

PCR 解决方案

1. PCR 原理

PCR 是一种能够在短时间内实现将单个 DNA 分子扩增数百万倍的生化过程。其扩增过程包括三个连续步骤：变性，退火，延伸。

2. 设计引物需要考虑的参数

引物是决定 PCR 反应成败的最重要因素之一。引物设计主要考虑因素为：特异性和扩增效率。

- 特异性是由错配的频率决定。特异性差的引物易产生不需要的扩增产物。
- 扩增效率是指引物以每循环增加两倍扩增产物的最优能力。

引物	原则
长度	引物的最佳长度为 24 或 25 个碱基左右。但是如果需要调整 Tm 值，引物的长度可以控制在 21 至 28 个碱基之间。当扩增≥10 kb 长片段时，25- 35 个碱基之间的引物可以提供更好的结果。
碱基含量	GC 含量含量为 40% -60%为宜。
3'端	如果引物过短，在 3'端具有四个 G 和/或 C 碱基可能会有帮助，尤其是用于扩增样品中的所有 cDNA 或 gDNA 的通用引物，但添加这些碱基可能增加基因特异性引物的非特异性扩增。 特别注意引物不能互补，尤其是在 3'末端，防止一对引物内的同源性。 自身互补性（如，在上游引物内）可导致发夹结构的形成，发夹结构可在茎部有四个 G/C 碱基对和环内有三个碱基时形成。 注意: PCR 的产量通常取决于 PCR 引物的 3'端。引物间形成二聚体会降低扩增效率。
Tm	如果按公式 $Tm=4^{\circ}C * (G+C) +2^{\circ}C * (A+T)$ 估计引物的 Tm 值，则有效引物的 Tm 为 68-70°C。 设计引物的 Tm 值在 68-70°C之间。虽然这不是绝对必要的，但是使用严格的 PCR 条件（如：“touchdown PCR”和“两步法 PCR”）可以提高引物的特异性。
序列特异性	引物应该对要扩增的目的基因有特异性。 BLAST 搜索可以用来寻找同源性区域。
重复碱基	引物中二核苷酸重复的最大次数为 4 次(如 ATATATAT)。
Runs	避免长的单个碱基（大于 3 个）重复序列，否则可能造成移码或错配。

3. 计算引物的 Tm 值

引物用 T_m 值来评价 DNA-DNA 杂交链稳定性, 过高的退火温度会导致引物-模板杂交不足, 导致 PCR 产物产率低, 而退火温度过低可能导致非特异性产物扩增。

不超过 20 个碱基的引物 T_m 值计算使用如下 Wallace 法则: $T_m = 2^\circ\text{C} (A+T) + 4^\circ\text{C} (G+C)$

超过 20 个碱基的引物 T_m 值计算可使用引物设计软件, 比如 Primer3。

4. 引物使用原则

PCR 反应使用的引物纯化:

标准脱盐引物能满足大多数 PCR 应用。

PCR 反应使用的引物浓度:

每种引物的 PCR 反应最终浓度应在 0.1 至 0.5 μM 之间。

注: 过高的引物浓度会增加错配的可能, 这可能导致非特异性扩增。过低的引物浓度则可能导致扩增效率低。

简并性引物对 PCR 扩增的影响:

通常一条引物中简并的碱基不要超过 4 处。

注: 简并的碱基数过多, 则会造成反应体系中有效引物相对的较少, 应适当增加引物的使用量。但引物量过大, 容易引起非特异扩增。

5. PCR 反应的最适模板添加量

通常最适模板添加量取决于模板的复杂程度和目的基因拷贝数。25-30 个循环, 可以检测到约 10^4 拷贝的目的基因序列。

DNA	分子数	模板推荐量
1 μg 人类基因组	约 3.04×10^5 DNA 分子	30-100 ng
1 μg 大肠杆菌基因组	约 2×10^8 DNA 分子	100 pg-1 ng
1 μg λ DNA	1.9×10^{10} DNA 分子	100 pg-500 pg
cDNA	--	>10pg

注: 高拷贝的目的序列 (如管家基因), 只需 10 ng 的模板。

复杂模板添加量范围在 10 ng 至 500 ng 之间。

非所有的聚合酶都能耐受过量的模板。

6. 高 GC 模板的 PCR 扩增需要注意什么?

