

PCR 实验室入门级别的知识要点

一、PCR 实验室的设计原则

原则上应当设置 4 个区域：试剂储存和准备区、标本制备区、扩增区、扩增产物分析区。

根据使用仪器的功能，区域可适当合并。

使用实时荧光 PCR 仪，扩增区、扩增产物分析区可合并；

采用样本处理、核酸提取及扩增检测为一体的自动化分析仪，则标本制备区、扩增区、扩增产物分析区可合并。

各区功能必备物品清单：

1、试剂储存和准备区（1 区）

功能：贮存试剂的制备、试剂的分装和扩增反应混合液的准备，以及离心管、吸头等消耗品的贮存和准备。

必备物品：

- （1）2~8℃ 和 -20℃ 以下冰箱
- （2）混匀器
- （3）微量加样器（覆盖 0.2-1000 μl）

2、标本制备区（2 区）

功能：核酸（RNA、DNA）提取、贮存及其加入至扩增反应管。对于涉及临床样本的操作，应符合生物安全二级实验室防护设备、个人防护和操作规程的要求。

必备物品：

- （1）2-8℃ 冰箱、-20℃ 或 -80℃ 冰箱
- （2）高速离心机
- （3）混匀器
- （4）水浴箱或加热模块
- （5）微量加样器（覆盖 0.2-1000 μl）
- （6）生物安全柜。

3、扩增区（3 区）

功能：cDNA 合成、DNA 扩增及检测。

必备物品：核酸扩增仪（或荧光定量 PCR 仪）

4、扩增产物分析区（4 区）

功能：扩增片段的进一步分析测定，如杂交、酶切电泳、变性高效液相分析、测序等。

必备物品：

- (1) 杂交仪、电泳仪、测序仪等
- (2) 微量加样器（覆盖 0.2-1000 μ l）

通用物品：

- (4 个区都有可能需要)
- (1) 可移动紫外灯（近工作台面）
- (2) 消耗品：一次性手套、耐高压处理的离心管和加样器吸头
- (3) 专用工作服和工作鞋(套)
- (4) 专用办公用品
- (5) 样本管架（2 区）
- (6) 防爆夹（2 区）
- (7) PCR 管架（2 区、传递窗）

二、PCR 实验室工作基本原则

1、进入各工作区域应当严格按照单一方向进行

试剂储存和准备区→标本制备区→扩增区→ 扩增产物分析区。

2、各工作区域必须有明确的标记，不同工作区域内的设备、物品不得混用。

3、不同的工作区域使用不同的工作服（例如不同的颜色）。工作人员离开各工作区域时，不得将工作服带出。

4、实验室的清洁应当按试剂贮存和准备区→标本制备区→扩增区→扩增产物分析区的方向进行。不同的实验区域应当有其各自的清洁用具以防止交叉污染。

5、工作结束后，必须立即对工作区进行清洁。工作区的实验台表面应当可耐受诸如次氯酸钠的化学物质的消毒清洁作用。实验台表面的紫外照射应当方便有效。由于紫外照射的距离和能量对去污染的效果非常关键，因此可使用可移动紫外灯（254nm 波长），在工作完成后调至实验台上 60~90cm 内照射。由于扩增产物仅几百或几十碱基对（bp），对紫外线损伤不敏感，因此紫外照射扩增片段必须延长照射时间，最好是照射过夜。

6、实验室的安全工作制度或安全标准操作程序，所有操作符合《实验室生物安全通用要求》（GB19489-2008）。

三、注意事项

1、试剂储存和准备区

贮存试剂和用于标本制备的消耗品等材料应当直接运送至试剂贮存和准备区，不能经过扩增检测区，试剂盒中的阳性对照品及质控品不应当保存在该区，应当保存在标本处理区。

2、标本制备区

由于在样本混合、核酸纯化过程中可能会发生气溶胶所致的污染，可通过在本区内设立正压条件，避免从邻近区进入本区的气溶胶污染。为避免样本间的交叉污染，加入待测核酸后，必须盖好含反应混合液的反应管。对具有潜在传染危险性的材料，必须在生物安全柜内开盖，并有明确的样本处理和灭活程序。

3、扩增区

为避免气溶胶所致的污染，应当尽量减少在本区内的走动。必须注意的是，所有经过检测的反应管不得在此区域打开。

4、扩增产物分析区

核酸扩增后产物的分析方法多种多样，如膜上或微孔板或芯片上探针杂交方法（放射性核素标记或非放射性核素标记）、直接或酶切后琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳、Southern 转移、核酸测序方法、质谱分析等。本区是最主要的扩增产物污染来源，因此必须注意避免通过本区的物品及工作服将扩增产物带出。在使用 PCR-ELISA 方法检测扩增产物时，必须使用洗板机洗板，废液必须收集至 1 mol/L HCl 中，并且不能在实验室内倾倒，而应当至远离 PCR 实验室的地方弃掉。

用过的吸头也必须放至 1 mol/L HCl 中浸泡后再放到垃圾袋中按程序处理，如焚烧。由于本区有可能会用到某些可致基因突变和有毒物质如溴化乙锭、丙烯酰胺、甲醛或放射性核素等，故应当注意实验人员的安全防护。