

重叠 PCR

重叠 PCR 的应用是非常广泛的，他的原理其实很简单：比如说有两个基因或者说一个启动子和一个基因，你要将他们连接到一起，我们首先想到的方法当然是借助于酶切的方法，但有时我们并不一定能找到合适的酶切位点，或者说我们找到了酶切位点，但这种酶非常特殊或者又很贵，我们可能只用一次，这样购买酶就变成了一种浪费，难道没有别的办法了吗？当然有，那就是重组 PCR 技术。举个例子可能更容易说明。比如两个基因，一个命名为 A，一个命名为 B。

A 的序列为 5-atgcatgctagctagaacgctacgctgactacccccctgatc-3，

B 的序列为 5- atgctagtagctagcccccccaggggataatttttaaaacg-3。

首先我们要设计引物，假设引物的序列为：

A1:5-atgcatgctagctagaacgct-3

A2:5-ggggggctagctactagcatgatcaggggtagtcagcgt-3

B1:5-acgctgactacccccctgatcatgctagtagctagcccc-3

B2:5-cgttttaaaaaattatcccct-3

我们的目的是将基因 A，B 通过 PCR 的方法连接起来，我们可以仔细的观察上面的引物 A2 和 B1，我们会发现这两条引物要比另外两条引物长很多，为什么会这样呢？这就是我们在设计引物的时候在 A2 的 3 端加入了 20 个 B 基因 5 端的序列，在 B1 的 5 端加入了 20 个 A 基因 3 端的序列。我们来看重叠 PCR 的步骤：

1. 以 A1,A2 扩增 A 基因， B1， B2 扩增 B 基因
2. 回收 A， B 基因
3. 以 A， B 为共同的模板， A1 和 B2 为引物，扩增 A+B，这样我们就利用重组 PCR 的方法将 A+B 拼接起来了。为什么会扩出 A+B 呢？因为我们在设计引物的时候使 A， B 有了 20 个互补的碱基，他们可以经过退火结合在一起，因此可以扩增出 A+B。

第三步目前很多人的做法都不同，有的人是先加入模板 A, B, dNTP, Buffer, 水，然后进行 3—5 个循环的扩增，然后在加入引物 A1 和 B2 以及 TAQ 酶，这样做的好处是可以得到特异的扩增，缺点是麻烦。另外一种方法是将引物，双模板，酶，dntp 等所有的反应成分均一起加入 PCR 管，进行反应，好处是节省时间，不太麻烦。

目前重叠 PCR 的应用十分广泛，比如说在基因的定点突变，虽然说现在有很多的突变试剂盒，应用起来也很简单，但那是需要银子的；人工合成基因，其实人工合成基因最基本的技术（目前应用最为广泛的）就是利用重叠 PCR 的方法；启动子与目的基因的串连；两个不同表达盒的连接，大家都知道我们在使用 DNA 调取或者说扩增基因的时候，往往需要将几个表达盒串连起来观察他们的表达效果，但由于绝大多数的 DNA 中都含有内含子，也就是说几个外显子并不是串连在一起的，而要想达到我们的目的，只要应用重叠 PCR 技术就可以轻松完成。