- GC 含量超过 65% 的模板被认为是 GC-rich 模板。
- 高 GC 的基因序列区域容易形成反向重复, 或发夹结构, 使 PCR 退火过程不能顺利进行。因此, 高

GC 会使 DNA 链分离效率低，导致 GC-rich 模板的扩增比较困难。

➤ 使用 Tm 值较高的引物(>68°C)，因为退火可以在较高的温度下进行。

扩增高 GC 模板需注意：

- 使用较高的变性温度(如 98°C，而非 94°C 或 95°C)，以允许模板完全变性。
- 尽量缩短高 GC 模板的退火时间。

通过向反应中添加 DMSO，可以提高 GC 模板或复杂模板的扩增效果。DMSO 的推荐终浓度在 1% 到 5% 之间。相反，有些模板可能有很长的 AT-rich 延伸序列，在标准反应条件下很难扩增，可以使用较低的延伸温度（如，延伸温度从 72°C 降至 65-60°C，DNA 仍可扩增）。

7. 长 DNA 片段扩增需注意哪些因素？

模板质量：

DNA 完整性对于长 DNA 片段的扩增非常重要。DNA 损伤（如 DNA 断裂、DNA 脱嘌呤）导致产生大量不完整扩增产物，降低扩增量。

PCR 条件：

- 变性时间应保持在最低限度，以减少脱嘌呤。
- 使用 touchdown PCR：在较高的退火温度下开始，持续几个循环以后，每循环减少 1-2°C 退火温度。
- 设计 Tm 值高于 68°C 的引物。

8. 如何优化 PCR 反应？

预变性：

有时需要预热使复杂模板变性（如基因组 DNA）。通常 94°C 一分钟足以使其变性。过度热处理可能会降低酶活性或使酶失活。

变性：

应根据您选择的酶试剂选择变性条件，通常使用 94-95°C，30 秒或 98°C，10 秒。

注：温度过高或变性时间过长可能会导致酶失活和/或长片段模板的损伤

退火：

退火条件应针对每对引物的 Tm 值进行优化。

注：使用过低的退火温度可能导致错配和非特异性扩增，从而导致目的产物收率较低。

过长的退火时间可能会导致错配--诱导的非特异性扩增。

延伸：

一般来说，建议延伸时间为 30-60 sec/kb。

注：扩增小于 1 kb DNA 时，推荐使用三步法 PCR。

高 GC 序列或长片段扩增(>10 kb)，推荐采用两步法 PCR。

9. PCR 反应选择两步法，还是选择三步法？

两步法 PCR 包括变性和合并退火/延伸步骤。当引物 T_m 值接近延伸温度（72℃）或稍低一些，考虑使用两步法 PCR。

三步法 PCR 包括变性、退火和延伸步骤。当引物的 T_m 值低于延伸温度或小于 68℃时，推荐使用三步法。

10. 使用 PCR 酶时应注意哪些方面？

使用目的：

普通 Taq DNA 聚合酶保真度较低，扩增复制的模板，通常直接用以检测，不用于克隆构建。

高保真 DNA 聚合酶的保真度较高，能够准确复制模板，或者在引物的 3'端加入正确的核苷酸，产生平末端产物，具有校正活性。通常被用于基因克隆、蛋白质表达、蛋白质结构功能研究、cDNA 文库构建和下一代测序。

使用过程：

每次取酶时，必须使用一个新的、干净的枪头。

吸取酶时，将枪头的末端置于液体中合适的位置，使其能刚好获得所需的酶量。

注：枪头的尖端不应完全浸入酶溶液中，因为尖端的外部会被酶粘附，从而妨碍了准确量取并且会浪费酶。

11. 如何将平滑末端 PCR 产物克隆到 TA 克隆载体中？

- 纯化 PCR 产物。在添加 A 尾之前，用 PCR 纯化试剂盒对 PCR 产物进行纯化，去除反应中所有的聚合酶是非常重要的。

注：任何残留的 DNA 聚合酶的校正活性都会降解 A 尾。

- 加 A 反应体系

名称	体积 (μl)
纯化后的 PCR 产物	若干
dATP (10 mM)	1
10X PCR buffer with Mg^{2+}	5
Taq DNA polymerase (5 U/μl)	0.2
ddH ₂ O	To 50μl

- 在 72℃ 孵育 30 分钟，纯化回收后进行 TA 克隆。

注：为了获得最佳的连接效率，最好使用新鲜的 PCR 产物，长时间保存会使 3' 端 A 尾会逐渐消失。

12. PCR 引入突变有哪些因素？

DNA 聚合酶可以引入不同类型的突变，包括单碱基替换、缺失和插入。碱基替换通常是由 DNA 合成

过程中不正确的 dNTP 的错误插入引起的。突变的频率可能与序列有关。

- **不平衡 dNTP 浓度：**浓度不一致的四种 dNTPs 可以增加 8 倍的碱基替换可能。
- **高的酶浓度**
- **长时间孵育**
- **缺少 3'→5'外切酶活性**
- **镁离子浓度：**当 Mg^{2+} 浓度与 dNTPs 总浓度相等时，保真度最高。保真度随着游离的二价阳离子浓度的增加而降低。
- **反应 pH：**反应体系的 pH 值降低 3 个单位可以使碱基替换量增加 60 倍（低 pH 值(<6.0)可导致自发性嘌呤遗失）。
- **DNA 损伤：**DNA 损伤可以在高温下发生，可能会增加突变的速度。一个常见的突变是胞嘧啶脱氨生成尿嘧啶。
- **引物序列中存在的 A 延伸**
- **过度循环：**在最终的 PCR 循环中，DNA 浓度增加时，错误率增加。总循环数应保持在最低限度，以扩增出正确目的 PCR 产物。

