

# PCR 常见问题总汇

## 一、PCR 产物的电泳检测时间

一般为48h 以内，有些最好于当日电泳检测，大于48h 后带型不规则甚致消失。

## 二、假阴性，不出现扩增条带

PCR 反应的关键环节有①模板核酸的制备，②引物的质量与特异性，③酶的质量及，④PCR 循环条件。寻找原因亦应针对上述环节进行分析研究。

模板：①模板中含有杂蛋白质，②模板中含有 Taq 酶抑制剂，③模板中蛋白质没有消化除净，特别是染色体中的组蛋白，④在提取制备模板时丢失过多，或吸入酚。⑤模板核酸变性不彻底。在酶和引物质量好时，不出现扩增带，极有可能是标本的消化处理，模板核酸提取过程出了毛病，因而要配制有效而稳定的消化处理液，其程序亦应固定不宜随意更改。

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不够而导致假阴性。需注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

引物：引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称，是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题，两条引物一条浓度高，一条浓度低，造成低效率的不对称扩增，对策为：①选定一个好的引物合成单位。②引物的浓度不仅要看 OD 值，更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳，一定要有引物条带出现，而且两引物带的亮度应大体一致，如一条引物有条带，一条引物无条带，此时做 PCR 有可能失败，应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高，一条亮度低，在稀释引物时要平衡其浓度。③引物应高浓度小量分装保存，防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分，导致引物变质降解失效。④引物设计不合理，如引物长度不够，引物之间形成二聚体等。

Mg<sup>2+</sup>浓度：Mg<sup>2+</sup>离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大，浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性，浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

反应体积的改变：通常进行 PCR 扩增采用的体积为20ul、30ul、50ul。或100ul，应用多大体积进行 PCR 扩增，是根据科研和临床检测不同目的而设定，在做小体积如20ul 后，再做大体积时，一定要摸索条件，否则容易失败。

物理原因：变性对 PCR 扩增来说相当重要，如变性温度低，变性时间短，极有可能出现假阴性；退火温度过低，可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。有时还有必要用标准的温度计，检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度，这也是 PCR 失败的原因之一。

靶序列变异：如靶序列发生突变或缺失，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，其 PCR 扩增是不会成功的。

## 假阳性

出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致，有时其条带更整齐，亮度更高。

引物设计不合适：选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性，因而在进行 PCR 扩增时，扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短，容易出现假阳性。需重新设计引物。

靶序列或扩增产物的交叉污染：这种污染有两种原因：一是整个基因组或大片段的交叉污染，导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决：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。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。必要时，在加标本前，反应管和试剂用紫外线照射，以破坏存在的核酸。二是空气中的小片段核酸污染，这些小片段比靶序列短，但有一定的同源性。可互相拼接，与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生，可用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

## 出现非特异性扩增带

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。非特异性条带的出现，其原因：一是引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。二是  $Mg^{2+}$  离子浓度过高、退火温度过低，及 PCR 循环次数 过多有关。其次是酶的质和量，往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶 则不出现，酶量过多有时也会出现非特异性扩增。其对策有：必要时重新设计引 物。减低酶量或调换另一来源的酶。降低引物量，适当增加模板量，减少循环次 数。适当提高退火温度或采用二温度点法 (93℃ 变性，65℃ 左右退火与延伸)。

## 出现片状拖带或涂抹带

PCR 扩增有时出现涂抹带或片状带或地毯样带。其原因往往由于酶量过多或酶的质量差，dNTP 浓度过高， $Mg^{2+}$  浓度过高，退火温度过低，循环次数过多引起。其对策有：减少

酶量，或调换另一来源的酶。②减少 dNTP 的浓度。适当降低 Mg<sup>2+</sup>浓度。增加模板量，减少循环次数。

## 克隆 PCR 产物

1) 克隆 PCR 产物的最优条件是什么？

最佳插入片段：载体比需实验确定。1: 1（插入片段：载体）常为最佳比，摩尔数比1: 8或8: 1也行。应测定比值范围。连接用5ul 2X 连接液，50ng 质粒 DNA, 1 Weiss 单位的 T4 连接酶，插入片段共10ul。室温保温1小时，或4℃过夜。在这2种温度下，缺 T-凸出端的载体会自连，产生蓝斑。室温保温1小时能满足大多数克隆要求，为提高连接效率，需4℃过夜。

2) PCR 产物是否需要用凝胶纯化？

如凝胶分析扩增产物只有一条带，不需要用凝胶纯化。如可见其他杂带，可能是积累了大量引物的二聚体。少量的引物二聚体的摩尔数也很高，这会产生高比例的带有引物二聚体的克隆，而非目的插入片段。为此需在克隆前做凝胶纯化。

