

关于常见问题分析 及解决策略

PCR技术简介

PCR常见问题、原因分析及其解决方案

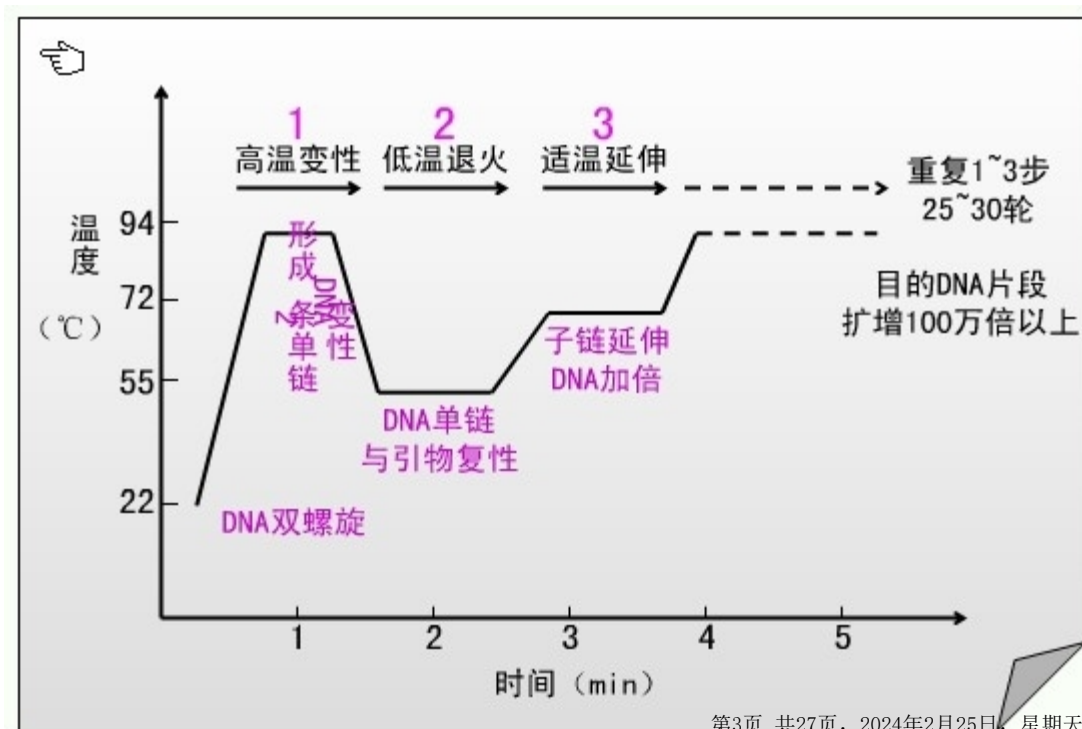
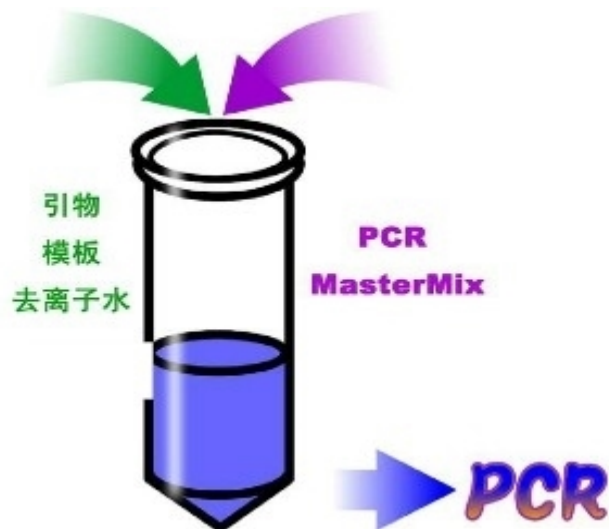
提高PCR反应特异性的策略