13. PCR 过度循环？

PCR 过度循环是指循环超过扩增的指数阶段。

发生过度循环的因素：

- 底物耗尽(dNTPs 或引物)
- 试剂在变性温度下不再稳定
- PCR 聚合酶受到产物(焦磷酸盐、双链 DNA)的抑制
- 非特异性产物对试剂(dNTPs 和引物)的竞争
- 反应的 pH 值降低
- 产物在高浓度下的不完全变性/链分离等

琼脂糖凝胶上检测显示：PCR 过度循环产物出现强烈的拖尾，条带难以区分。建议进行预试验，以确定生产足够产物所需的最少 PCR 循环数。

14. 如果存在非特异性扩增条带，如何提高产物特异性？

- 使用 BLAST 确定引物的 3'端是否有与目标位点以外的位点互补，可重新设计引物或调整 PCR 条件。
- 完善 PCR 反应条件：设置梯度退火温度和退火时间；减少 PCR 循环数；使用 touchdown PCR；改为两步法 PCR
- 调整模板用量

15. 如果 PCR 产生错误，应该怎么办？

➤ 为了避免 PCR 过程中的错误，建议使用高保真酶。

避免以下影响因素：

过度循环：过度循环 PCR 反应经常会出现。

注：影响 pH 值，导致错误的发生

增加 PCR 产物的量，从而降低聚合酶的效率，导致错误的发生

降低了 dNTP 的数量，体系中不用浓度的 dNTP 导致的碱基配对错误的的可能性。

Mg²⁺浓度过高：使用高浓度的 Mg²⁺可以提高产量，但也会影响酶的校正活性。PCR 体系中 Mg²⁺浓度应该始终高于 dNTP 浓度。

模板 DNA 损伤：在分析或切胶回收 PCR 产物时，尽量缩短紫外线照射时间。

16. PCR 扩增无目的条带产生的原因？

PCR 反应的关键环节：①模板核酸的制备；②引物的质量与特异性；③酶的质量；④PCR 条件。

模板：

a. 模板中含有杂蛋白质，特别是染色体中的组蛋白。b. 模板中含有 Taq 酶抑制剂。c. 模板核酸变性不彻底。d. 选择质量可靠的提取试剂。e. 靶序列变异。

如靶序列发生突变，影响引物与模板特异性结合，或因靶序列某段缺失使引物与模板失去互补序列，导致 PCR 不能有效扩增。

引物：

a. 引物设计不合理，如引物长度不够、引物之间形成二聚体等，需要重新设计引物。

b. 合成高质量、高纯度级别的引物。c. 引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期 4℃保存，导致引物降解失效。

酶失活：需更换新酶，或新旧两种酶同时使用，以分析是否因酶的活性丧失或活性降低而导致没有产物。

PCR 条件：

a. PCR 扩增条件：变性对 PCR 扩增相当重要，如变性温度低、变性时间短都有可能出现扩增无产物；退火温度过低，可导致非特异性扩增而降低特异性扩增效率；退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。b. Mg²⁺浓度：Mg²⁺浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高会降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败。c. 反应体系：通常在进行 PCR 时需要先摸索条件。

17. PCR 产物电泳出现拖尾现象（“Smear”），该如何改善结果？

使用阳性和阴性（无模板）对照来确定拖尾的来源。如果阴性对照为空白，则无污染。如果阴性对照也出现拖尾，则存在污染，需要确定这种污染的来源。

引物设计不合理或 PCR 条件不理想产生的，或过度循环产生。

优化以下条件：a. 减少模板添加量；b. 提高退火温度；c. 使用 touchdown PCR；d. 减少 PCR 循环数；

e. 重新设计引物；d. 重新扩增 PCR 产物。

18. PCR 扩增出现假阳性的原因？

假阳性条带与目的序列条带大小一致，有时其条带更整齐，亮度更高，

原因：

引物设计不合理： a. 选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，扩增出的 PCR 产物为非目的性序列。

b. 靶序列或引物太短，出现假阳性。

出现污染： a. 交叉污染。b. 空气中的核酸污染。

19. 如何进行污染检测？

须设计对照实验

阳性对照： PCR 反应都应设有 PCR 阳性对照。

注：阳性对照是重组质粒及高浓度阳性样品，添加量不要过多。

阳性对照对检测或扩增样品污染的可能性很大，操作时一定要分区操作。

阴性对照： 每次 PCR 实验务必做阴性对照，即在 PCR 试剂中不添加模板 DNA 或 RNA，直接进行 PCR 扩增，从 PCR 扩增的结果判断试剂是否有污染。

引物： 选择不同区域的引物进行 PCR 扩增，排除引物还是其他试剂的污染。