3) 如果没有回收到目的片段，还需要作什么对照实验？

A) 涂布未转化的感受态细胞。

如有菌落，表明氨苄失效，或污染上带有氨苄抗型的质粒，或产生氨苄抗型的菌落。

B) 转化完整质粒，计算菌落生长数，测定转化效率。

例如，将1ug/ul 质粒1:100稀释，1ul 用于100ul 感受态细胞转化。用 SOC 稀释到1000ul 后，用100ul 铺板。培养过夜，产生1000个菌落。转化率为：产生菌落的总数/铺板 DNA 的总量。铺板 DNA 的总量是转化反应所用的量除以稀释倍数。具体而言转化用10ng DNA，用 SOC 稀释到1000u 后含10 ng DNA，用1/10铺板，共用1 ng DNA。转化率为：

$1000 \text{ 克隆} \times 10^{-3} \text{ (3次方)} \text{ ng / 铺板} 1 \text{ ng DNA} \text{ ug} = 10^{-6} \text{ (6次方)} \text{ cfu/ ug}$

转化 pGEM-T 应用  $10^{-8} \text{ (8次方)} \text{ cfu/ ug}$  感受态细胞

如没有菌落或少有菌落，感受态细胞的转化率太低。

C) 如用 pGEM-T 正对照，或 PCR 产物，产生 >20-40 蓝斑（用指定步骤  $10^{-8} \text{ (8次方)} \text{ cfu/ ug}$  感受态细胞），表明载体失去 T。可能是连接酶污染了核酸酶。T4 DNA 连接酶（M1801，M1804，M1794）质量标准好无核酸酶污染，不应用其它来源的 T4 DNA 连接酶替换。

D) 用 pGEM-T 或 pGEM-T Easy 载体，连接 pGEM-T 正对照，转化高频率感受态细胞（ $10^{-8}$

次方) cfu/ug), 按照指定的实验步骤, 可得100个菌落, 其中60%应为白斑, 如产生>20-40蓝斑, 没有菌落或少有菌落, 连接有问题。

4) 对照实验结果好, 却没有回收到目的片段, 实验出了什么问题?

A) 连接用室温保温1小时, 能满足大多数克隆, 为提高效率, 需4℃过夜。

B) 插入片段带有污染, 使3'-T 缺失, 或抑制连接, 抑制转化。为此, 将插入片段和 pGEM-T 正对照混合, 再连接。如降低了对照的菌落数, 插入片段需纯化, 或重新制备。如产生大量的蓝斑, 插入片段污染有核酸酶, 使 pGEM-T 或 pGEM-T Easy 载体3'-T 缺失。

C) 插入片段不适于连接。用凝胶纯化的插入片段, 因受 UV 过度照射, 时有发生。UV 过度照射会产生嘧啶二聚体, 不利于连接, DNA 必需重新纯化。

D) 带有修复功能的耐热 DNA 聚合酶的扩增产物末端无 A, 后者是 pGEM-T 或 pGEM-T Easy 载体克隆所需。加 Taq DNA 聚合酶和核苷酸可在末端加 A。详情查 pGEM-T pGEM-T Easy 载体技术资料 (TM042)。

E) 高度重复序列可能会不稳定, 在扩增中产生缺失和重排, 如发现插入片段高频率地产生缺失和重排, 需用重组缺陷大肠杆菌菌株, 如 SURE 细胞

## PCR 反应体系与反应条件

标准的 PCR 反应体系:

10× 扩增缓冲液	10u1
4种 dNTP 混合物	各200umol/L
引物	各10~100pmol
模板 DNA	0.1~2ug
Taq DNA 聚合酶	2.5u
Mg <sup>2+</sup>	1.5mmol/L
加双或三蒸水至	100u1

**PCR 反应五要素:** 参加 PCR 反应的物质主要有五种即引物、酶、dNTP、模板和 Mg<sup>2+</sup>

引物: 引物是 PCR 特异性反应的关键, PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。理论上, 只要知道任何一段模板 DNA 序列, 就能按其设计互补的寡核苷

酸链做引物，利用 PCR 就可将模板 DNA 在体外大量扩增。

设计引物应遵循以下原则：

- ①引物长度： 15-30bp，常用为20bp 左右。
- ②引物扩增跨度： 以200-500bp 为宜，特定条件下可扩增长至10kb 的片段。
- ③引物碱基： G+C 含量以40-60%为宜， G+C 太少扩增效果不佳， G+C 过多易出现非特异条带。ATGC 最好随机分布，避免5个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列。
- ④避免引物内部出现二级结构，避免两条引物间互补，特别是3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异的扩增条带。
- ⑤引物3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应严格要求配对，以避免因末端碱基不配对而导致 PCR 失败。
- ⑥引物中有或能加上合适的酶切位点， 被扩增的靶序列最好有适宜的酶切位点， 这对酶切分析或分子克隆很有好处。
- ⑦引物的特异性： 引物应与核酸序列数据库的其它序列无明显同源性。引物量： 每条引物的浓度0.1~1umol 或10~100pmol， 以最低引物量产生所需要的结果为好， 引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增， 且可增加引物之间形成二聚体的机会。