定量PCR常见问题

临床PCR检测的常见问题

PCR标准反应体系

- DNA模板
- 引物
- 反应缓冲液
- Mg^{2+} 浓度
- dNTPs
- dH₂O
- 耐热聚合酶



反应体系对PCR扩增的影响

DNA模板

纯度	蛋白、多糖、酚类等杂质会抑制PCR反应
完整性	模板降解会导致PCR扩增无产物
浓度	加量过多导致非特异性扩增增加

引物

特异性	长度适当、避免二级结构和二聚体
完整性	避免反复冻融
浓度	应适当,过高导致非特异性增加, 过低则扩增产物太少

反应体系对PCR扩增的影响

反应缓冲液

- pH值,盐离子浓度
- 稳定剂,增强剂

Mg²⁺浓度

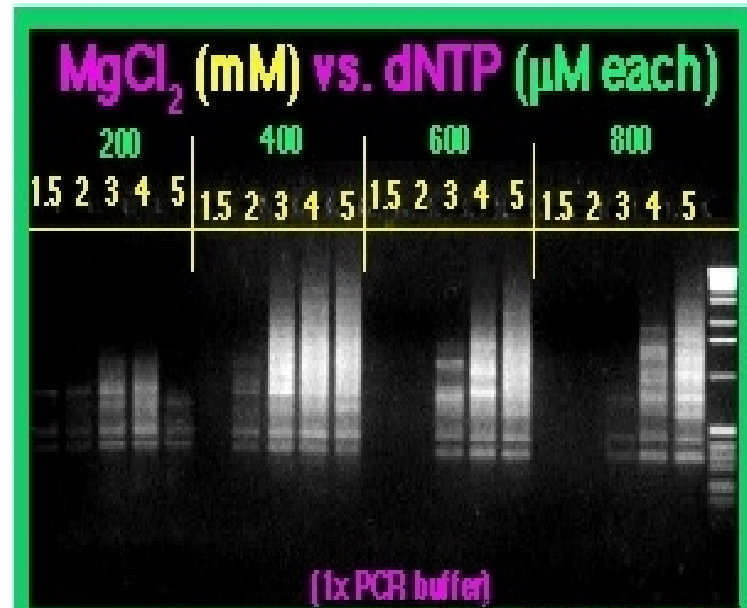
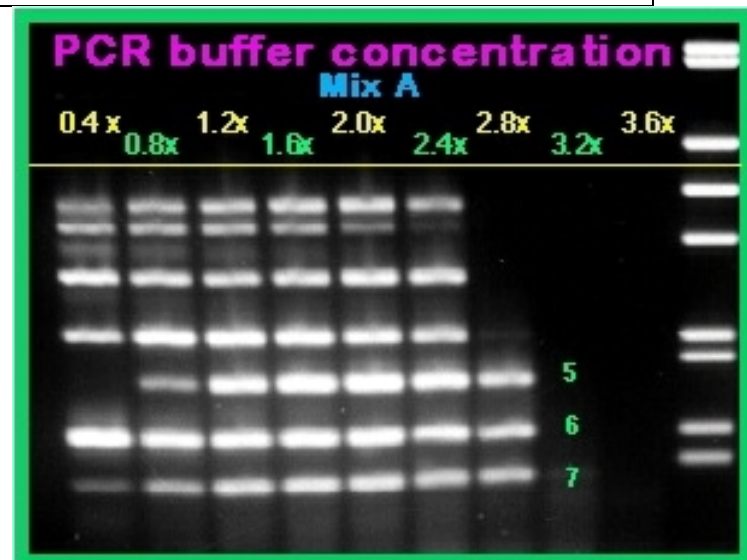
- 过高非特异性严重
- 过低无扩增产物

