 2004, 168: 447-461.
- [2] Brown G R, et al. Anchored Reference Loci in Loblolly pine (*Pinus taeda* L.) for integrating pine genomics[J]. Genetics, 2001, 159: 799-809.
- [3] Auckland L, et al. Conifer Microsatellite Handbook[M]. College Station, 2002.
- [4] 王润辉,赵奋成. 湿地松、加勒比松及其杂种DNA的提取与微卫星PCR反应体系的优化[J]. 广东林业科技, 2006, 22(1): 124.
- [5] Shepherd M, et al. Transpecific microsatellites for hard pines[J]. Theor appl genet, 2002, 104: 819-827.
- [6] Rychlik W, et al. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18(21): 6409-6412.
- [7] 黄留玉,王恒禄,苏国富. 降落PCR, PCR最新技术原理、方法及应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004: 254, 258.
- [8] Bahram Arezi, et al. Amplification efficiency of thermostable DNA polymerases[J]. Analytical biochemistry, 2003, 321: 2262-2265.
- [9] CRESTE S, et al. Detection of Single Sequence Repeat Polymorphisms in Denaturing Polyacrylamide Sequencing Gels by Silver Staining[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2001, 19: 299-306.