酶及其浓度 目前有两种 Taq DNA 聚合酶供应， 一种是从栖热水生杆菌中提纯的天然酶， 另一种为大肠菌合成的基因工程酶。催化一典型的 PCR 反应约需酶量2.5U(指总反应体积为100ul 时)， 浓度过高可引起非特异性扩增， 浓度过低则合成产物量减少。

dNTP 的质量与浓度 dNTP 的质量与浓度和 PCR 扩增效率有密切关系， dNTP 粉呈颗粒状， 如保存不当易变性失去生物学活性。dNTP 溶液呈酸性， 使用时应配成高浓度后， 以1M NaOH 或1M Tris. HCL 的缓冲液将其 PH 调节到7.0~7.5， 小量分装， -20℃ 冰冻保存。多次冻融会使 dNTP 降解。在 PCR 反应中， dNTP 应为50~200umol/L， 尤其是注意4种 dNTP 的浓度要相等( 等摩尔配制)， 如其中任何一种浓度不同于其它几种时( 偏高或偏低)， 就会引起错配。浓度过低又会降低 PCR 产物的产量。dNTP 能与 Mg<sup>2+</sup> 结合， 使游离的 Mg<sup>2+</sup>浓度降低。

模板(靶基因)核酸 模板核酸的量与纯化程度， 是 PCR 成败与否的关键环节之一， 传统的 DNA 纯化方法通常采用 SDS 和蛋白酶 K 来消化处理标本。SDS 的主要功能是：

溶解细胞膜上的脂类与蛋白质，因而溶解膜蛋白而破坏细胞膜，并解离细胞中的核蛋白，SDS 还能与蛋白质结合而沉淀；蛋白酶 K 能水解消化蛋白质，特别是与 DNA 结合的组蛋白，再用有机溶剂酚与氯仿抽提掉蛋白质和其它细胞组份，用乙醇或异丙醇沉淀核酸。提取的核酸即可作为模板用于 PCR 反应。一般临床检测标本，可采用快速简便的方法溶解细胞，裂解病原体，消化除去染色体的蛋白质使靶基因游离，直接用于 PCR 扩增。RNA 模板提取一般采用异硫氰酸胍或蛋白酶 K 法，要防止 RNase 降解 RNA。

**Mg<sup>2+</sup>浓度** Mg<sup>2+</sup>对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响，在一般的 PCR 反应中，各种 dNTP 浓度为200umol/L 时，Mg<sup>2+</sup>浓度为1.5~2.0mmol/L 为宜。Mg<sup>2+</sup>浓度过高，反应特异性降低，出现非特异扩增，浓度过低会降低 Taq DNA 聚合酶的活性，使反应产物减少。

### PCR 反应条件的选择

PCR 反应条件为温度、时间和循环次数。

**温度与时间的设置：**基于 PCR 原理三步骤而设置变性-退火-延伸三个温度点。在标准反应中采用三温度点法，双链 DNA 在90~95℃变性，再迅速冷却至40~60℃，引物退火并结合到靶序列上，然后快速升温至70~75℃，在 Taq DNA 聚合酶的作用下，使引物链沿模板延伸。对于较短靶基因(长度为100~300bp 时)可采用二温度点法，除变性温度外、退火与延伸温度可合二为一，一般采用94℃变性，65℃左右退火与延伸(此温度 Taq DNA 酶仍有较高的催化活性)。

①**变性温度与时间：**变性温度低，解链不完全是导致 PCR 失败的最主要原因。一般情况下，93℃~94℃min 足以使模板 DNA 变性，若低于93℃则需延长长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或 PCR 产物完全变性，就会导致 PCR 失败。

②**退火(复性)温度与时间：**退火温度是影响 PCR 特异性的较重要因素。变性后温度快速冷却至40℃~60℃，可使引物和模板发生结合。由于模板 DNA 比引物复杂得多，引物和模板之间的碰撞结合机会远远高于模板互补链之间的碰撞。退火温度与时间，取决于引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度。对于20个核苷酸，G+C 含量约50%的引物，55℃为选择最适退火温度的起点较为理想。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：

$$T_m \text{ 值(解链温度)}=4(G+C)+2(A+T)$$

$$\text{复性温度}=T_m \text{ 值}-(5\sim 10^{\circ}\text{C})$$

在  $T_m$  值允许范围内，选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合，提高 PCR 反应的特异性。复性时间一般为 30~60sec，足以使引物与模板之间完全结合。

③延伸温度与时间：Taq DNA 聚合酶的生物学活性：

70~80°C 150核苷酸/S/酶分子

70°C 60核苷酸/S/酶分子

55°C 24核苷酸/S/酶分子

高于90°C时，DNA 合成几乎不能进行。

PCR 反应的延伸温度一般选择在 70~75°C 之间，常用温度为 72°C，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。PCR 延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般 1Kb 以内的 DNA 片段，延伸时间 1min 是足够的。3~4kb 的靶序列需 3~4min；扩增 10Kb 需延伸至 15min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。