dNTPs

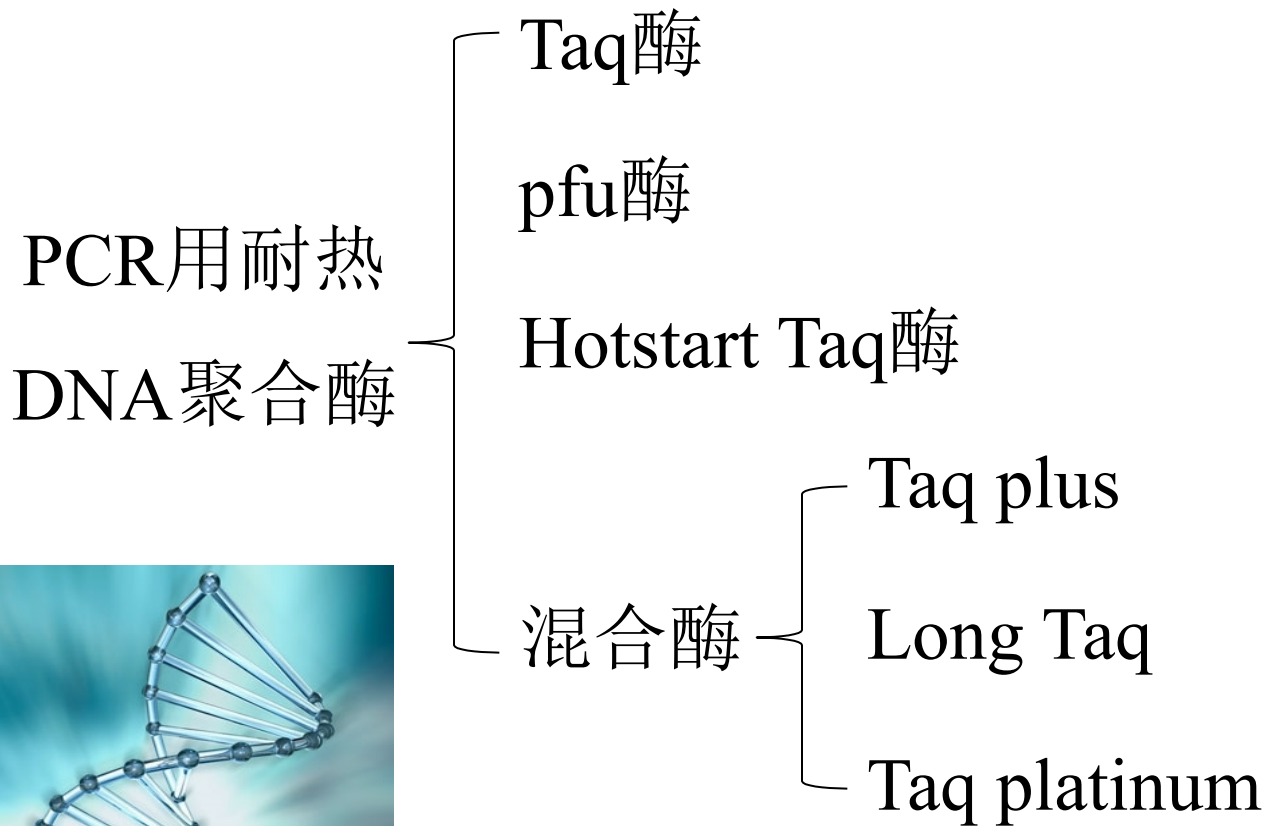
- 浓度适当
- 避免反复冻融

dH₂O

- pH值适当
- 避免污染



如何选择最合适的DNA聚合酶



如何选择最合适的DNA聚合酶

-----根据PCR实验需求

特异性-----基因组扩增、RT-PCR

保真性-----基因筛选、测序、克隆

长片段扩增-----构建基因图谱、测序等

扩增效率-----复杂模板扩增（GC含量高、二级结构）

PCR试剂盒-----复杂模板扩增、大规模基因检测

PCR常见问题之一-----无扩增产物

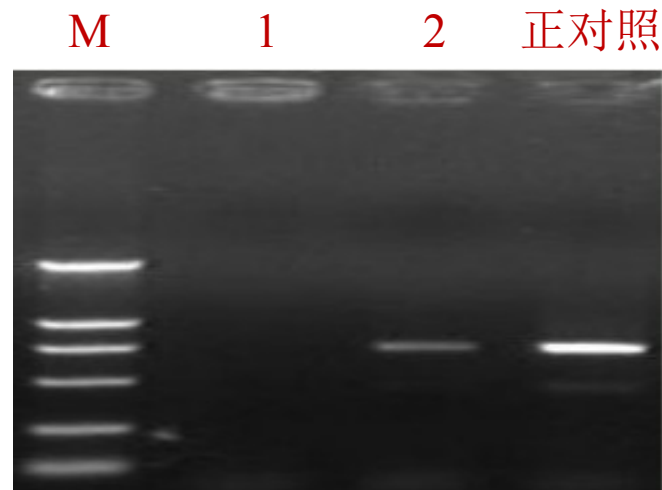
现象：正对照有条带，而样品则无

原因

- 模板含有抑制物，含量低
- Buffer对样品不合适
- 引物设计不当或者发生降解
- 反应条件：退火温度太高，延伸时间太短

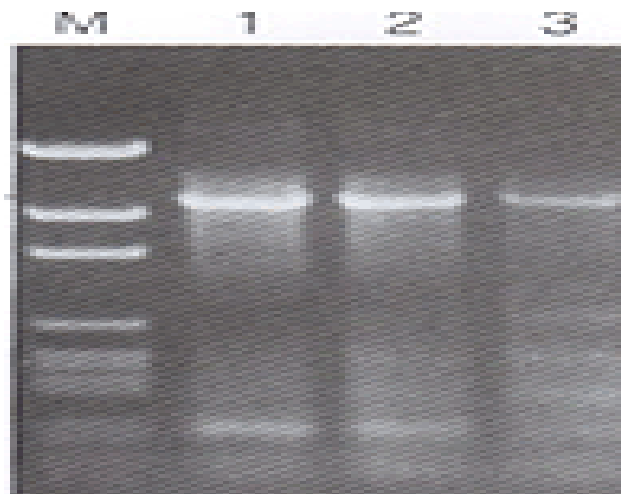
对策

- 纯化模板或者使用试剂盒提取模板DNA或加大模板的用量
- 更换Buffer或调整浓度
- 重新设计引物（避免链间二聚体和链内二级结构）或者换一管新引物
- 降低退火温度、延长延伸时间



PCR常见问题之二-----非特异性扩增

现象： PCR扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。



原因

- 引物特异性差
- 模板或引物浓度过高
- 酶量过多
- Mg^{2+} 浓度偏高
- 退火温度偏低
- 循环次数过多

对策

- 重新设计引物或者使用巢式PCR
- 适当降低模板或引物浓度
- 适当减少酶量
- 降低镁离子浓度
