

# 多重PCR操作指南!

Nov. 2007 - CHN - v1.2

[www.neuro-hemin.com](http://www.neuro-hemin.com)  
[www.flu.org.cn](http://www.flu.org.cn)



# List



## 实验所需器材清单

1. 仪器
  2. 耗材
  3. 试剂
  4. 其他
- 

## 移液器的使用和管理

1. 移液器类型
  2. 如何使用移液器
  3. 移液器的维护
- 

## 分子生物学实验

1. 准备工作
  2. RNA/DNA的提取
  3. 检测RNA/DNA的质量
  4. PCR反应
  5. 凝胶电泳和结果分析
-

# 实验所需器材清单

## 1.1 器材 – 移液器 (P1000, P200, P20, P10)

### ● 移液器种类

P1000 : for 200 – 1,000 ul

P200 : for 20 – 200 ul

P20 : for 2 – 20 ul

P10 : for 1 – 10 ul



常用的Gilson (左) & Eppendorf (右)移液器

①: P1000, ②: P200, ③: P20, ④: P10.

# 实验所需器材清单

## 1.2 仪器 – PCR 仪

- PCR实验时,需要用到PCR管(0.2 ml or 0.5 ml tubes)和PCR仪。
- PCR仪用于程序升温,进行PCR反应。一些常见的PCR仪展示如下:



Applied Biosystems  
GeneAmp PCR 9700



Applied Biosystems  
PCR 9600



Applied Biosystems  
PCR 2400



Eppendorf  
Mastercycler Gradient 5331

# 实验所需器材清单

## 1.3 仪器 – 造冰机/冰盒

- 造冰机：用于生产冰。
- 冰盒：用于存储冰（可用泡沫盒替代）。PCR相关的试剂和管子应该在整個实验过程中在冰中保持低温。



造冰机



冰盒



泡沫盒

# 实验所需器材清单

## 1.4 仪器 – 离心机（桌式/迷你型）

- 使用高速离心机离心临床样本或者反应混合物。  
(时间和转速可以调整。离心速度可以由rpm: 每分钟旋转次数或者rcf: 相关离心力来衡量。)
- 某些离心机的温度可以调节 (例 4℃ 离心机)
- 迷你型离心机可以用于沉降 (低速离心以将管壁的残留物沉降至管底)



离心机 (桌式)

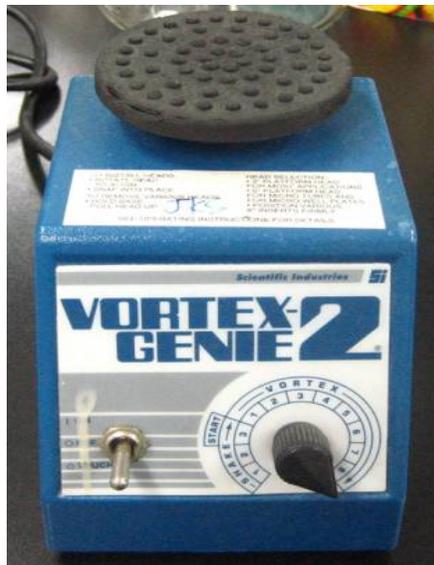


(迷你型) 用于沉降

# 实验所需器材清单

## 1.5 仪器 – 振荡器（混匀器）

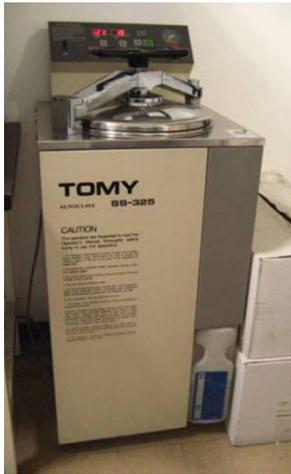
- 通过振动将管内的任何混合物混匀。



# 实验所需器材清单

## 1.6 仪器 – 高压蒸汽灭菌机和烘干机

- 灭菌剂可以分为两种：干型和湿型。湿型灭菌剂用于消毒管子，移液枪头等。在高压和热蒸汽，1.5 atm，121 °C，15~20分钟。
- 高压蒸汽灭菌毒后，管子和枪头用烘干机烘干。如果水分没有被完全去除，实验中可能会造成误差。



高压蒸汽消毒机（用于消毒）



烘干机

# 实验所需器材清单

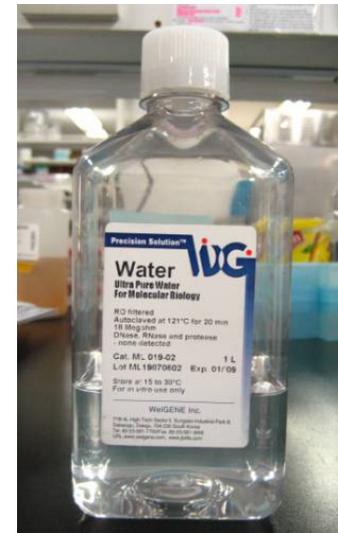
## 1.7 仪器 – 纯水仪（用于制造双蒸水(DDW)）

- 这是对分子诊断很重要的一个仪器。
- 为了尽量减少污染，推荐分别使用小型容器。
- 如果有蒸馏器，将双蒸水根据相应实验用量装瓶，热蒸气消毒，并分开保存。
- 最近，消毒后的双蒸水已经有商业化产品。



蒸馏器

(①: 主蒸馏器, ②: 双蒸馏器)

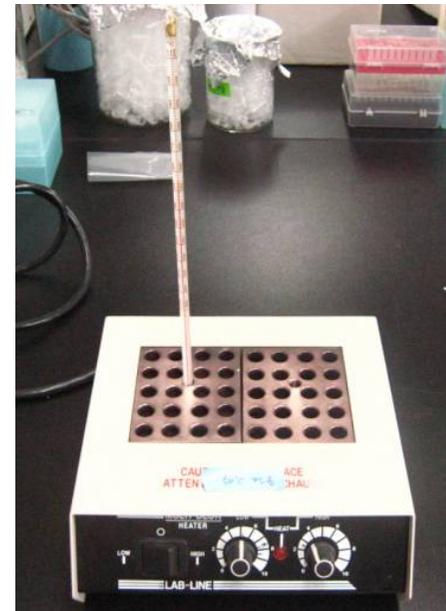


消毒后的双蒸水

# 实验所需器材清单

## 1.8 仪器 – 热恒温仪（干浴）

- 通常用于加热在**1.5 ml**管中的成分（温度可由用户调节）。
- 可以用温度计来监测加热温度。



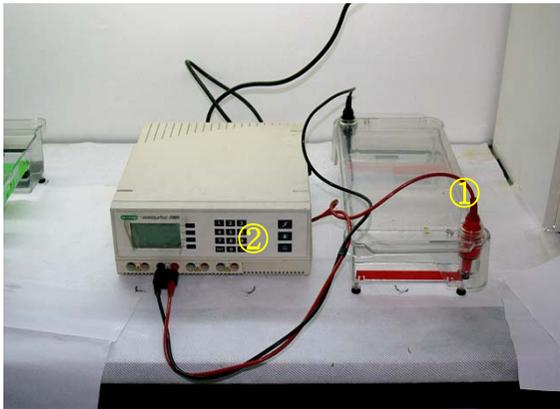
这个加热仪有两个独立的加热区。

# 实验所需器材清单

## 1.9 仪器 – 电泳系统 (EP)

- EP: PCR产物通过凝胶电泳得以区分(picture 1)。
- 胶盒及梳子: 用于制胶(pictures 2 & 3)。

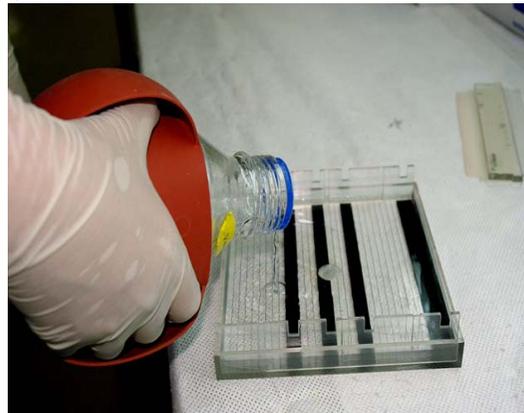
1)



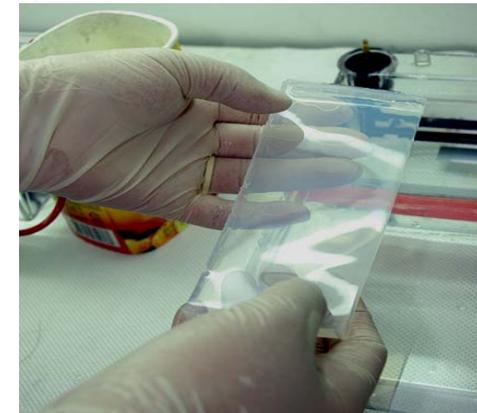
电泳系统

(①: 电泳系统 ②: 电源)

2)



3)



用胶盒及梳子制作凝胶

# 实验所需器材清单

## 1.10 仪器 — 凝胶成像分析仪

- 凝胶成像分析系统：用于分析凝胶中的**PCR**产物（左图）。
- 如果没有成像分析系统，使用**UV透照台**或宝丽来相机替代。



凝胶成像分析系统

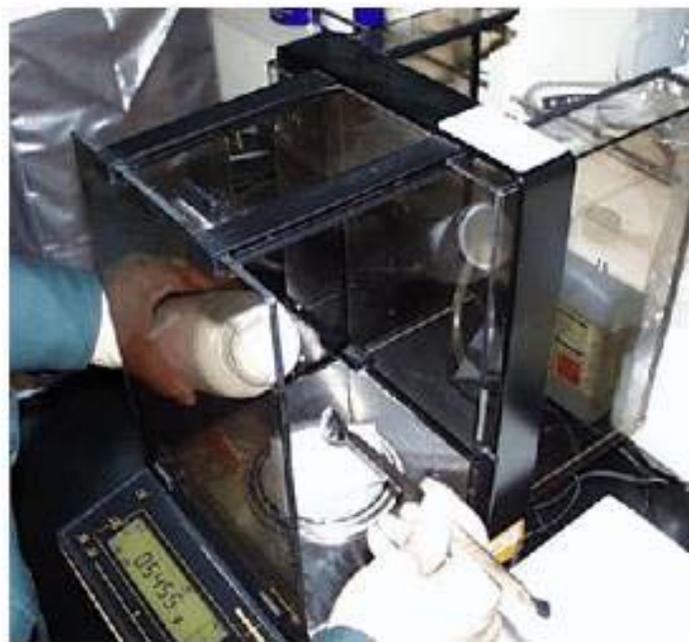


UV透照台/宝丽来相机

# 实验所需器材清单

## 1.11 仪器 – 天平

- 用于称量试剂



# 实验所需器材清单

## 1.12 仪器 — 洁净的通风橱

- 为防止感染，使用通风橱并只允许手部操作。
- 主要用于处理样本。请用**70%乙醇溶液**和紫外线消毒以防止感染。



# 实验所需器材清单

## 2.1 耗材 – 移液器枪头（蓝色，黄色，白色）

- 移液器枪头的种类

- 蓝色枪头：200 – for 1,000 ul (P1000)

