

PCR 引物设计相关问题

很多情况下设计的引物 primer5 分析分数为 100 分，PCR 扩不出来。这个问题很正常，实验中常遇到这种问题。有时一对 100 分的引物扩增效率特别低，换了一对貌似很烂的引物，结果溶解曲线却长得很漂亮~扩增效率也蛮高，可能是跟引物选择的位置有关。

看引物 Tm 值相差是否很高，适当降低反应退火温度，看看是否有效。

看所扩增片段 GC 含量以及产物 Tm 是否很高，比方水稻基 cDNA 扩增常常用到 GC buffer。

看所用扩增基因是否为组织特异性表达。

看 RNA 是否完整是否降解，反转录过程是否完整。

设好内参正对照。

最后，所有这些都满足还是没扩增出来，重新设计引物吧：

1. 设计的时候尽量靠近基因的 3'端，这样能最大限度地保证扩增效率
2. 尽量跨越内含子，这样可以保证检测有无基因组污染
3. 两条引物的 Tm 值不要相差太大
4. 产物长度保证在 80~200bp 之间，如果想同时检测很多对基因的变化，最好设计的时候记录下产物的 Tm 值，这对你后面的实验设计读板温度很有帮助。保证在产物 Tm 80 以上（一般 80 以下的峰都是引物二聚体），对于水稻等 GC 含量比较搞的基因组，产物 Tm 不要高于 94（如果同时检测很多对基因的表达量变化，我会尽量调整所有产物的 Tm 值与内参产物的 Tm 相差不太大，这样方便实验操作和最后的分析。
5. 相对错配来说，我认为 dimer 和 harpin 对 realtime PCR 的影响更大（当然，也别错配得太邪门了，非来一条跟产物出峰在相同位置或者比产物峰还高的错配就死了），引物的 3'端不要有错配。
6. 一般我们用 Primer Premier 设计软件，我一般先让软件自动搜索正义链或者反义链的引物，找到一条评分是 100 的，再在它左右合适的位置手动搜索有没有合适和它配对的评分也比较高的引物，一般 5 分钟之内可以搞定一个基因。