

PCR 实验操作基础

From Gene To Antibody

普健生物（武汉）科技有限公司

AtaGenix Laboratories

2023年7月





蛋白重组表达

XtenCHO高密度表达系统

昆虫杆状病毒表达系统

稳定细胞株构建

抗体定制服务

兔单克隆抗体制备

纳米抗体制备

抗体对开发

重组抗体表达

嵌合抗体生产

抗体片段生产

大规模重组抗体生产

抗体药物开发

人源化抗体

双特异性抗体

抗独特型抗体

普健生物（武汉）科技有限公司

始于2012，一站式抗体发现整体解决方案

3551光谷人才计划

——2013年

高新技术企业

——2017年

光谷瞪羚企业

——2018年

武汉国家生物产业基地
抗体发现与筛选公共服务平台

——2022年



PCR实验简介

聚合酶链式反应（PCR）是一种用于放大扩增特定的DNA片段的分子生物学技术，它可看作是生物体外的特殊DNA复制，PCR的最大特点是能将微量的DNA大幅增加。



PCR反应体系

模板
template

引物
primer

DNA聚合酶
polymerase

脱氧核糖核苷三磷
酸 (dNTPs)

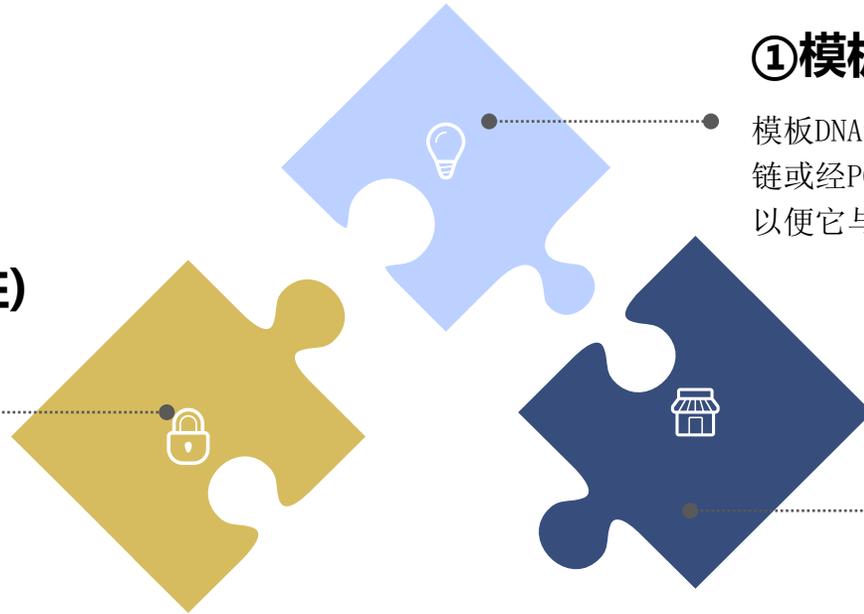
缓冲液
buffer



PCR由**变性—退火—延伸**三个基本反应步骤构成：

②模板DNA与引物的退火(复性)

模板DNA经加热变性成单链后，温度降至55℃左右，引物与模板DNA单链的互补序列配对结合；



①模板DNA的变性

模板DNA经加热至98℃左右一定时间后，使模板DNA双链或经PCR扩增形成的双链DNA解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应做准备；

③引物的延伸

DNA模板—引物结合物在高保真聚合酶的作用下，以dNTP为反应原料，靶序列为模板，按碱基配对与半保留复制原理，合成一条新的与模板DNA链互补的半保留复制链。

重复循环变性—退火—延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需1~2分钟，1~2小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。



PCR实验步骤



1. 实验准备

在工作台上准备好PCR所需要用到的所有试剂及耗材。DNA聚合酶放在冰盒上，引物，模板，ddH₂O放在EP管架上。200ul枪头，10ul枪头，PCR管放在PCR管架上，另外准备好50ul移液枪，10ul移液枪，2ul微量移液枪

2. 加样

现在我们是扩增50ul体系样品，各组分按照以下体积加入PCR管中，混匀后短暂离心至管底部。加样顺序为ddH₂O、F、R、T、Mix

模板	1ul
正向引物	2ul
反向引物	2ul
2×PrimeSTARMax	25ul
ddH ₂ O	20ul

加样完成后做好标记

3. PCR仪上设置PCR反应程序

注意：延伸时间按照样品中最长的序列为准，本次样品中最长序列为2kb，故延伸时间设计为20s

预变性	98°C 3min	
变性	98°C 10s	} 30次循环
退火	55°C 15s	
延伸	72°C 5s/kb	
总延伸	72°C 5min	
保存	16°C	

4. 上样，启动反应程序。

5. 反应结束，将扩增产物放在PCR管架上准备电泳检测

6. 电泳5min后，凝胶电泳成像



常见问题解析

结果	原因	解析
无扩增条带	酶失活或在反应体系中未加入酶	更换新酶或用另一来源的酶
	模板含有杂质	纯化模板或者使用试剂盒提取模板DNA或加大模板的用量
	变性温度不准确	PCR仪指示温度与实际不符，过高酶迅速失活；过低则模板变性不彻底
	反应系统中污染了蛋白酶及核酸酶	在未加聚合酶以前，将反应体系95℃加热 5~10 分钟
	引物变质失效	选择正确、未失活的引物
	引物错误	检查引物特异性或重新设计引物
	流程操作有误	DNA凝胶电泳时加入阳性对照，确保DNA凝胶和PCR程序正确



常见问题解析

结果	原因	解析
产物量过少	退火温度不合适	以2度为梯度设计梯度PCR反应优化退火温度
	DNA模板量太少	增加DNA模板量
	PCR循环数不足	增加反应循环数
	引物量不足	增加体系中引物含量
	延伸时间太短	以1kb/分钟的原则设置延伸时间
	变性时间过长	变性时间过长会导致DNA聚合酶失活
	DNA模板中存在抑制剂	确保DNA模板干净



常见问题解析

结果	原因	解析
扩增产物在凝胶呈弥散状	酶量过高或酶的质量差	减少酶量或调换另一来源的酶
	dNTP浓度过高	减少dNTP的浓度
	模板量过多	质粒DNA的用量应<50ng，而基因组DNA则应<200ng
	引物浓度不够优化	对引物进行梯度稀释重复PCR反应
	循环次数过多	增加模板量减少循环次数至30，缩短退火时间及延伸时间，或改用二种温度的PCR循环。
	退火温度过低	设置合适的退火温度
	电泳体系有问题	凝胶中缓冲液和电泳缓冲液浓度相差太大；凝胶没有凝固好等



常见问题解析

结果	原因	解析
扩增产物出现多条带	引物用量偏大，引物的特异性不高	应降低引物的使用量或调换引物
	循环的次数过多	适当增加模板的量，减少循环次数
	酶的用量偏高或酶的质量不好	应降低酶量或调换另一来源的酶
	退火温度偏低，退火及延伸时间偏长	提高退火温度，减少变性与延伸时间或采用二种温度的PCR扩增
	样品处理不当	正确处理好样品
	复制提前终止	使用非热启动的聚合酶时常有发生。冰上准备反应体系或采用热启动聚合酶
	反应缓冲液未完全融化或未充分混匀	确保反应缓冲液融化完全并彻底混匀
	引物特异性差	利用BLAST检查引物特异性或重新设计引物
	模板量过多	质粒DNA的用量应<50ng，而基因组DNA则应<200ng
	外源DNA污染	确保操作的洁净

谢 谢 观 看！

网址：www.atagenix.cn

邮箱：Sales@atagenix.com

武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号C栋