- 黄色枪头：20 – for 200 ul (P200)

- 黄色枪头：2 – for 20 ul (P20)

- 白色枪头：1 – for 10 ul (P10)

- 进行RNA相关操作时，请使用带滤芯的枪头来预防污染。



蓝色枪头



黄色枪头



白色枪头



滤芯枪头

# 实验所需器材清单

## 2.2 耗材 – 手套（塑料薄膜/橡胶）

- 在实验中必须一直使用手套。在RNA相关实验中特别推荐使用橡胶手套而不是塑料薄膜手套。
- 橡胶手套必须是无粉的。根据手型选择大、中、小号。



橡胶手套（无粉）



塑料薄膜手套

# 实验所需器材清单

## 2.3 耗材 – 管子 (1.5 ml / 0.2 ml)

- 1.5 ml 管：也称为EP管。通常用于（样本，DNA，RNA，.....保存）
- PCR 管
  - 0.2 ml 管：最常用的PCR反应管。推荐用于PCR实验。
  - 0.5 ml 管：过去使用，少数实验室仍在应用。
- 管子放入容器或者烧杯中，高温蒸汽离心，干燥后待用。



管 (①: 1.5ml, ②: 0.2ml)

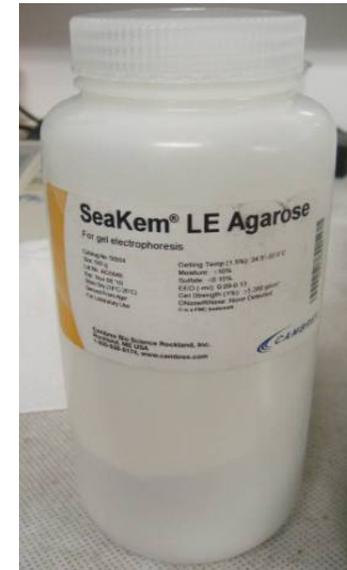


置烧杯中消毒

# 实验所需器材清单

## 3.1 试剂 – 琼脂糖粉/EtBr

- 琼脂糖粉：白色粉末用于制胶
- EtBr: 溴化乙啶的缩写。用于在紫外线下检测DNA/RNA。使用EtBr时请佩戴手套。



琼脂糖（粉末）

# 实验所需器材清单

## 3.2 试剂 – TE / TAE / TBE 缓冲液

- **TE:** 一种主要用于溶解基因组DNA或质粒的缓冲溶液，例，DNA. pH应为8.0。制备TE缓冲液时，需要Tris-base，EDTA等试剂。市面上也有商业性产品。DNA可以在灭菌蒸馏水中溶解，但是TE缓冲溶液可以保持DNA稳定。

- **TAE / TBE 缓冲溶液:** 一种用于DNA电泳的缓冲溶液。

**TAE (Tris-acetate EDTA)** 和 **TBE (Tris-borate EDTA)** 用于琼脂糖凝胶电泳。**TBE** 也可用于聚丙烯酰胺凝胶电泳。琼脂糖凝胶主要使用**TAE**缓冲溶液。

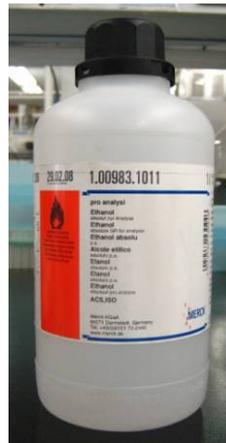
# 实验所需器材清单

## 4.1 其他 – 酒精喷雾器

- 用于实验前对工作台，移液器枪头，手的灭菌。
- 乙醇于**70%**浓度时具有最佳灭菌效果。  
用蒸馏水稀释工业用酒精（工业用酒精：蒸馏水=70：30），倒入喷雾器中。不要使用试剂级乙醇。



工业用酒精



试剂级酒精



酒精喷雾器

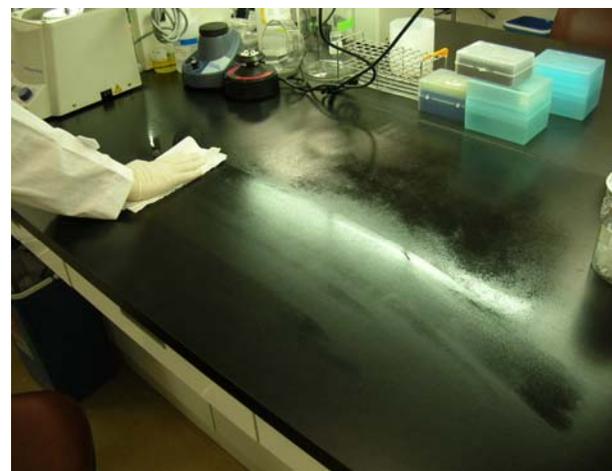
# 实验所需器材清单

## 4.2 其他 – 手纸

- 用于实验后清洁工作台，移液器枪头，和手。  
手纸在使用中应不产生颗粒，普通手纸不能使用。



手纸

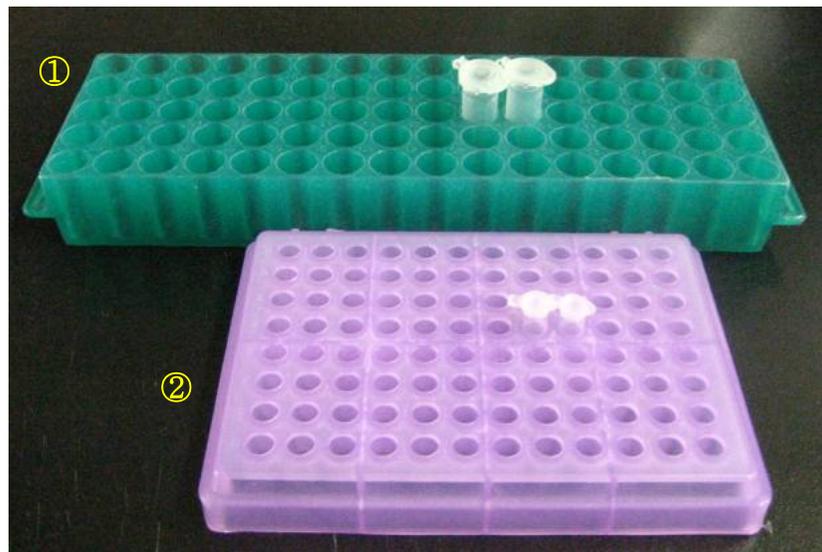


实验前使用70%乙醇喷雾消毒并用手纸擦拭工作台

# 实验所需器材清单

## 4.3 其他 – 试管架 (用于 1.5 / 0.2 ml)

- 用于装持反应管。



试管架 (①: 1.5 ml, ②: 0.2 ml)

# 实验所需器材清单

## 4.4 其他 – 冷盒/冰架

- 冷盒：用于保存酶和PCR的冷冻试剂的架子。使用前置冰箱冰冻。
- 冰架：当无冰时用于保存PCR反应的0.2ml反应管的架子。使用前置冰箱冰冻，可以保持0°C达一小时。  
当温度升高至7°C或更高时，冰架会发生颜色变化提示温度的升高（紫色-）粉红色，深蓝色-）天蓝色）



冷盒

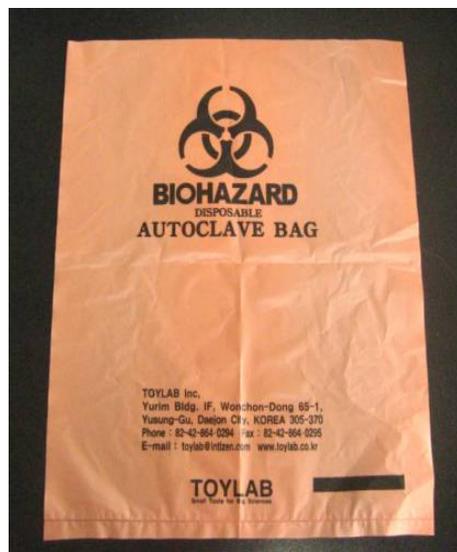


冰架

# 实验所需器材清单

## 4.5 其他 – 生物危害性袋（用于盛装废弃物的袋子）

- 用于装试验废弃的反应管，移液器枪头等。



# 如何使用移液器

## 1.1 移液器的种类 (P1000, P200, P20, P10)

- 移液器是分子生物学实验的主要工具之一，如外科医生的手术刀一般。使用移液器的技术可能会决定一个实验的结果。
- 移液器有不同的容量，但是一般有4种型号（单位：微升）。

