

巢式 PCR

常规 PCR 在对模板进行扩增的过程中，引物与模板之间会出现非特异性配对，导致产生非特异性产物。为了提高 PCR 扩增的特异性，人们对常规 PCR 进行技术改良，发明了巢式 PCR (nested PCR)。

巢式 PCR 是指利用两套 PCR 引物进行两轮 PCR 扩增，第二轮的扩增产物才是目的基因片段。巢式 PCR 的实验原理为根据 DNA 模板序列设计两对引物，利用第一对引物（称为外引物）对靶 DNA 进行 15-30 个循环的标准扩增（见图 1）；第一轮扩增结束后将一小部分起始扩增产物稀释 100-1000 倍加入到第二轮扩增体系中作为模板，利用第二对引物（称为内引物或巢式引物，结合在第一轮 PCR 产物的内部）进行 15-30 个循环的扩增（见图 1），第二轮 PCR 的扩增片段短于第一轮。

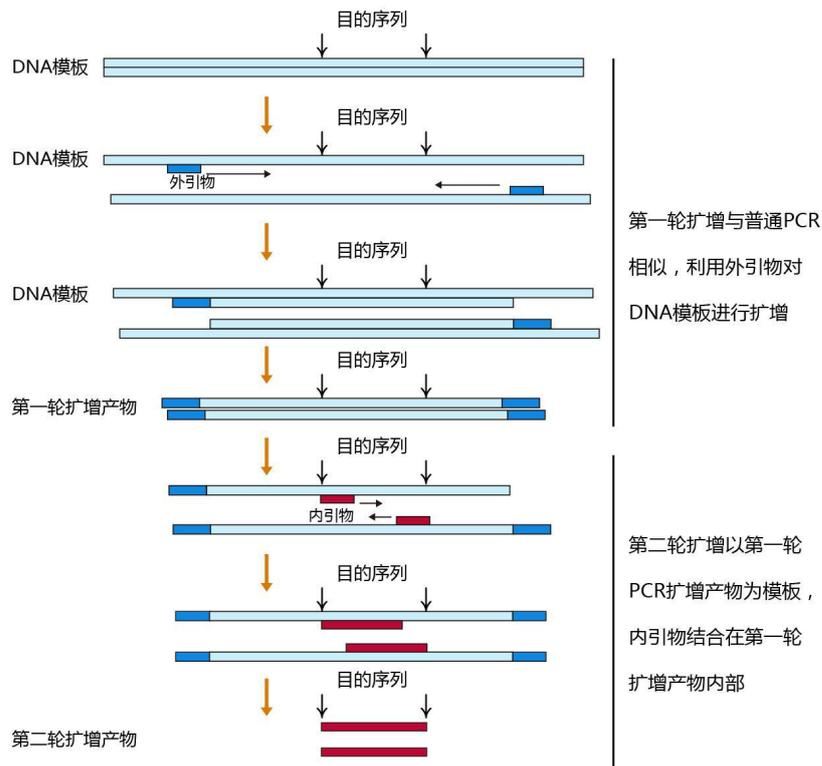


图 1：巢式 PCR 扩增流程

与常规 PCR 技术相比，两套引物的使用提高了扩增的特异性，因为和两套引物都互补的靶序列很少。如果第一次扩增产生了错误片段，内引物与错误片段配对扩增的概率极低，因此提高了 PCR 扩增反应的特异性与灵敏度。

巢式 PCR 特点

- 克服了单次扩增平台期效应的限制，使扩增倍数提高，从而极大的提高了 PCR 的敏感性；
- 由于模板和引物的改变，降低了非特异性反应连续放大进行的可能性，保证了反应的特异性；
- 内测引物扩增的模板是外侧扩增的产物，第二阶段反应能否进行，也是对第一阶段反应正确性的鉴定，因此可以保证整个反应的准确性及可行性。

注意事项

巢式 PCR 的注意事项与常规 PCR 基本相同。除此之外，巢式 PCR 实验还需要注意两轮扩增引物的比例：如果第一次引物过量的话，剩余引物第二次 PCR 扩增的时候同样能有一定的产量，这对于第二次 PCR 反应而言就是非特异性的产物。在第一次 PCR 时，应尽量摸索引物最低的加入量，同时适当增加循环次数，尽量消耗体系中的残余引物。

