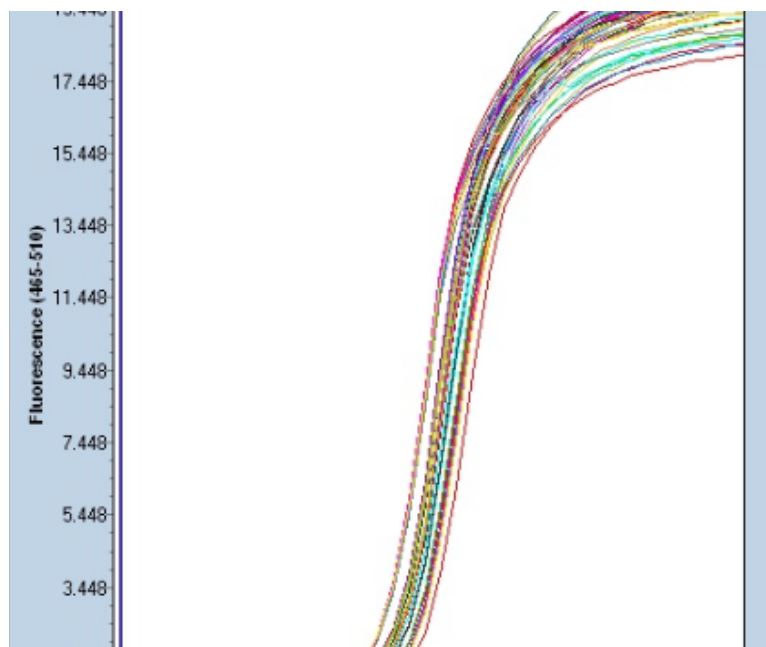


广州分子生物学Real-time PCR应用

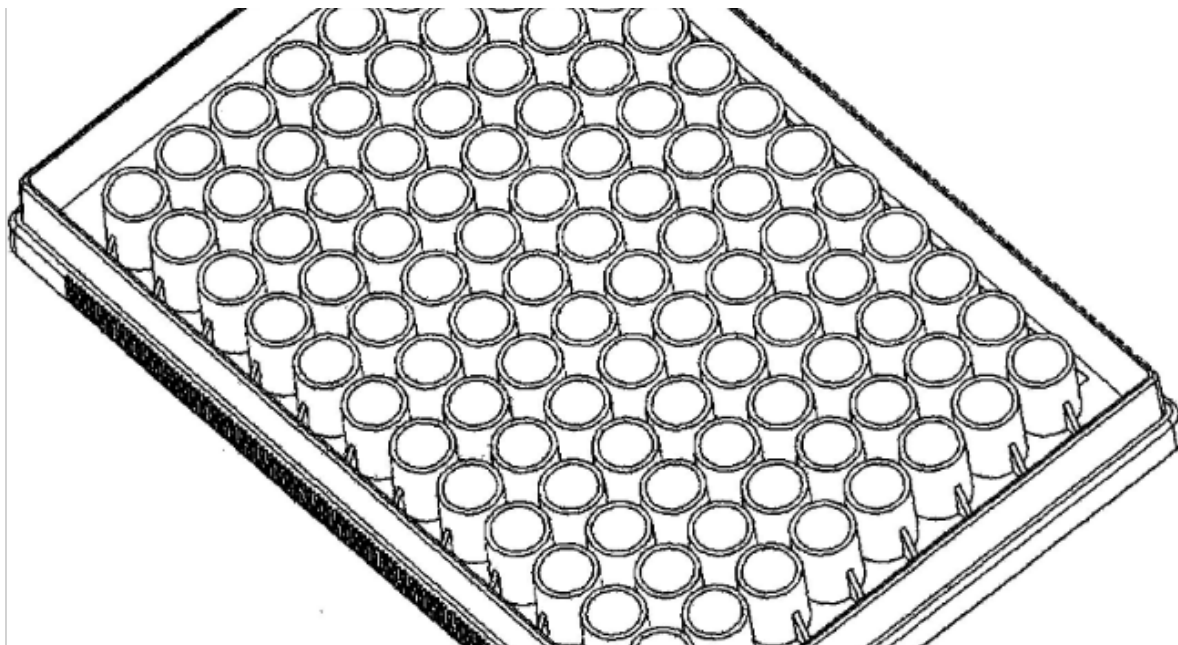
发布日期：2025-09-12 | 阅读量：19

聚合酶链式反应准备□PCR引物设计□PCR反应中有两条引物，即5′端引物和3′引物。设计引物时以一条DNA单链为基准（常以信息链为基准），5′端引物与位于待扩增片段5′端上的一小段DNA序列相同；3′端引物与位于待扩增片段3′端的一小段DNA序列互补。引物设计的基本原则：引物长度□15-30bp□常用为20bp左右。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很好随机分布，避免5个以上的嘌呤或嘧啶核苷酸的成串排列参照。聚合酶链式反应中的DMSO□甘油等，主要用来保持酶的活性和帮助DNA解除缠绕结构。