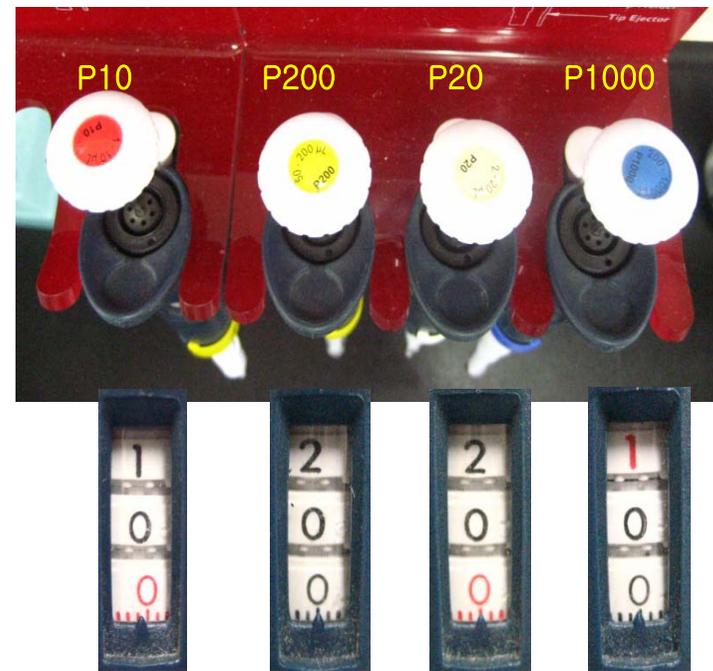


①: P1000, ②: P200, ③: P20, ④: P10

# 如何使用移液器

## 1.2 使用移液器 — 读取移液器的刻度

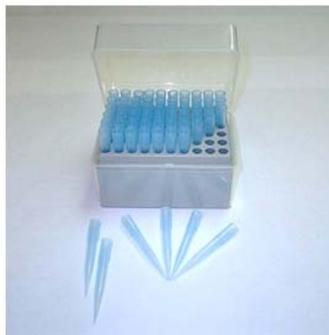
- 移液器标有刻度和数字。红色数字表示小数点后的数字或者**1000**个单位（微升）。其他数字提示体积（从左到右：**10**微升；**200**微升；**20**微升；**1000**微升）。
- 移液器移取的容量可以通过顶端的按钮调节。



# 如何使用移液器

## 1.3 使用移液器 — 使用适合移液器的枪头

- 移液器使用一次性枪头。1000微升枪头为蓝色，20&200微升枪头为黄色，10微升枪头为白色。
- RNA操作只能使用滤芯枪头。



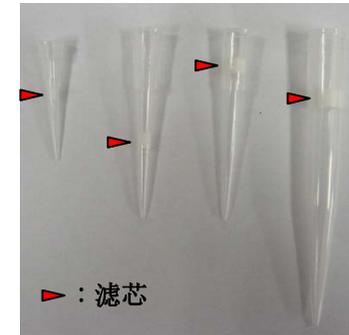
蓝色枪头



黄色枪头



白色枪头

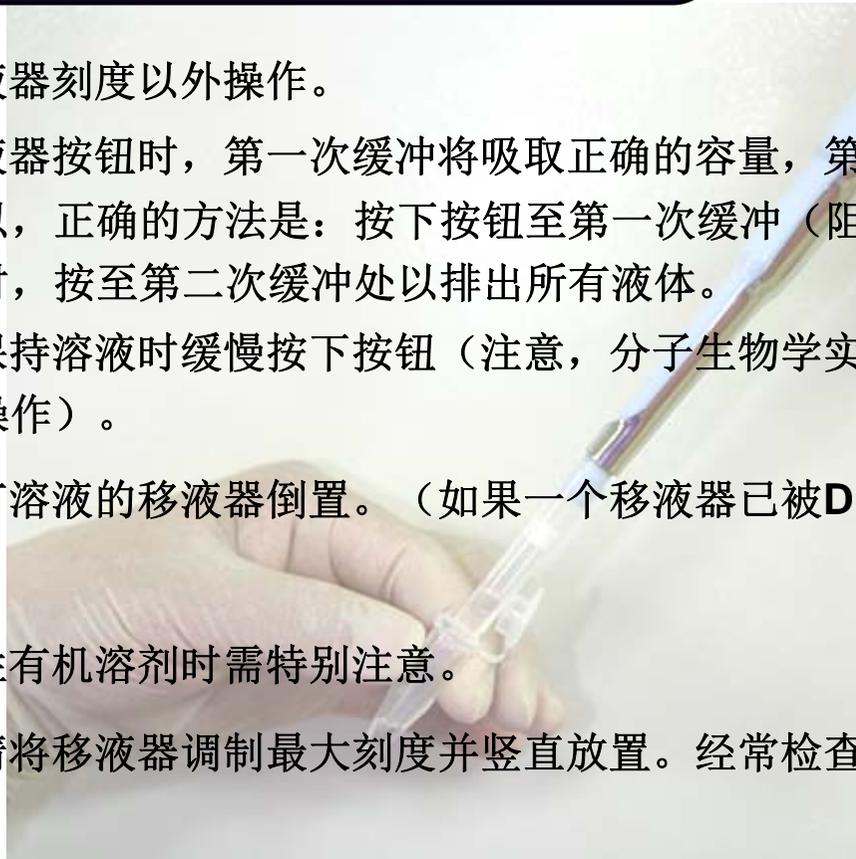


滤芯枪头

# 如何使用移液器

## 1.4 使用移液器 – 注意

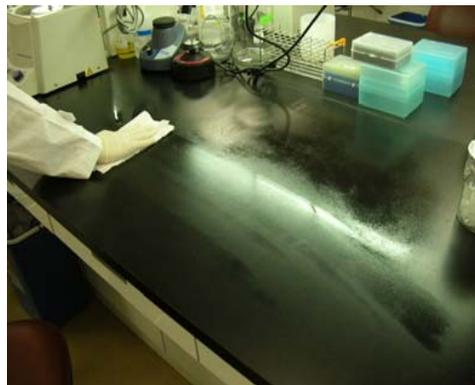
- 不要在移液器刻度以外操作。
- 当按下移液器按钮时，第一次缓冲将吸取正确的容量，第二次缓冲将所有残余液排出。所以，正确的方法是：按下按钮至第一次缓冲（阻力）处，吸取溶液。要排出溶液时，按至第二次缓冲处以排出所有液体。
- 在吸取和保持溶液时缓慢按下按钮（注意，分子生物学实验的所有步骤都应缓慢和正确地操作）。
- 不要将含有溶液的移液器倒置。（如果一个移液器已被DNA污染，此移液器不能再使用。）
- 在处理粘性有机溶剂时需特别注意。
- 使用后，请将移液器调制最大刻度并竖直放置。经常检查移液器以避免误差。



# 分子生物学实验

## 1.1 准备 – 环境和灭菌

- 使用**70%乙醇**喷雾器和手纸来清洁工作台，移液器和手。



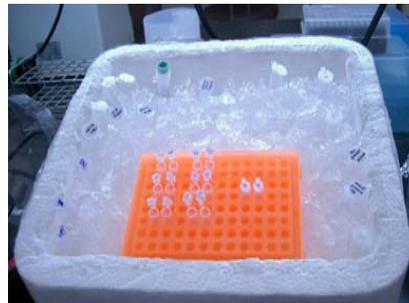
# 分子生物学实验

## 1.2 准备 – 准备设备（冰/冰盒）

- 将所需的冰放入冰盒（或泡沫盒）中。将样本，试剂等置冰中。
- 冰用于保持样本和试剂的稳定。
- 如果没有冰，可用冷盒或者冰架替代。



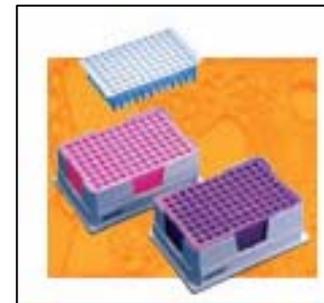
冰盒



泡沫盒



冷盒



冰架

# 分子生物学实验

## 2.1 RNA/DNA的提取 – RNA

**RNA较DNA更不稳定。而且，RNase，一种消化RNA的酶，不能通过高热灭菌清除。因此，简单的蒸煮不能消除RNase。鉴于RNase广泛存在于人的手上和唾液中，细小的误差都可能导致RNase的污染。当进行RNA分离时，切记如下注意事项。**

- **防止RNase损害RNA。**

为了防止环境中的**RNase**污染，试剂中加入一种称为**DEPC**的**RNase**抑制剂。所有的容器只应使用一次，并进行高压蒸汽灭菌或烘烤。佩戴手套，使用专为**RNA**操作准备的容器（鉴于**DEPC**是致癌剂，试验时请务必佩戴手套并在通风橱中进行）。而且，必须防止内源性**RNase**污染-在粉碎细胞时产生。盐酸胍，异硫氰酸胍等试剂可用于此目的。因此，在粉碎细胞以分离**RNA**时的重要原则是立刻用上述试剂处理细胞。

# 分子生物学实验

## 2.1 RNA/DNA 提取 – RNA

- 去除蛋白质。

有很多种方法可供选择，包括酚/氯仿处理或超高速离心。

- 从**DNA**中选择性的提取**RNA**。

常用方法有盐析，反复离心，超高速离心等。

上述的**3**个重点通过应用商业性试剂盒可以很轻易地实现。我们强烈推荐使用我们提供的病毒**DNA/RNA**提取试剂盒来进行**RNA**提取。

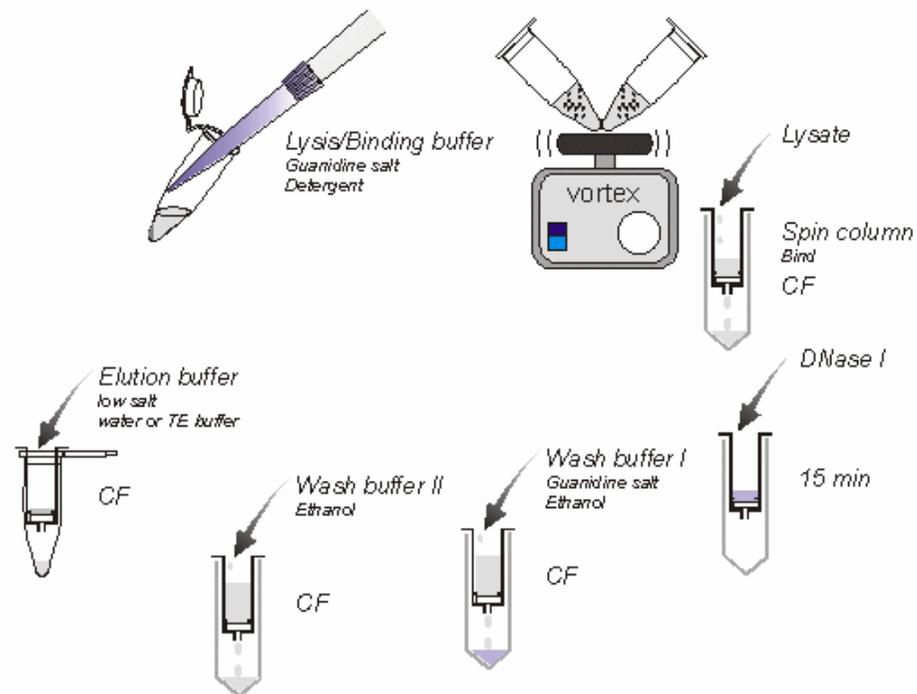
**RNA**提取的样本可以是新鲜或冰冻的血浆，血清，尿液，细胞培养物上清液，无细胞体液，被病毒感染的细胞或组织等等。