常见的巢式 PCR 技术

除了常规巢式 PCR 外，巢式 PCR 还有多种形式的扩展，下面分别做一介绍：

半巢式 PCR

巢式 PCR 是利用第一轮 PCR 产物作为第二轮 PCR 的模板，除使用第一轮的一对特异引物之外，在第二轮 PCR 反应中使用一对新的特异引物，共使用四条特异性引物进行 DNA 扩增。半巢式 PCR 与巢式 PCR 原理相同，只是在第二轮 PCR 反应中使用的引物有一条为第一轮 PCR 的引物，这种利用三条引物进行两次 PCR 扩增的方法称为半巢式 PCR (semi-nested PCR)。

在一些需要利用巢式 PCR 进行扩增的实验中，如果基因的 3' 末端或者 5' 末端无法设计出两条引物，可以使用半

巢式 PCR。

反转录巢式 pcr

反转录巢式 PCR(RT-nested PCR)是在反转录 PCR 的基础上发展起来的，在通过反转录获得 cDNA 的基础上，对目的基因进行巢式 PCR 扩增。它和简单的反转录 PCR 一样是用于检测某种 RNA 是否被表达或者比较其相对表达水平，但是特异性更高、可靠性更强，可用于拷贝数较低的 RNA 的扩增，例如扩增丙型肝炎病毒(HCV)感染者体内的 HCV 基因。

单管巢式 PCR

单管巢式 PCR 是在传统巢式 PCR 的基础上将两对 PCR 引物作特殊的设计，巢式外侧两个引物为 25bp，退火温度比较高(68°C)；巢式内侧两个引物为 17bp，退火温度较低(46°C)。通过控制退火温度(68°C)使外侧引物先行扩增，经过 20~30 次循环后(第一轮 PCR 结束)，再降低退火温度(46°C)使内侧引物以第一次 PCR 产物为模板进行巢式扩增。单管巢式 PCR 两轮 PCR 反应均在一个 PCR 管中进行，减少了交叉污染的可能性。

共有序列巢式 PCR

共有序列巢式 PCR(consensus nested PCR)，又称为共有引物巢式 PCR(consensus primer nested PCR)，根据同一种属内较为保守的序列设计简并引物，通常第一轮 PCR 引物的简并碱基较多，第二轮 PCR 引物的简并碱基较少一些，扩增长度为 200~300bp。引物通常设计在能够区分微生物的不同亚型的区域内。对于某一种生物，例如病毒，种属内型别很多，但检测样本中的病毒型别又不确定，使用共有序列巢式 PCR 扩增获得目的序列，进而通过测序获得未知微生物的信息，是一种敏感而又简便易行的检测方法。

共有序列巢式 PCR 引物设计尤为重要，在引物设计之前要搜集可能相关的所有 DNA 序列，利用软件进行严格的序列对比分析，从中找出保守的序列，在这部分序列中可能仍存在一些核苷酸的多样性，则在具有多样性核苷酸的位置上设计为简并碱基，将所出现的所有核苷酸多样性均要考虑，第二轮 PCR 扩增产物长度控制在 200~300bp 左

右。由于引物中简并碱基较多，要摸索适合的退火温度。

巢式 PCR 应用

巢式 PCR 大多应用在当模板 DNA 含量较低时，用一次 PCR 难以得到满意的结果，这时用巢式 PCR 的两轮扩增可以得到很好的效果。

巢式 PCR 操作简单，所需条件与常规 PCR 相同，但与常规 PCR 相比进一步提高了反应的特异性与灵敏性，在微生物学、生物信息学、生物医学等方面有着极其广泛的应用。例如巢式 PCR 技术与 RFLP（限制性片段长度多态性）技术结合，通过设计高度保守序列的引物对待检物种 DNA 进行 PCR 扩增，对 PCR 产物进行 RFLP 分析，从而完成 DNA 分子水平上的多态性检测，该法常用于流行病学的调查和临床常规检测。

相关阅读

[荧光定量 PCR](#)

[反向 PCR](#)

[3'RACE 及 5'RACE 技术](#)

参考文献

[1]程小华, 杨飞等.巢式 PCR 检测血清样品中 HCV RNA 的稳定性[J].2011, 32 (4):526-528 ;

[2]黄留玉.PCR 最新技术原理、方法及应用[M].北京:化学出版社, 2011:38-51 ;

留玉.PCR 最新技术原理、方法及应用[M].北京:化学出版社, 2011:38-51 ;

