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℃时恢复活性，指导扩增。

4. 巢式 PCR

采用巢式 PCR 进行扩增，在多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

更多优质服务推荐

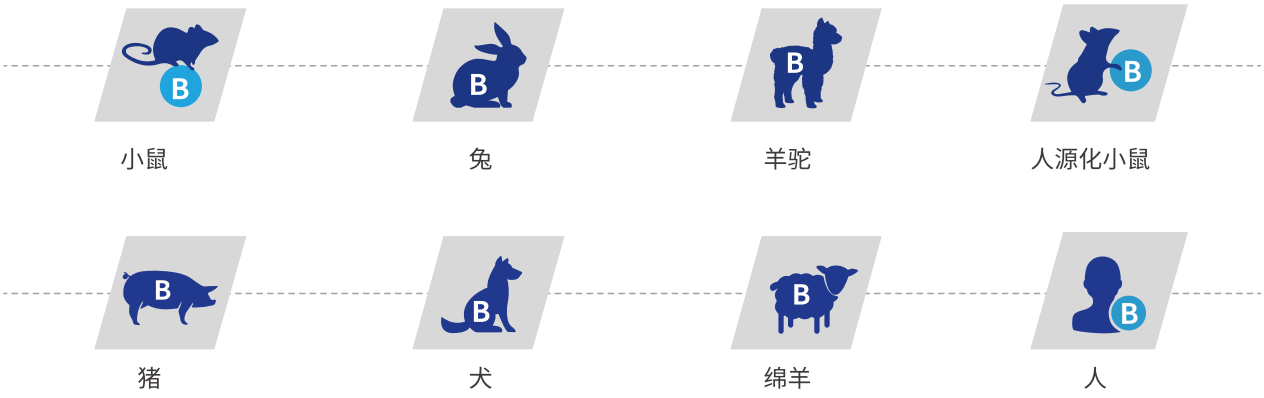
① SingleB® mAb Discovery Service
SingleB®单B细胞快速单抗发现

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。

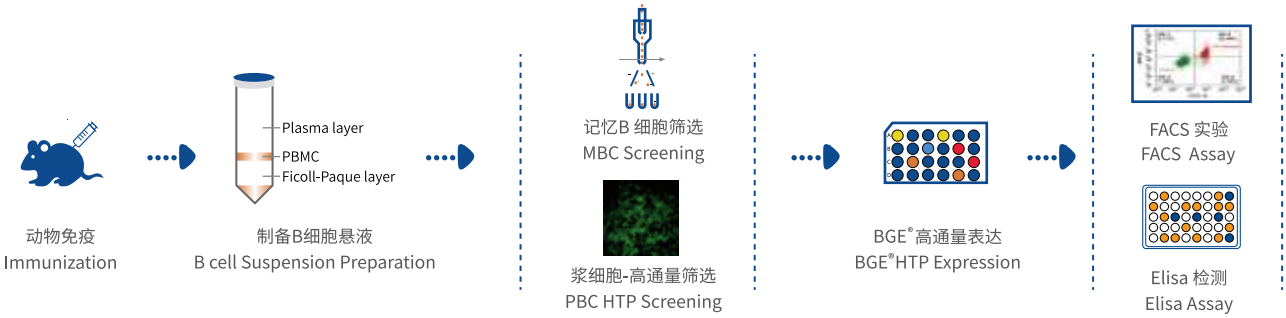
平台优势

- 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



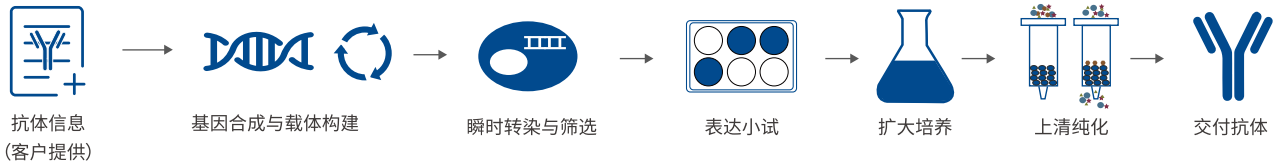
Recombinant Antibody Expression Service

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

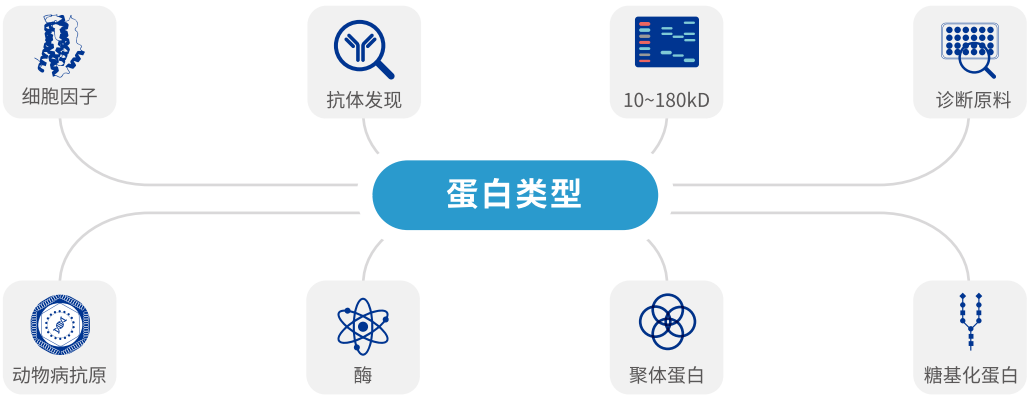


Recombinant Protein Expression Service

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。

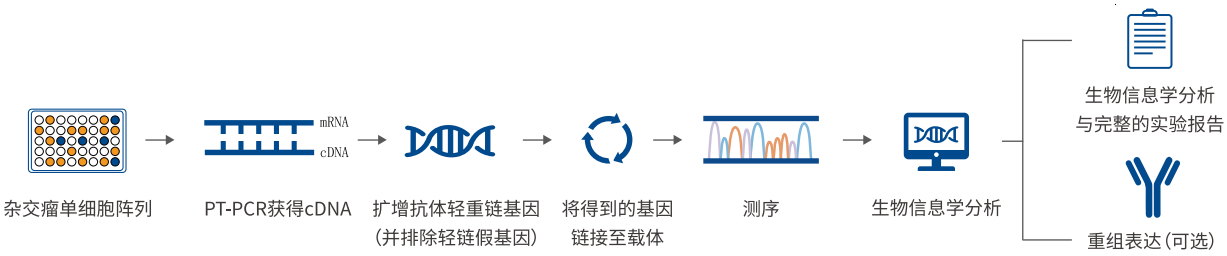
应用场景

- 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，能够实现对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

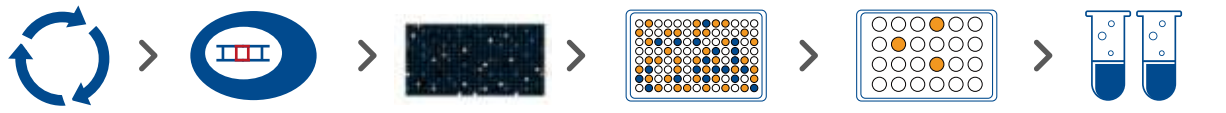
7 Stable Cell Line Development Service
生产型稳转细胞株构建

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	百k级筛选通量	可视化筛选结果	稳定高产
从DNA到细胞株 较传统方法快近100天	一次筛选640k细胞 优选高表达细胞株	先进DeepLight®平台 高表达细胞株实时成像	可稳定转代50代 重组单抗可达5 g/L