# 分子生物学实验

## 2.1 RNA/DNA 提取 – RNA

- 我们推荐的RNA提取试剂盒通过柱析法破裂细胞，将RNA溶于溶剂中，通过多次洗脱方式清除蛋白质等杂质（详情见试剂盒说明书）



# 分子生物学实验

## 2.2 RNA/DNA 提取 – RNA 准备

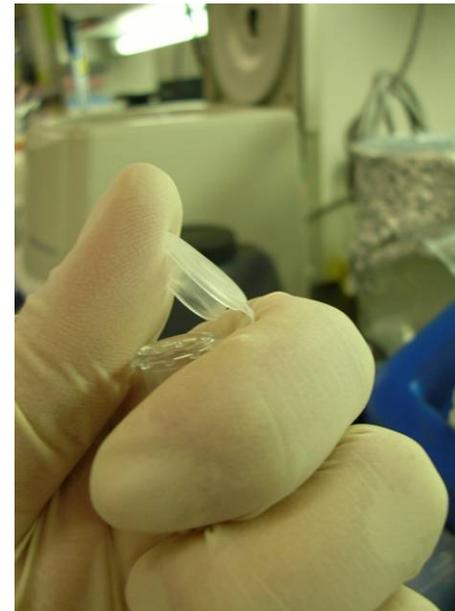
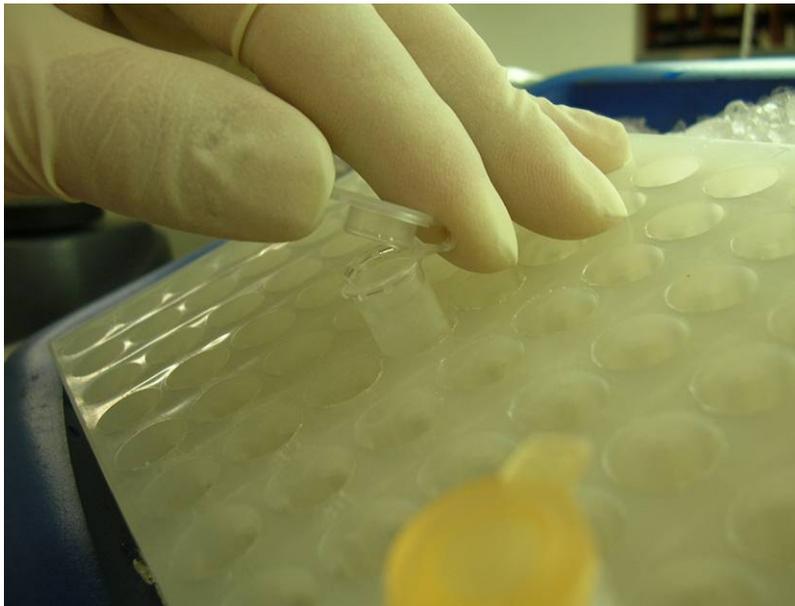
- 如前文所述，处理RNA是必须佩戴手套和口罩。因为RNase很难被抑制并存在于人的皮肤和唾液中。如果被RNase污染，RNA会非常容易被分解。



# 分子生物学实验

## 2.2 RNA/DNA 提取 – RNA 准备

- 在开启和关闭管子时注意不要碰触管盖的内部。



(X)

# 分子生物学实验

## 2.2 RNA/DNA 提取 – RNA 准备

- 从表面提取样本以避免气泡。



气泡  
(X)

# 分子生物学实验

## 2.2 RNA/DNA 提取 – RNA 准备

- 当使用柱析法时，用无RNase的水或灭菌双蒸水仔细并垂直润湿薄膜（从薄膜中部开始，但注意枪头不能接触薄膜）。下图展示了不含收集管（1.5ml）的润湿步骤。在实际试验中，将柱子置于收集管中并使用无RNase水或灭菌双蒸水进行润湿步骤

(O)



(X)

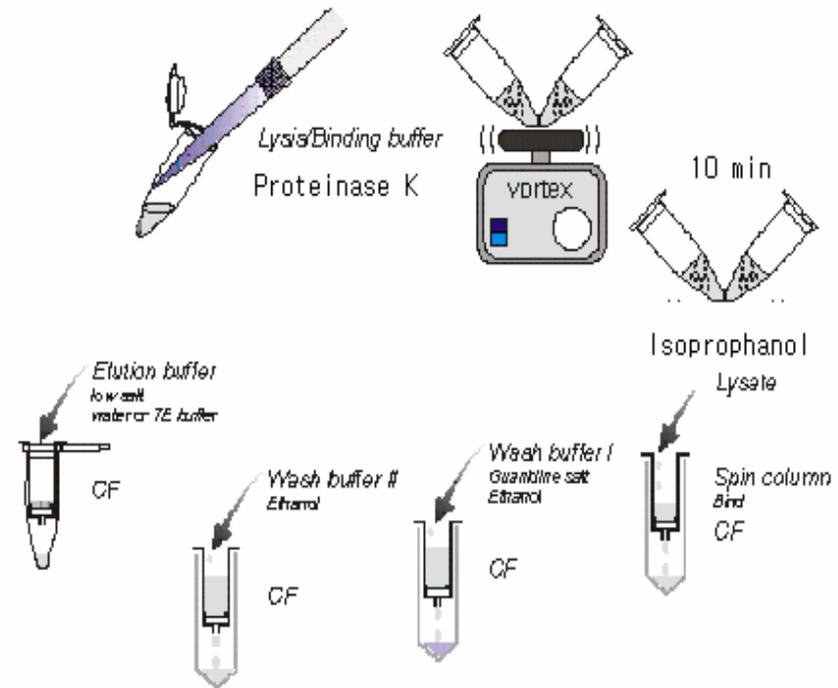


- 提取出的RNA应置-70 °C保存，并通过光谱仪检测RNA的量。

# 分子生物学实验

## 2.3 RNA/DNA 提取 – DNA 准备

- 使用我们推荐的gDNA提取试剂盒进行DNA的提取。gDNA的提取样本可以是血液，淋巴细胞，buffy coat，组织，培养细胞等（详情见试剂盒说明书）。



# 分子生物学实验

## 2.3 RNA/DNA 提取 – DNA 准备

- 从表面提取样本以避免气泡。



气泡  
(X)

# 分子生物学实验

## 2.3 RNA/DNA 提取 – DNA 准备

- 当使用柱析法时，用TE缓冲液或灭菌双蒸水仔细并垂直润湿薄膜（从薄膜中部开始，但注意枪头不能接触薄膜）。下图展示了不含收集管（1.5ml）的润湿步骤。在实际试验中，将柱子置于收集管中并使用TE缓冲液或灭菌双蒸水进行润湿步骤

(O)



(X)



- 提取出的RNA应置-20℃保存，并通过光谱仪检测DNA的量。

# 分子生物学实验

## 3.1 RNA/DNA 的定量 – 测量OD值

- DNA and RNA的定量（定量/定性分析）

当获得DNA或RNA后，可以通过光谱仪检查含量并检测杂质的存在。

光谱仪的原理是检测特定波长的光通过溶液后的光度降低。降低度是由成分和波长决定的，这样就可以测量特殊成分和其他杂质的浓度。

- DNA和RNA吸收260 nm波长的光。

实验显示如下情况时OD（光密度）值为1:

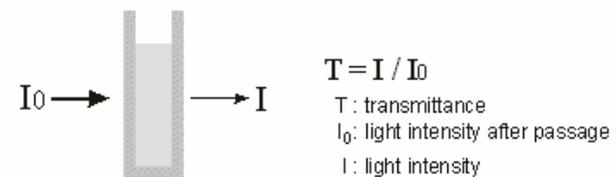
ds DNA的浓度为 50 ug/ml

ssDNA的浓度为 33 ug/ml

RNA的浓度为 40 ug/ml

使用上述数据，可以通过检测OD值判定DNA和RNA的浓度。

### Spectrophotometry



If  $A_{260}$  (absorbance) or O.D.<sub>260</sub> (optical density) = 1

DNA, double strand : 50  $\mu\text{g/ml}$

DNA, single strand : 33  $\mu\text{g/ml}$

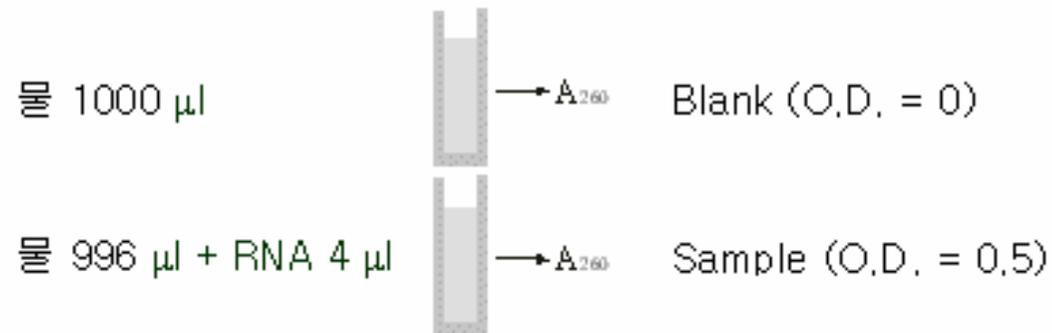
RNA : 40  $\mu\text{g/ml}$

# 分子生物学实验

## 3.1 RNA/DNA的定量 – 测量OD值

- 有些提取的RNA无需定量检测。实际操作中，有一部分样本必须进行稀释并定量分析；实际浓度可以通过乘以稀释率来计算。

분리한 RNA 중 4  $\mu$ l를 정량에 이용한다면



만약 측정한  $A_{260}$  가 위에서처럼 0.5 라면

Cuvette 내 용액의 농도는  $0.5 \times 40$  ( $\mu$ g/ml)

