PCR技术

1 PCR原理

聚合酶链式反应（**Polymerasechain reaction**，PCR）是一种大量扩增特定DNA片段的体外合成放大技术，它可看作是生物体外的特殊DNA复制，是指在DNA聚合酶催化下，以母链DNA为模板，以特定引物为延伸起点，通过变性、退火、延伸等步骤，体外复制出与母链模板DNA互补的子链DNA的过程。PCR的最大特点是能将微量的DNA大幅增加。它能简单、快速、便宜地扩增感兴趣DNA序列，用于遗传疾病的诊断与检验、基因分离克隆，序列分析，基因表达调控，基因多态性研究等许多方面。

PCR(聚合酶链式反应)是利用DNA在体外95℃高温时发生变性形成单链，低温(经常是60℃左右)时引物与单链按碱基互补配对的原则（A与T，G与C）结合，再调温度至DNA聚合酶最适反应温度(72℃左右)，DNA聚合酶沿着磷酸到五碳糖(5'-3')的方向合成互补链。这个方法依赖与热循环系统，即基于聚合酶制造的PCR仪，能通过反复的加热和冷却反应在变性温度，复性温度，延伸温度之间变换。



**PCR反应体系(50μL为例)：**

|  |  |
| --- | --- |
| Water,  nuclease-free | variable |
| 10X Buffer with  MgSO4 | 5 μL |
| dNTP Mix（2 mM each） | 5 μL (0.2 mM of  each) |
| Forward primer | 0.1-1.0 μM |
| Reverse primer | 0.1-1.0 μM |
| Template DNA | 50 pg - 1 0μg |
| DNA Polymerase | 1.25-2.5 U |
| Total volume | 50 μL |

**PCR反应条件：**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Step | Temperature, °C | Time | Number of cycles |
| Initial  denaturation | 95 | 2-10 min | 1 |
| Denaturation | 95 | 30 s | 25-35 |
| Annealing | Tm-5 | 30 s |
| Extension | 72 | 2 kb / min（pfu）1kb/min(Taq) |
| Final extension | 72 | 5-15 min | 1 |

2 PCR反应的成分和作用

总体积：一般为25μL～100μL 目前均有商品化的DNA聚合酶及配套使用的反应buffer

（一）无Mg2+buffer：由纯水、KCl、Tris（调节pH）组成。KCl可降低退火温度，但不能超过50mmol/L，否则会抑制DNA聚合酶活性。

（二）Mg2+:终浓度为1.5～2.0mmol/L，其对应dNTP为200 μmol/L，由于dNTP与Taq酶竟争Mg2+，当dNTP浓度达到1 mmol/L时会抑制Taq酶的活性。 Mg2+能影响反应的特异性和产率。

（三）BSA：一般用乙酰化的BSA，起着减少PCR管对Taq酶的吸附作用，对Taq酶有保护作用。

（四）底物（dNTPs）：一般存储浓度为 10 mmol/L，各成份以等当量配制，反应终浓度为20～200μmol/L。高浓度可加速反应，但增加错误率和成本；低浓度可提高精确性，但降低反应速度。

（五）Taq酶：耐95℃高温，其最适pH值为8.3～8.5，最适温度为75～80℃，一般用72℃。无3'→5'的外切酶活性，没有校正功能。某种dNTP或Mg2+浓度过高,会增加其错配率。用量一般为2～5个单位/100μL。

（六）模板：PCR对模板DNA的纯度要求不高，但应尽量不含有对PCR反应有抑制作用的杂质存在，如蛋白酶、核酸酶、Taq DNA聚合酶抑制剂、能与DNA结合的蛋白质。模板DNA的量不能太高，否则扩增可能不会成功，在此情况下可适当稀释模板。

（七）引物：引物浓度一般为0.1～0.5μmol/L，浓度过高会引起错配和非特异扩增，浓度过低则得不到产物或产量过低。其3'末端一定要与模板DNA配对，末位碱基最好选用A、C、G。引物G+C约占45～55%，碱基应尽量随机分布，避免嘧啶或嘌呤堆积，两引物之间不应有互补链存在，不能与非目的扩增区有同源性。

3 PCR常见问题

1没有扩增产物

1.温度：变性时间、退火温度；2.引物设计；3.DNA聚合酶活性；4.存在抑制性成份(蛋白酶、核酸酶、其它抑制聚合酶活性的成份)；5.DNA样品。
2非特异产物及电泳呈涂布状

1.Mg2+浓度；2.调整引物、模板、聚合酶的用量；3.适当减少循环数；4.适当提高退火温度，缩短退火或延伸时间。

3引物二聚体的形成

1.检查引物的序列；2.提高退火温度；3.调整引物与模板浓度；4.增加引物长度
4假阳性结果的预防

1.实验器材应一次性使用(枪头、PCR管)；

2.注意操作环境，戴一次性手套；

3.严格PCR操作规程；

4.多次取样的试剂应分装；

5.设置阴性对照和阳性对照