

如何建立一个 PCR 实验室？

为了对以个特定序列进行 PCR 做重复检测,需要三个不同的区域,每一个区域的具体技术操作和试剂在下面详细列出.

1、样品准备区

这个区域专门用作样品的准备,在制备和操作用于核酸提取的试剂时应该采取预防措施:

- 1) PCR 产物和带有要扩增序列的 DNA 克隆不能在这个房间操作。
- 2) 组织培养物、组织标本和血清样品都带进样品准备间处理,以根据应用的需要提取 DNA 或 RNA。
- 3) 用于样品处理的工具不能被用作普通分子克隆的工具,也不能用作操作靶序列。
- 4) DNA 样品应该用有专门的防护或正压活塞式移液管操作,以防止在吸取样品时有气溶胶遗留。
- 5) 大体积样品应该用单独包装的无菌一次性移液管吸取。
- 6) 管子打开前都要简短离心以减少气溶胶的产生,而且管子不能用力崩开,这样会产生气溶胶。
- 7) 任何时候都应该穿实验服和带手套,手套要经常更换,尤其在抽提过程中每一步之间都要更换。实验服要专门用于样品准备间,经常清洗。

2、样品准备和 RNA-PCR

RNA-PCR 的额外步骤需要额外的样品操作,这样增加了样品之间污染的机会。为了避免这一问题,反转录一步可以在样品准备区进行。在 RNA-PCR 中应用 UNG 以防止污染的方法也有报道。

3、前 PCR 区

必须有专门用于准备各种反应的区域,这个区域必须保持干净,而且没有来自克隆和样品准备的污染。前 PCR 区必须要有试剂和准备,特别是专门用于前 PCR 区的正压活塞式移液管。

4、PCR 实验室试剂的操作

- 1) 所用的所有溶液都应该没有核酸和(或)核酸酶(DNase 和 RNase)污染。
- 2) 所有 PCR 试剂中使用的水都应该是高质量的一新鲜蒸馏的去离子水,用

0.22 μ m 过滤的，并且是高压灭菌。

3) 在 20℃ 到 25℃ 贮存的试剂建议加点像叠氮钠一类的抗微生物剂，在扩增试剂或样品制备试剂中加入 0.025% 的叠氮钠不抑制扩增反应。

4) 所用试剂都应该以大体积配制，实验一下看试剂是否满意，然后分装成仅够一次使用的量进行贮存。

5) 所有试剂和样品准备过程中都要使用一次性灭菌的瓶子和管子。

6) 新配制的试剂在用于准备新的标本之前应该加以检验。

7) 样品准备和前 PCR 区所使用的移液管在不使用时都应该小心保存。

5、在前 PCR 区建立 PCR 混合物

1) 可以把即刻可用的“主混合物”溶液配好、分装并保存在 -20℃ 或 4℃，在实验室只涉及到扩增一种或少数几种特异序列时这样做很有用。

2) 如果你的实验室使用多套引物，以致于配制包括所有试剂的单一反应混合物不够经济，可以考虑分装保存够一天的 PCR 成分。

3) 作为一个规则，应该保存一套阴性、弱阳性和强阳性对照样品来分析样品配制和 PCR 前过程的效率和洁净程度。而且，你也希望通过使用一个已知的弱阳性样品来验证你的样品缓冲液以证明里面不含扩增抑制物。

4) 阴性样品要与每组样品同时做，以分析是否存在样品与样品之间的污染以及是否存在 PCR 产物的污染，阴性对照应该包括核酸以外的所有试剂。

5) 当做阳性对照时，有两个理由决定了应该使用最少数量的核酸。

6) 由于必须有对照反应，对照模板的特点应该予以考虑。

6、控制污染的方法

已设计出很有力的酶学方法用来消除一种形式的污染—使用 UNG，这一技术能有效地消除由 PCR 产物引起的污染。另一种控制污染的方法是使用紫外线，这种方法不能完全消除污染问题，但可以将污染降低几个数量级。

7、PCR 仪的位置

8、后 PCR 区

PCR 完成以后，需要分析样品并解释数据，应该留出一个专门用于反应后处理样品的地方。后 PCR 活动中使用的所用试剂、一次性耗材和仪器都必须是专门用于这一目的，决不能把实验室这一区域的试剂或仪器用于任何前 PCR 活动。