

## 完成 PCR 实验注意事项

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是一种体外核酸扩增系统, 其原理类似 DNA 分子天然复制过程, 是将在待扩增的 DNA 片段和与其两侧互补的两个寡聚核苷酸引物, 经变性、退火和延伸若干个循环后, DNA 扩增  $2^n$  倍。该技术已成为分子生物学中一种有助于 DNA 克隆及基因分析的必需工具。

### PCR 操作时应注意事项

PCR 检测微量感染因子时, 容易因为污染而导致各种问题, 因此, 进行 PCR 操作时, 操作人员应该严格遵守一些操作规程, 最大程度地降低可能出现的 PCR 污染或杜绝污染出现。

#### (1) 划分操作区

目前, 普通 PCR 尚不能做到单人单管, 实现完全闭管操作, 但无论是否能够达到单人单管, 均要求实验操作在三个不同的区域内进行, PCR 的前处理和后处理要在不同的隔离区内进行:

- ① 标本处理区, **包括:** 扩增模板制备;
- ② PCR 扩增区, **包括:** 反应液的配制和 PCR 扩增;
- ③ 产物分析区, 凝胶电泳分析, 产物拍照及重组克隆制备。

※ 各工作区要具有一定隔离, 操作器材专用, 要有一定方向性, 如, 标本制备→PCR 扩增→产物分析→产物处理。

切记: 产物分析区的产物及器材不要拿到其他两个工作区。

#### (2) 分装试剂

PCR 扩增所需要的试剂均应在**装有紫外灯的超净工作台或负压工作台配制和分装**, 所有的加样器和吸头需固定放于其中, 不能用来吸取扩增后的 DNA 和其他来源 DNA:

- ① PCR 用水应为高压的双蒸水;
- ② 引物和 d-NTP 用高压的双蒸水在无 PCR 扩增产物区配制;
- ③ 引物和 d-NTP 应分装储存, 分装时应标明时间, 以备发生污染时查找原因。

#### (3) 实验操作注意事项

尽管扩增序列的残留污染大部分是假阳性反应的原因, 样品间的交叉污染也是原因之一。因此, 不仅要在进行扩增反应是谨慎认真, 在样品的收集、抽提和扩增的所有环节都应该注意。

- ② 一次性手套, 若不小心溅上反应液, 立即更换手套;
- ② 使用一次性吸头, 严禁与 PCR 产物分析室的吸头混用, 吸头不要长时间暴露于空气中, 避免气溶胶的污染;
- ③ 避免反应液飞溅, 打开反应管时为避免此种情况, 开盖前稍离心收集液体于管底。若不小心溅到手套或桌面上, 应立刻更换手套并用稀酸擦拭桌面;
- ④ 操作多份样品时, 制备反应混合液, 先将 dNTP、缓冲液、引物和酶混合好, 然后分装, 这样即可以减少操作, 避免污染, 又可以增加反应的精确度;
- ⑤ 最后加入反应模板, 加入后盖紧反应管;
- ⑥ 操作时设立阴阳性对照和空白对照, 即可验证 PCR 反应的可靠性, 又可以协助判断扩增

系统的可信性；

⑦ 尽可能用可替换或可高压处理的加样器，由于加样器最容易受产物气溶胶或标本 DNA 的污染，最好使用可替换或高压处理的加样器。如，没有这种特殊的加样器，至少 PCR 操作过程中加样器应该专用，不能交叉使用，尤其是 PCR 产物分析所用加样器不能拿到其它两个区；

⑧ 重复实验，验证结果，慎下结论。

### **PCR 扩增重要标准**

#### **什么是 PCR 实验灵敏度？**

**灵敏度指的是 PCR 扩增反应能够检测到目的基因最小值。**研究表明，影响 PCR 扩增效率的因素，如，模板的复杂程度与完整性、引物纯度及其与模板结合效率、反应温度、DNA 聚合酶的热稳定性与扩增性能、反应缓冲液的离子组成（**主要指：阳离子**）、反应优化剂等，均决定 PCR 实验检测灵敏度。在最佳扩增条件下，常规 PCR 反应能够检测到 pg (10~12g) 数量级目的基因。对于一个特定的目的基因，模板与引物通常都是已经限定好的因素。因此，选择什么样的 PCR 反应体系（**包括：DNA 聚合酶与反应缓冲液等**）就是研究者提高 PCR 实验灵敏度的关键因素了。

#### **什么是 PCR 实验特异性？**

**特异性指的是在 PCR 扩增过程中，专一性扩增目的片段而非其他片段的性能。**在 PCR 实验本身的灵敏度很高，且实验条件未充分优化的情况下，通常会在目的片段出现同时伴随有其他杂带，即，发生非特异性扩增现象。模板、引物性质及质量、反应条件控制等均会影响 PCR 扩增特异性。近年，研究表明，缓冲液品质（**如，离子种类与组成，反应优化剂等**）对保证 PCR 特异性扩增起着不可忽视的作用。一般缓冲液中调节氢键作用盐只有 KCl，而东盛 HSTMTaq Mix 的缓冲体系通过反应优化剂以及 KCl/(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 盐离子体系平衡调节，显著提高 PCR 扩增特异性，降低背景。