

基础PCR操作流程

1. 配制反应体系



10×PCR缓冲液加入5μL；dNTPs(2.5 mM)加4μL；正向引物(10 μM)加2.5；反向引物(10 μM)加2.5μL；Taq酶(5 U/μL)加0.5μL；模板DNA加1-5μL；最后加无菌去离子水补至50 μL

2. PCR程序设置



预变性：95°C×5 min；变性：95 °C×30 s；退火：54 °C×30 s；延伸：72 °C×2 min；终延伸：72 °C×10 min；保存于4 °C

3. 上机

设置好程序后，上机

4. 产物检测



①制胶：称取1.5 g琼脂糖粉末，加入100 mL 1×TAE缓冲液，微波加热溶解，冷却至60°C后，加入5 μL GelRed核酸染料，混匀倒胶

②上样：取5 μL PCR产物+1 μL 6×DNA loading buffer，混匀后加入点样孔

③电泳：120 V恒压电泳20–30分钟

④成像：UV凝胶成像仪下观察

常见问题解析

1. 假阴性表现为阳性对照有条带而实验样品无条带怎么办？

①重新设计引物并验证其特异性；②纯化模板或增加模板量；③更换新鲜酶；④调整退火温度(可梯度优化)和延伸时间。

2. 条带出现拖尾或弥散，为什么？

①模板过量或循环数过多 (>40次)；②Mg²⁺浓度过高；③电泳上样量过大。

3. PCR产物凝胶纯化是否有必要？

PCR产物是否需要凝胶纯化主要取决于电泳检测结果。①单一特异性条带，当琼脂糖凝胶电泳显示PCR产物为单一、清晰的条带且与预期大小一致时，可以直接使用柱式纯化法（硅胶膜吸附法或磁珠法）去除反应体系中的引物、dNTPs和酶等杂质，而无需凝胶纯化。②存在非特异性条带或引物二聚体：如果电泳结果显示多条带或存在明显的引物二聚体（通常在100 bp以下），则必须通过切胶回收的方式纯化目的片段。这是因为非特异性产物会干扰下游实验，如测序时导致双峰乱峰，克隆时产生错误阳性克隆。

4. 凝胶纯化相比直接纯化方法的优势？

①能有效去除非目标条带、引物二聚体及错误扩增产物，保证后续实验的特异性。②通过琼脂糖浓度调整（如0.8%-2%）可精确分离不同大小的DNA片段，尤其适合相近大小片段的分离。③对于PCR产物直接测序，凝胶纯化是必须步骤，否则残留引物或非特异产物会导致测序失败或乱峰。④可避免引物二聚体被连接入载体（因其摩尔浓度高，即使量少也易被克隆）。

参考文献

[1] Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [J]. Science, 1988, 239(4839): 487-491.