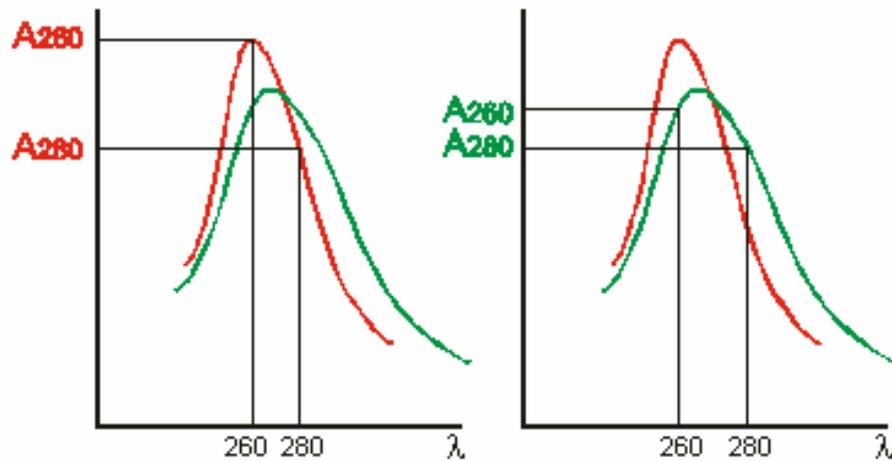
실제 RNA 용액의 농도는  $(0.5 \times 40) / 4$  ( $\mu$ g/ $\mu$ l)

# 分子生物学实验

## 3.1 RNA/DNA的定量 – 测量OD值

- 蛋白质，一种主要的杂质，可以通过280nm波长来检测。总的来说，当A260和A280的比值为1.6-2.0时，可以认为获得了纯DNA或RNA。如下图所示，红色曲线代表纯DNA或RNA，而绿色曲线代表蛋白质污染的程度。

O.D. ratio의 의미



Ideal O.D. ratio :  $A_{260} / A_{280} = 1.6 \sim 2.0$

\*  $< 1.6$  : protein contamination

# 分子生物学实验

## 3.1 RNA/DNA的定量 – 测量OD值

- 下图显示了市面上不同型号的光谱仪。

左图显示一种常见的光谱仪。小容器为盛量溶液的样品池。

右图是一种简便的小型光谱仪（与传统方法相比，无需稀释，直接采用小容积测量（1 ul））。

- 从样本经分离并定量的RNA/DNA将被用于后续的PCR反应。



# 分子生物学实验



## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

- 用于PCR反应的Taq DNA polymerase是一种酶（依靠DNA模版的DNA聚合酶）。因此，它不能直接扩增RNA。当使用RNA作为模版时，必须将RNA通过逆转录反应转化为cDNA。所以，RNA的PCR反应又被称为RT-PCR（逆转录酶-PCR），在RT-PCR中还需要使用到一种依靠RNA模版的DNA聚合酶来从RNA合成cDNA。

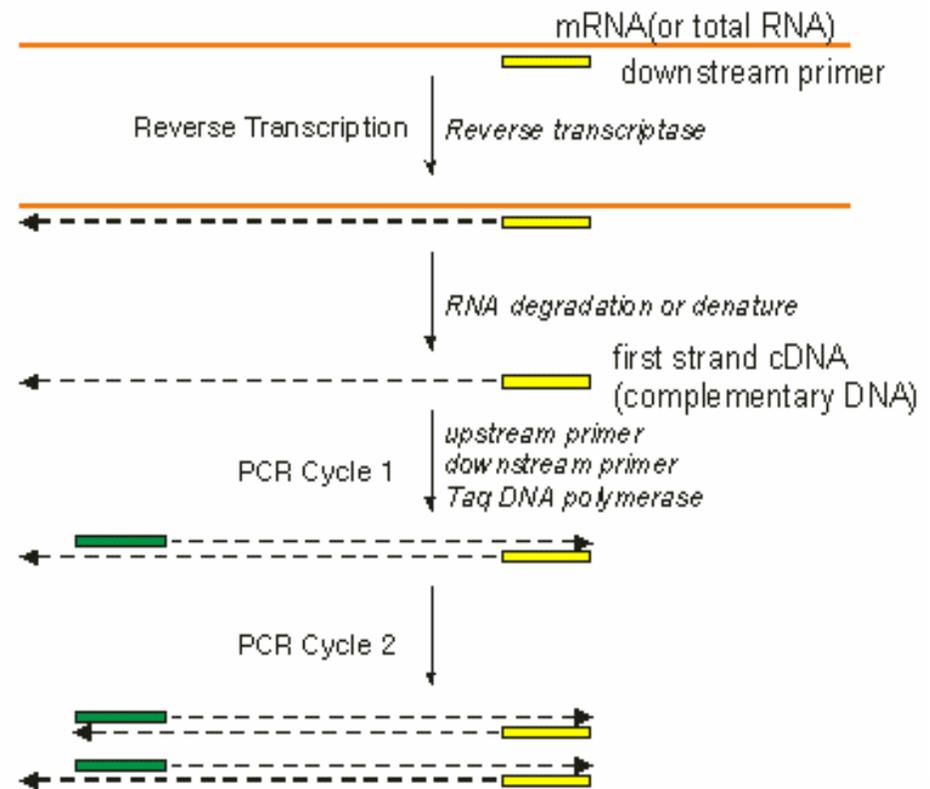
# 分子生物学实验

## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

### ● 逆转录酶-聚合酶链式反应 (RT-PCR)

首先，从逆转录RNA到cDNA。因为RNA是单链的，这里使用的引物仅为下游引物。之后，通过生成的cDNA以普通PCR反应扩增目标基因。

那么，我们如何准备下游引物呢？一般有三种方法：oligo(dT) 引物用于尾端有poly(A)的mRNA；基因特异引物；可以随机结合的随机引物。

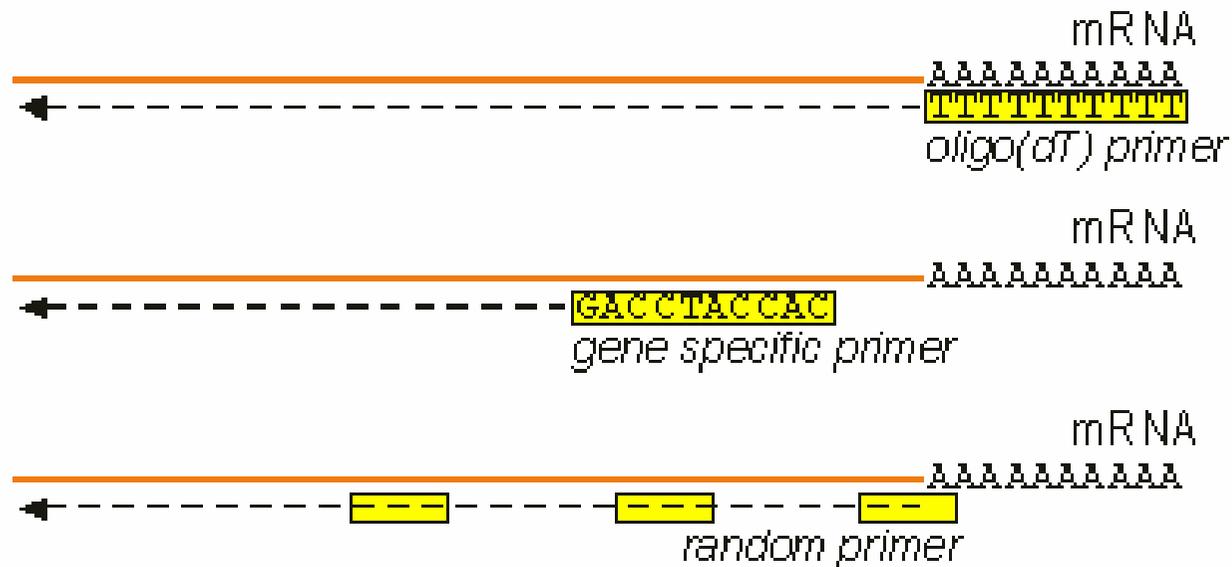


# 分子生物学实验

## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

### ● 下游引物的类型

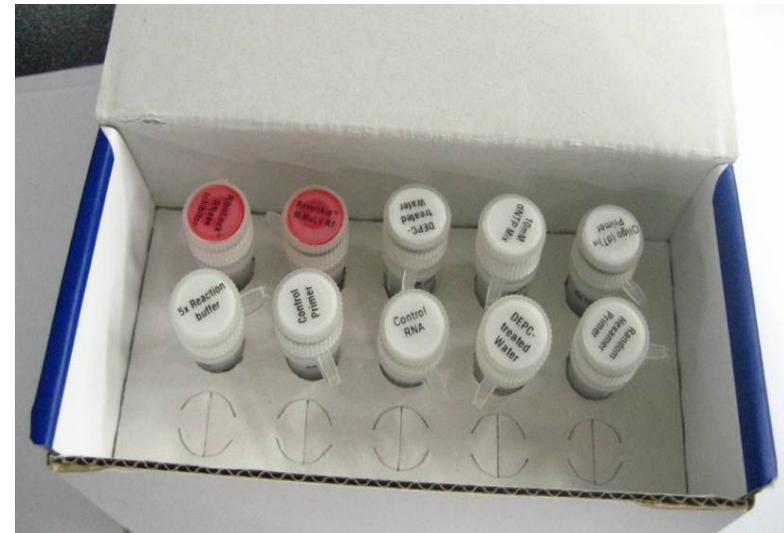
**oligo(dT)**引物分别将不同RNA里的所有mRNA转换为cDNA。基因特异引物只将目标基因转换为cDNA。随机引物（主要是六聚体）是一种引物长度固定而引物序列不固定的引物，使用随机引物可以生成含有不同长度cDNA的cDNA库，所有基因均为cDNA。。



