

## PCR 问题及提高 PCR 扩增特异性的方法总结

本文根据自身实验经验总结，针对 PCR 实验过程出现的问题举例，提供可实施的解决方法。并根据经验列举了提高 PCR 反应特异性的方法。

### PCR 常见问题分析

问题 1：假阴性（无扩增产物）

**现象：正对照有条带，样品无条带**

**可能原因：**

- 模板：含有 Taq 酶抑制剂、杂蛋白，模板上样量低或模板降解
- 引物：引物降解，引物设计不合理
- 试剂：酶失活，buffer 不合适
- 反应条件：退火温度高，延伸时间短

**解决方法：**

- 纯化模板并重新提取，并检测模板是否含有抑制剂
- 重新设计引物并低温保存
- 优化 buffer，摸索镁离子浓度或适当加入 DMSO（小于 0.3%）
- 提高退火温度，增加延伸时间（反应条件参照试剂盒说明书）

问题 2：假阳性

**现象：空白对照出现条带**

**可能原因：**

- 引物设计不适，与目的序列具有同源性
- 试剂污染：水、移液枪等被核酸污染
- 样品间出现交叉污染

**解决方法：**

- 实验仪器高压灭菌
- 实验试剂（酶除外）高压灭菌，离心管枪头一次性使用
- 规范实验操作

- 假阳性可通过巢式 PCR 解决，或者使用特异性较高的试剂盒扩增

### 问题 3：拖尾、弥散

**现象：电泳出现拖尾、涂抹带**

**可能原因：**

- 酶用量过多
- 模板纯度较低
- dNTP、镁离子浓度过高
- 循环次数过多

**解决方法：**

- 减少用酶量或使用特异性高的热启动酶扩增
- 纯化模板
- 减少 dNTP 用量，摸索镁离子浓度
- 减少循环次数

### 问题 4：二聚体及非特异性产物

一般小于 100bp 的条带可基本判断为引物二聚体

**主要原因：**

- 引物设计不合理，引物自身具有互补性
- 引物浓度不适
- 镁离子浓度过高，退火温度过低

**解决方法：**

- 重新设计引物并进行 BLAST 检测
- 降低镁离子浓度，提高退火温度
- 增加模板用量

## 提高 PCR 反应特异性的方法

### 1. 引物的设计

引物最好在模板 cDNA 的保守区设计，长度 15-30bp，GC 含量小于 60%，3' 端不超过连续三个 G 或 C，碱基分布错落有致，避免引物自身形成二聚体，设计完成之后，需进行 BLAST 检测，如果与其他基因不具有互补性，则

可以进行下一步实验。

## 2. 降落 PCR

降落 PCR 是一种简单的降低非特异性产物的 PCR，最大的优点就是可以降低实验耗时，同时又可以优化实验的步骤。引物的设计决定退火温度，退火温度过高会使 PCR 效率过低，过低则会使非特异扩增过多。这虽然可以通过反复尝试来优化，但费时费力。降落 PCR 提供了一个较为简易的优化方法。首先在较高的温度下扩增，此时虽然扩增效率低，但非特异扩增基本没有。随着退火温度的降低，非特异扩增会逐步增多。但由于此时特异的扩增产物已经达到一定的数量优势，因此会对非特异扩增产生强烈的竞争抑制，从而大幅提高 PCR 的特异性和效率。

## 3. 热启动扩增

采用热启动方法进行扩增，是除了设计最佳引物之外，提高 PCR 反应特异性最好的方式。在一般的 PCR 反应中，试剂的配置需在冰上进行，且要将 PCR 仪预热，这种方法就类似于热启动，能够一定程度的抑制错配。但是酶在低温下也存在活性，只要体系中有 DNA 链存在，就会扩增产生非特异性条带。采用热启动的方法就是在达到变性温度之前完全抑制酶的活性，而最有效的方法就是使用热启动 Taq 酶（或热启动高保真聚合酶）去扩增，它的原理就是采用化学修饰的方法封闭酶的活性中心，当温度上升到 95°C 时恢复活性，指导扩增。

## 4. 巢式 PCR

采用巢式 PCR 进行扩增，在两轮扩增结果中提高扩增特异性和灵敏度。与普通 PCR 不同的是，它采用两对引物进行扩增，首先用第一对引物普通 PCR，然后将第一轮扩增的产物稀释 100 倍后用第二对引物（巢式引物）二次扩增。因此采用巢式 PCR 可以大大增加困难模板扩增的特异性和有限靶序列的灵敏度。

合适的琼脂糖凝胶的浓度

## 琼脂糖凝胶浓度与 DNA 分离范围

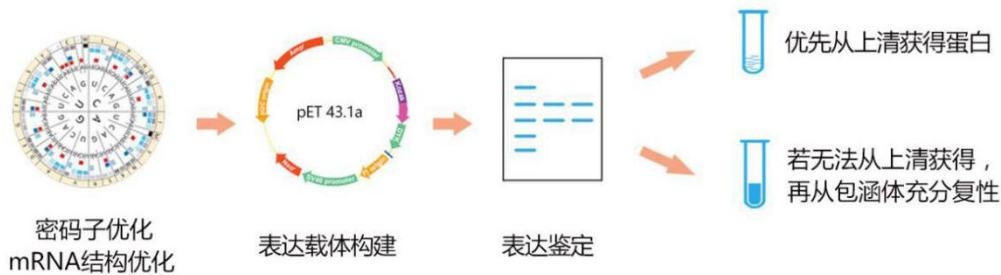
琼脂糖凝胶浓度	DNA 分离范围
0.3%	5000-60000
0.5%	1000-30000
0.7%	800-12000
1.0%	500-10000
1.2%	400-7000
1.5%	200-3000
2.0%	50-2000

## 南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

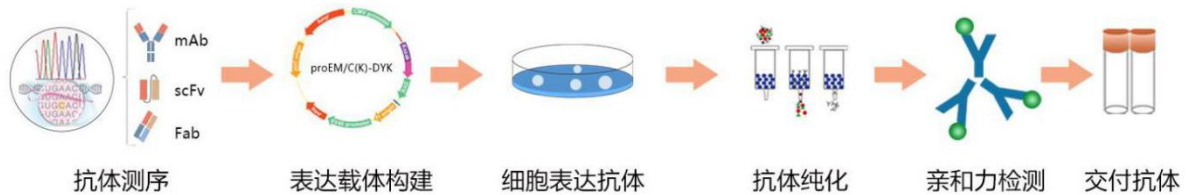
### 一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



### 二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



### 三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



### 四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