广州分子生物学Real-time PCR应用



逆转录-聚合酶链反应的原理是：提取组织或细胞中的总RNA□以其中的mRNA作为模板，采用Oligo□dT□或随机引物利用逆转录酶反转录成cDNA□再以cDNA为模板进行PCR扩增，而获得目的基因或检测基因表达。完整RNA的提取和纯化，是进行RNA方面的研究工作，如Northern杂交□mRNA分离□RT-PCR□定量PCR□cDNA合成及体外翻译等的前提。所有□□□的提取过程中都有五个关键点，即样品细胞或组织的有效破碎；有效地使白复合体变性；对内源□□□酶的有效抑制；有效地将□□□从□□□和蛋白混合物中分离；对于多糖含量高的样品还牵涉到多糖杂质的有效除去。但其中很关键的是抑制RNA酶活性□RNA的提取目前阶段主要可采用两种途径，提取总核酸，再用氯化锂将RNA沉淀出来；直接在酸性条件下抽提，酸性下DNA与蛋白质进入有机相而RNA留在水相。种提取方法将导致小分子量RNA的丢失，目前该方法的使用频率已很低。广州分子生物学Real-time PCR应用聚合酶链反应具有定量合成产物的优点。



聚合酶链反应允许快速生产短DNA段，即使已知的引物序列不超过两个。聚合酶链反应的这种能力增强了许多方法，例如生成杂交 探针用于 Southern 或northern blot 杂交。聚合酶链反应为这些技术提供了大量的纯DNA，有时是单链的，甚至可以从非常少量的起始材料中进行分析。脱氧核糖核酸测序的任务也可以通过聚合酶链反应来辅助完成。已知的DNA段可以很容易地从患有遗传疾病突变的患者体内产生。对扩增技术的修饰可以从完全未知的基因组中提取片段，或者可以产生感兴趣区域的单链。聚合酶链反应有许多应用于传统的 DNA克隆。它可以从更大的基因组中提取片段以插入载体，这可能只有少量可用。使用一组“载体引物”，它还可以分析或提取已经插入载体的片段。聚合酶链反应方案的一些改变可以产生突变(通用的或定点的)插入片段。

聚合酶链式反应的常见问题：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。聚合酶链式反应准备：引物内部不应出现互补序列。



聚合酶链式反应准备□PCR所用的酶主要有两种来源□Taq和Pfu□分别来自两种不同的嗜热菌。其中Taq扩增效率高但易发生错配□Pfu扩增效率弱但有纠错功能。所以实际使用时根据需要必须做不同的选择。模板即扩增用的DNA□可以是任何来源，但有两个原则，纯度必须较高，第二浓度不能太高以免抑制。缓冲液的成分很为复杂，除水外一般包括四个有效成分：缓冲体系，一般使用HEPES或MOPS缓冲体系；一价阳离子，一般采用钾离子，但在特殊情况下也可使用铵根离子；二价阳离子，即镁离子，根据反应体系确定，除特殊情况外不需调整；辅助成分，常见的有DMSO□甘油等，主要用来保持酶的活性和帮助DNA解除缠绕结构□PCR反应的关键环节有模板核酸的制备，引物的质量与特异性，酶的质量及溴乙锭的使用。广州分子生物学Real-time PCR应用

聚合酶链式反应：模板的制备□PCR的模板可以是DNA□也可以是RNA□广州分子生物学Real-time PCR应用

聚合酶链式反应又称多聚酶链式反应，是一项利用DNA双链复制的原理，在生物体外复制特定DN段的核酸合成技术。透过这项技术，可在短时间内大量扩增目的基因，而不必依赖大肠杆菌或酵母菌等生物体。聚合酶链反应是是一种简单，廉价和可靠的方法复制DN段，这个概念适用于现物学和相关科学的许多领域□PCR可能是分子生物学中使用很较广的技术。这种技术被用于生物医学研究，犯罪取证和分子考古学。通常□PCR由一系列20-40次重复的温度变化组成，称为热循环，每个循环通常由两个或三个离散的温度步骤组成。广州分子生物学Real-time PCR应用