# 分子生物学实验

## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

- 我们推荐的cDNA合成试剂盒含有cDNA合成所需的所有部件，包括前面所述的oligo(dT)引物和随机（六聚体）引物（详情参见产品说明书）。

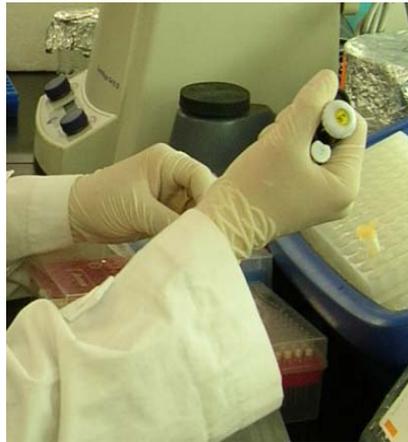


# 分子生物学实验

## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

逆转录（cDNA合成）反应必须按照实际盒内的操作说明进行，注意以下几点。

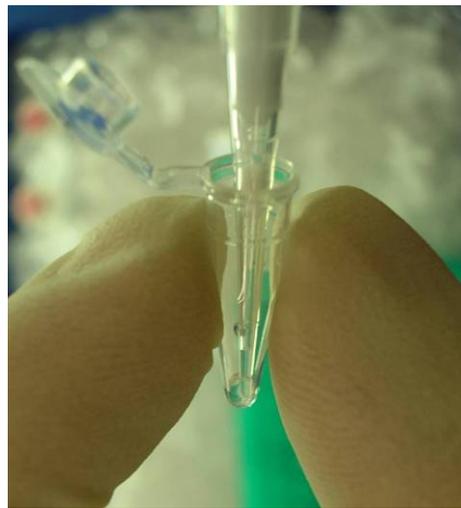
- 在RNA操作时佩戴手套和口罩，并在冰上进行所有操作。



# 分子生物学实验

## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

- 将RNA或试剂移入管中时，注意移液器和枪头不要接触管内壁。
  - 这是为了防止RNase的污染。



# 分子生物学实验

## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

- 将酶置于管中并通过轻叩混匀（切记不要使用振荡器）。
  - 食指轻弹管子的底端以混匀管中的溶液。
  - 仔细观察你会看到管中有一点混浊，轻弹直至混浊消失。



# 分子生物学实验

## 4.1 聚合酶链式反应 – RT-PCR

- 轻叩之后，使用专用离心机进行离心沉降。
  - 这是为了收集附着在管壁的溶液。
  - 沉降后，不要用手停止离心机，否则收集的液体可能又附着在管壁上。等待旋转器自己完全停止再进行操作。

(O)

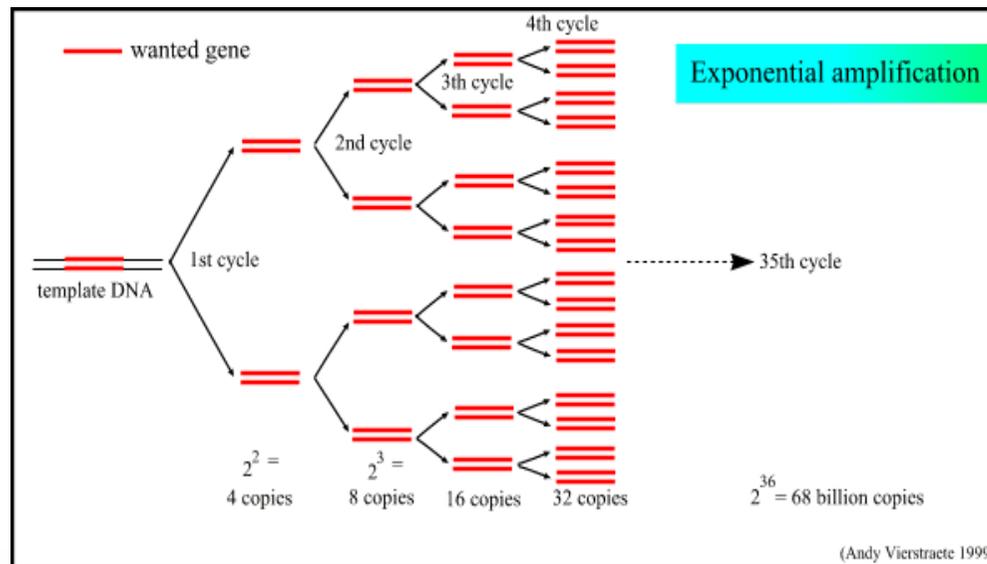


(X)

# 分子生物学实验

## 4.2 聚合酶链式反应 – PCR的原理

- PCR（聚合酶链式反应）是一种在一个反应管中特异地，反复地扩增某一特定DNA片段的DNA分子扩增反应。通过此反应，可以从微量模版合成大量的DNA。因此，可以从大量DNA中特异合成目标DNA，并通过简单的方法如琼脂糖凝胶电泳或者聚丙烯酰胺凝胶电泳来观察。



# 分子生物学实验



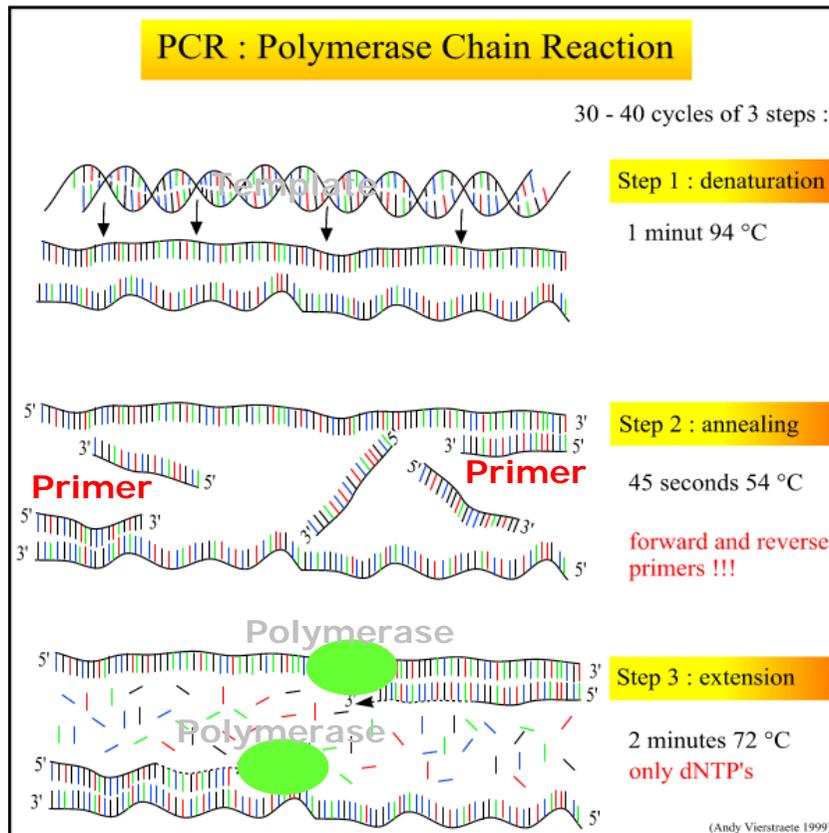
## 4.2 聚合酶链式反应 – PCR的原理

- PCR反应需要如下材料。

1. 模版DNA：用于扩增的DNA（目标DNA）。
2. 一对引物：结合到目标DNA的短序列寡聚核苷酸（18 – 22 mer）。
3. dNTP（dATP, dCTP, dGTP, dTTP）：用于基因合成的原材料。
4. Taq polymerase：热不失活的基因合成酶。

# 分子生物学实验

## 4.2 聚合酶链式反应 – PCR的原理



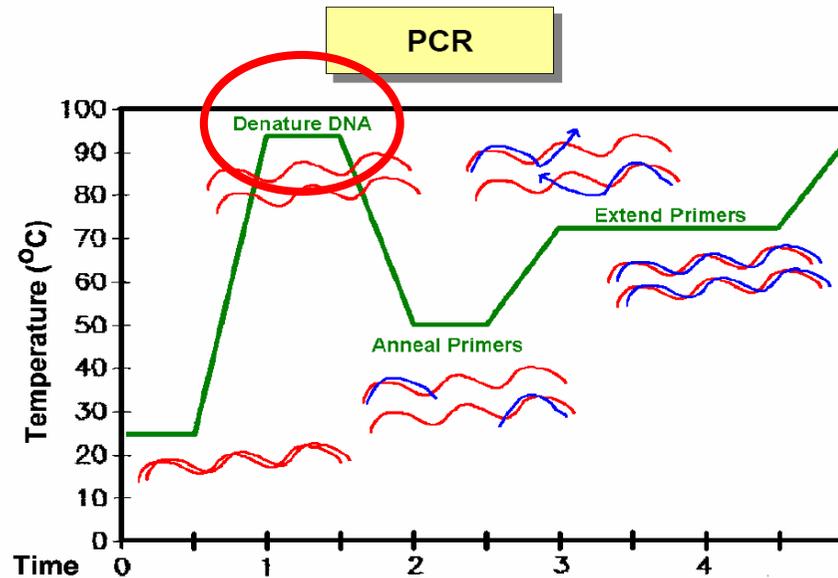
如左图所示，通过变性，退火，以及重复延伸（25-35次）来扩增目标DNA。

简单的来说，将材料放入一个管中，重复进行加热和降温（由机器自动完成），由Taq聚合酶来合成DNA。



# 分子生物学实验

## 4.2 聚合酶链式反应 – PCR的原理

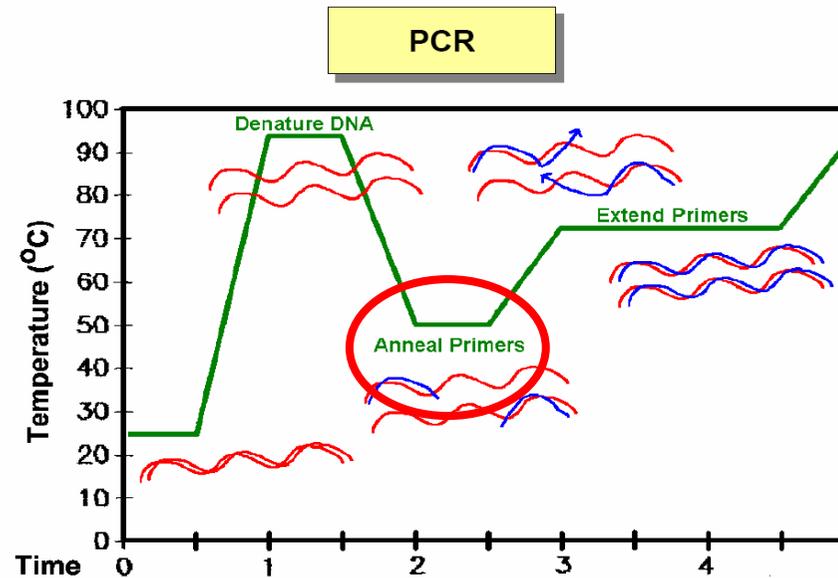


### 1. 变性 (DNA 变性)

通过加热至90-96的步骤将双链DNA分解为单链DNA。温度越高，单链DNA的变性越容易。但是，Taq酶的活性可能会因为高温而降低。通常的温度为94度，此步骤需时5分钟左右来完成DNA的变性。