更多优质服务推荐



SingleB® mAb Discovery Service

SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

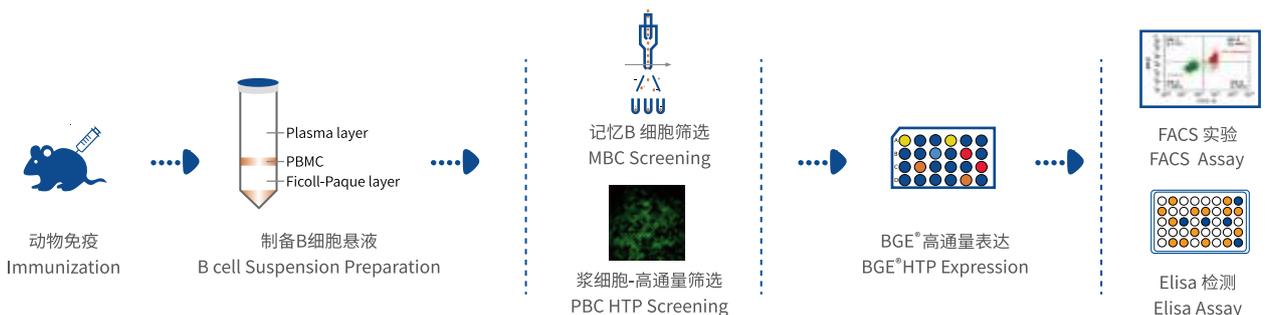
平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性
- 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失
- 重轻链天然配对,亲和力更优
- 高通量,周期短,单抗发现快至29天
- ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')₂、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

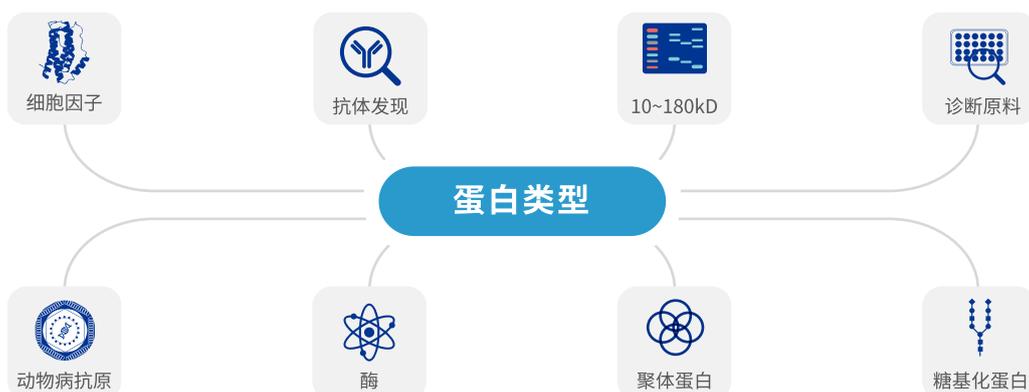


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

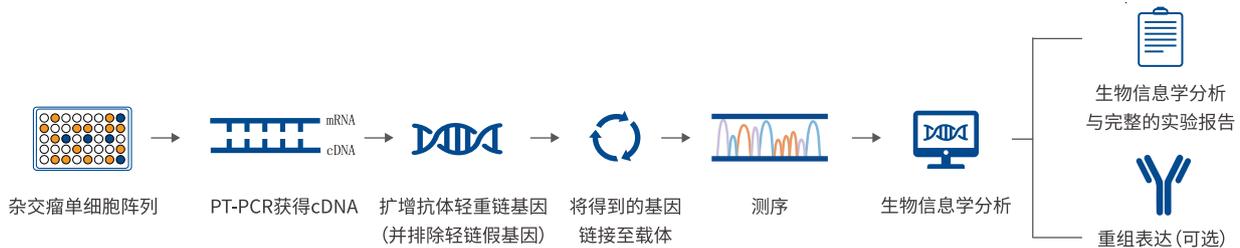
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



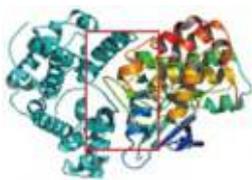
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

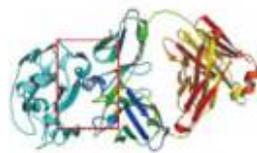
检测范围



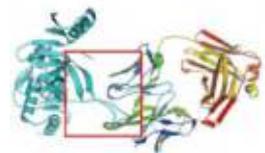
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。

6

Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking

7

Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

| | 有限稀释法筛选 | DeepLight® On-chip筛选 |
|---------|---------|----------------------|
| 筛选时间 | 8周 | 1天 |
| 细胞分离效率 | 低 | 高 |
| 筛选通量 | 低 | 高 |
| 单细胞水平筛选 | 否 | 是 |

服务流程



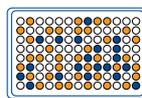
基因合成&质粒抽提



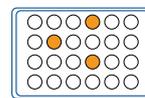
稳定转染



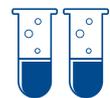
On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L