- 适当提高退火温度或使用二阶段温度法
- 减少循环次数

PCR常见问题之三-----拖尾

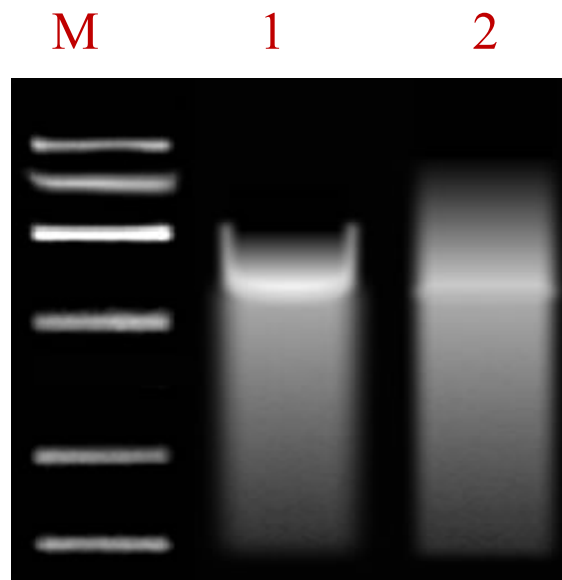
现象：产物在凝胶上呈Smear状态

原因

- 模板不纯
- Buffer不合适
- 退火温度偏低
- 酶量过多
- dNTP、 Mg^{2+} 浓度偏高
- 循环次数过多

对策

- 纯化模板
- 更换Buffer
- 适当提高退火温度
- 适量用酶
- 适当降低dNTP和镁离子的浓度
- 减少循环次数



PCR常见问题之四-----假阳性

现象：空白对照出现目的扩增产物

原因

靶序列或扩增产物的交叉污染

对策

- 操作时应小心轻柔，防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外；
- 除酶及不能耐高温的物质外，所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及加样枪头等均应一次性使用。
- 各种试剂最好先进行分装，然后低温贮存。

提高PCR反应特异性策略

- **巢式PCR (Nest-PCR)**
- **递减PCR (TouchDown PCR)**
- **热启动PCR (HotStart PCR)**
- **使用PCR增强剂**

策略之一巢式PCR



- 巢式PCR的使用降低了扩增多个靶位点的可能性，因为同多套引物都互补的靶序列很少。
- 巢式PCR可以增加有限量靶序列（如稀有mRNA）的灵敏度，并且提高了困难PCR（如5' RACE）的特异性。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/106041241031010122>