# 分子生物学实验

## 4.2 聚合酶链式反应 – PCR的原理

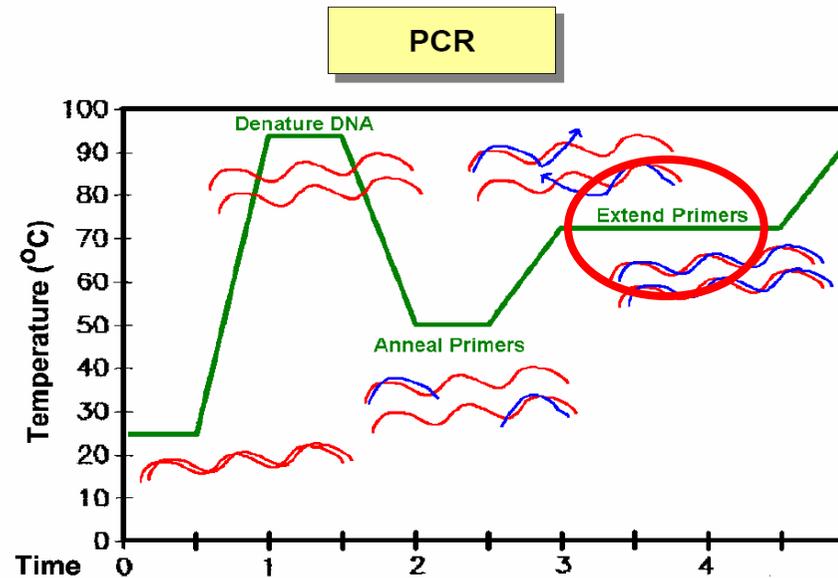


### 2. 退火（引物结合）

引物与单链DNA结合的步骤和变性步骤是分开的，通常反应温度为 $50^{\circ}\text{C} - 65^{\circ}\text{C}$ 。当设计引物时，需要考虑退火温度。退火温度越高，PCR可达到的特异度越高。

# 分子生物学实验

## 4.2 聚合酶链式反应 – PCR的原理



### 3. 延伸 (DNA 合成)

在70°C - 74°C进行。如果目标PCR产物较大或者反应物浓度较低，延伸过程的耗时可能更长。由于Taq酶每分钟可以合成2,000-4,000个核苷酸，对于每kb大小的PCR产物，1分钟时间足够。最后一次循环应该有充足的反应时间，如10分钟。

# 分子生物学实验



## 4.3 聚合酶链式反应 – PCR的应用

### ● 使用PCR方法的实验有如下：

1. Amplification of double stranded DNA cloned for use as a probe
2. Cloning of specific cDNA from a small quantity of mRNA
3. DNA sequencing
4. Mutation test
5. Detection of disease viruses and bacteria
6. Foot-printing of a gene
7. Production of a gene with site-directed mutagenesis

# 分子生物学实验



## 4.3 聚合酶链式反应 – PCR的应用

### ● PCR反应在医疗方面的应用如下：

1. HLA分型
2. 法医学：特定人的基因检测
3. 检测肿瘤基因： **ras, myc, fos, etc.**
4. 基因疾病的检测
5. 传染性疾病的检测

# 分子生物学实验

## 4.3 聚合酶链式反应 – PCR的应用

### ● Seegene提供的检测项目

Cat. No.	Product	Size	Storage
SD2100Y	Seeplex™ STD 6 Detection Kit	50 tests	-20℃
SD2200Y	Seeplex™ STD 4 Detection Kit	50 tests	-20℃
RV1211	Seeplex™ RV Detection Kit - 1	50 tests	-20℃
RV2210	Seeplex™ RV Detection Kit - 2	50 tests	-20℃
RV3210	Seeplex™ RV Detection Kit - 3	50 tests	-20℃
BV1410Z	Seeplex™ HBV Lami-testing Kit	25 tests	-20℃
TB1110Y	Seeplex™ TB Detection Kit - 1	50 tests	-20℃
TB2110Y	Seeplex™ TB Detection Kit - 2	50 tests	-20℃
HP1511Y	Seeplex™ HPV Genotyping Kit - 1	50 tests	-20℃
CV1410Z	Seeplex™ Candida ID Kit - 1	25 tests	-20℃
CA1420Z	Seeplex™ Candida ID Kit - 2	25 tests	-20℃
MT1110Z	Seeplex™ MTHFR Genotyping Kit	25 tests	-20℃
CY1210Z	Seeplex™ CYP2C19 Genotyping Kit	25 tests	-20℃
BC1110Z	Seeplex™ Leukemia BCR/ABL Kit	25 tests	-20℃
PM1110Z	Seeplex™ Leukemia PML/RARa Kit	25 tests	-20℃
AM1110Z	Seeplex™ Leukemia AML1/ETO Kit	25 tests	-20℃
JA1110Z	Seeplex™ JAK2 Genotyping Kit	25 tests	-20℃
FL1110Z	Seeplex™ FLT3 Genotyping Kit	25 tests	-20℃

# 分子生物学实验



## 4.4 聚合酶链式反应 - 注意事项

### ● PCR反应时需考虑如下事项:

1. 当使用相同引物扩增多个病人的几个模版时，可将除模版外的所需成分事先制成混合物以方便操作。
2. **PCR**是非常敏感的反应。如果反应试剂被外源物质或者使用过的枪头污染，很可能造成假阳性。切记将干净的试剂分装成小份。一旦怀疑试剂被污染应立即丢弃。

# 分子生物学实验

## 4.4 聚合酶链式反应 - 注意事项

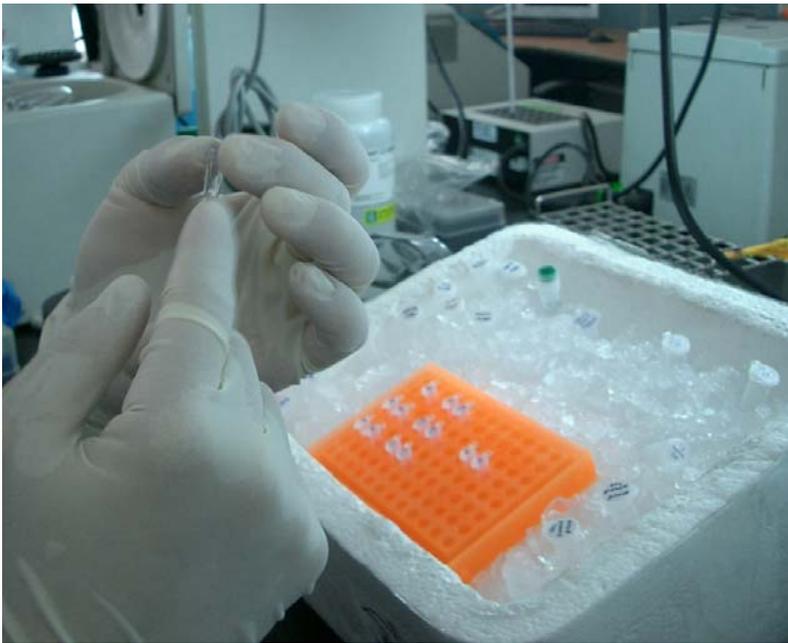
3. 佩戴手套，并在冰上进行实验操作。
4. 样本和cDNA应在最后加入：将样本如图滴在管壁上，同时移液器枪头不能碰触管壁。



# 分子生物学实验

## 4.4 聚合酶链式反应 - 注意事项

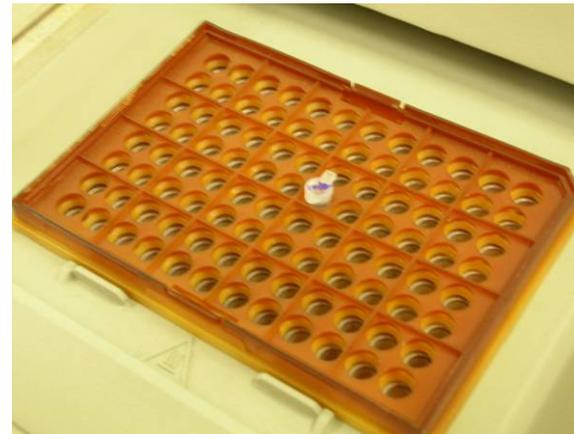
5. 轻叩混匀并用迷你型离心机进行沉降。



# 分子生物学实验

## 4.4 聚合酶链式反应 - 注意事项

6. 在放置入PCR仪之前确保管盖已经盖紧。
  - 如果管盖没有正确关闭，在高温下可能会导致内容物泄露并污染PCR仪。



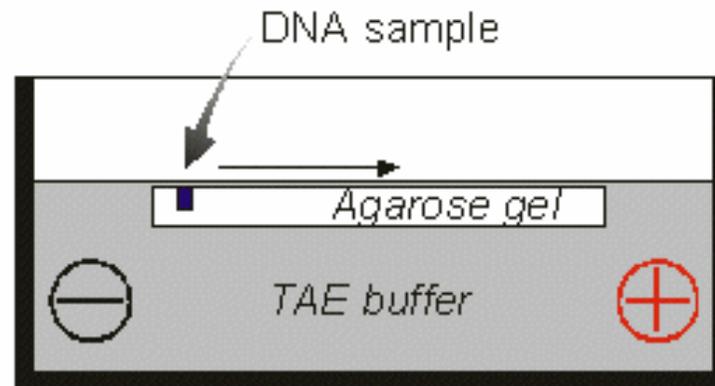
# 分子生物学实验

## 5.1 电泳和结果分析 – 原理

### ● 电泳 (PCR产物电泳)

电泳是通过一定电压环境下凝胶中的样本由于其大小不同而具有不同的迁移速率来进行区分。

### Agarose gel을 이용한 DNA의 전기영동



# 分子生物学实验

## 5.1 电泳和结果分析 – 原理

### ● 电泳的缓冲溶液

用于浸泡凝胶的电泳缓冲溶液有很多种。通常使用**TAE**和**TBE**缓冲液。鉴于这些缓冲液用量很大，建议事先准备并在使用时取少量稀释。

- **TAE**: 用于琼脂糖凝胶电泳
- **TBE**: 用于DNA测序

#### Commonly used electrophoresis buffers

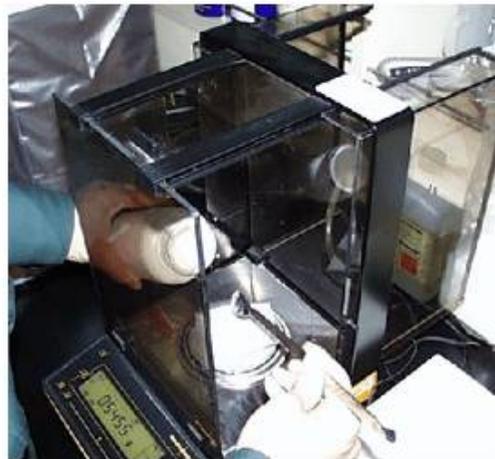
Buffer	Concentrated stock solution (per liter)
Tris-acetate (TAE)	50x 242 g Tris base 57,1 ml glacial acetic acid 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) Generally used for agarose EP
Tris-borate (TBE)	20x 121,1 g Tris base 61,7 g boric acid 7,44 g Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O Generally used for DNA sequencing

# 分子生物学实验

## 5.2 电泳和结果分析 – 制胶

### ● 制作琼脂糖凝胶

先检查凝胶盒，并按下图所示操作：用化学天平称量，加入缓冲液，置于烧瓶中，放入微波炉加热。



# 分子生物学实验

## 5.2 电泳和结果分析 – 制胶

### ● 制作琼脂糖凝胶

琼脂糖为不溶于水的粉末。但是，通过与电泳缓冲液混合并置微波炉中轻微加热可以使之变为透明溶液。如下图所示，瓶体温度较高时请佩戴防热套。



# 分子生物学实验

## 5.2 电泳和结果分析 – 制胶

### ● 制作琼脂糖凝胶

在胶凝结前加入少量的EB，摇动烧瓶混匀。通常情况下，EB为0.5 mg/ml溶液，加入胶液后的浓度为0.5 ug/ml（例，准备100ml的胶液时加入100ulEB溶液）。

如右图所示，EB会插入DNA的双链螺旋中并在紫外线照射下发出荧光。

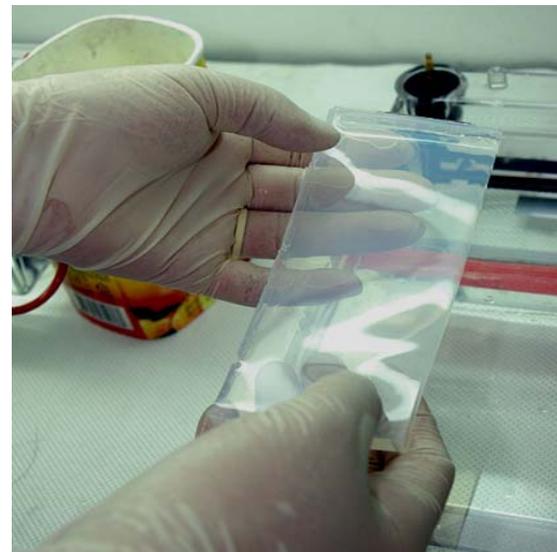
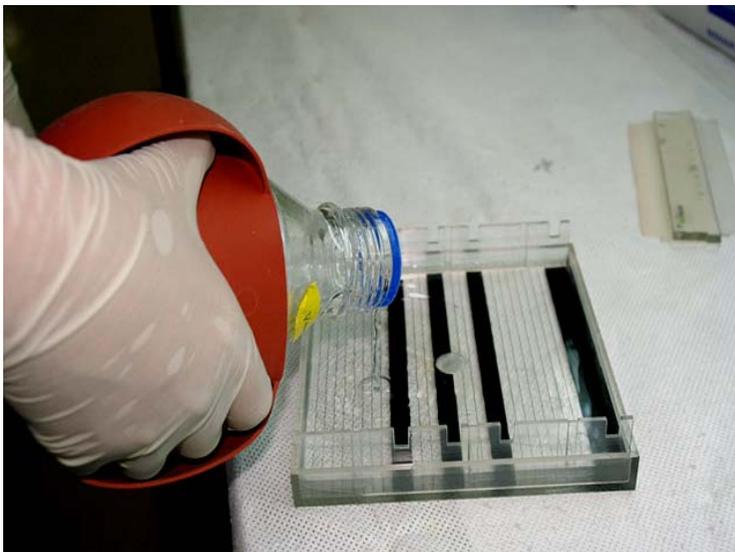


# 分子生物学实验

## 5.2 电泳和结果分析 – 制胶

### ● 制作琼脂糖凝胶

将梳子正确插入制胶盒中，将胶液加入制胶盒，注意消除气泡。静置约**15**分钟后，胶凝固并呈不透明状。移去梳子，加样孔应整齐无破损。

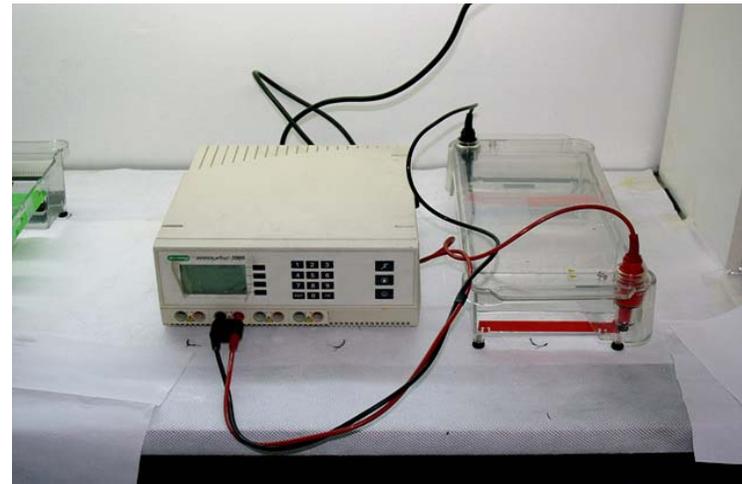
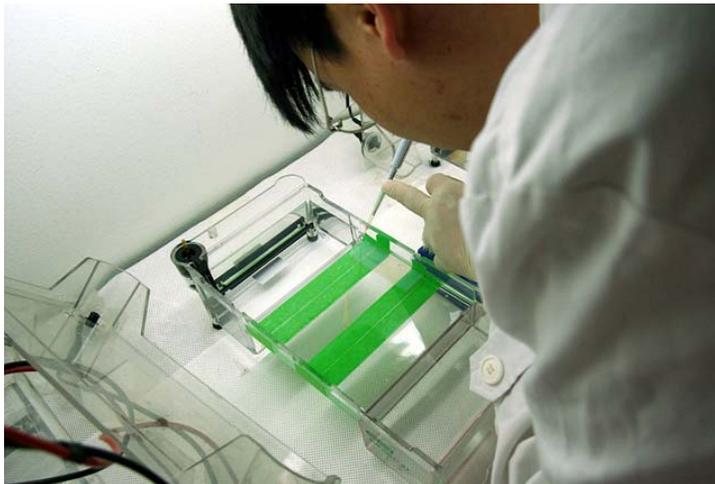


# 分子生物学实验

## 5.3 电泳和结果分析 – 电泳

### ● 电泳

如下图所示，将混有电泳指示剂的**PCR**产物加入凝胶加样孔中。连接电泳仪电源（红色：正极；黑色：负极）并于**100V**电泳**40**分钟左右。

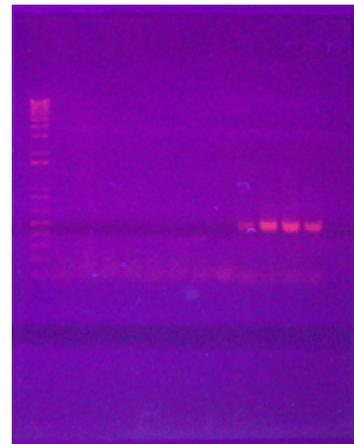
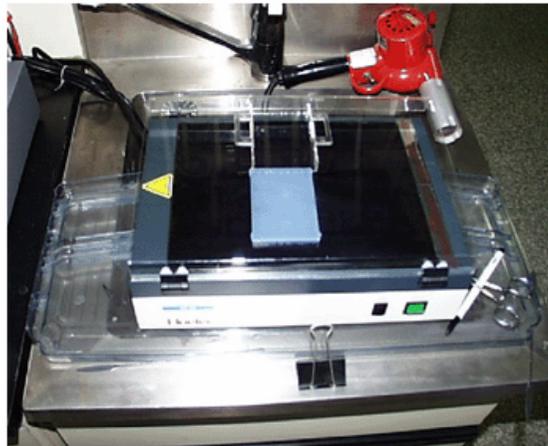


# 分子生物学实验

## 5.4 电泳和结果分析 – 结果分析

### ● 电泳的结果分析

通过观察电泳指示剂的位置来判断电泳的进度。当电泳完成时（通常是指示剂到达胶中部），取出胶并用紫外线透照台检测结果。在紫外线下，**DNA**中的**EB**散发荧光。



# 分子生物学实验

## 5.4 电泳和结果分析 – 结果分析

### ● 电泳结果的分析

使用凝胶成像系统能够获得比紫外线透照仪清晰得多的结果。

