

上海生物样本库
最佳实践规范及标准操作流程
文件汇编
(第二版)

2010年5月

上海生物样本库 质量管理体系文件				
文件名称	PCR 操作规程		编号	SOP-TQ-020-01
批准人		批准日期	实施日期	

PCR 操作规程

1. 目的

规定了聚合酶链式反应 PCR 的操作。

2. 适用范围

适用于从人体体液、细胞、组织等样本中提取和纯化的 DNA 进行聚合酶链式反应 PCR 的操作。

3. 定义和术语

无

4. 职责

4.1 样本库实验人员负责聚合酶链式反应 PCR 的操作。

5. 设备和器材

PCR 仪、0.5ml PCR 管、移液器

6. 正文

6.1 原理

PCR 是一种级联反复循环的 DNA 合成反应过程。一般由三个步骤组成：模板的热变性，寡核苷酸引物复性到单链靶序列上以及由热稳定 DNA 聚合酶催化的复性引物引导的新生 DNA 链延伸聚合反应的过程。

6.2 试剂准备

6.2.1 10x 扩增缓冲液

500 mmol/L KCl

100 mmol/L Tris-Cl (pH8.3 室温下)

15 mmol/L MgCl₂

在 15psi 高压下蒸汽灭菌 10 分钟，分装贮存于-20℃。

6.2.2 4 种 dNTP 贮存液 (20 mmol/L, pH8.0)

6.2.3 热稳定 DNA 聚合酶

6.2.4 正向引物和反向引物 (20umol/L)

6.2.5 模版 DNA，溶解在 10 mmol/L Tris-Cl (pH7.6) 溶液中。

6.3 PCR 试验

6.3.1 按次序，将以下各成分加入 0.5ml 灭菌 PCR 管中：

10x 扩增缓冲液 5ul

20 mmol/L 4 种 dNTP 混合液 (pH8.0) 1ul

20 umol/L 正向引物和反向引物 各 2.5ul

1-5U/ul 热稳定 DNA 聚合酶 1-2 单位

无菌水 28-33ul

模版 DNA 5-10ul

总体积 50ul

6.3.2 如 PCR 仪没有加热盖，在反应混合液上层加一滴轻矿物油 (约 50ul)，防止样品在 PCR 反应循环中蒸发，反应结束后可用 150ul 氯仿抽提去除。放置 PCR 管在 PCR 仪上。

6.3.3 在 PCR 仪中按下列程序开始循环：

A. 预变性 94℃ 5 分钟

B. 变性 94℃ 30 秒

退火 37-65℃ (根据引物决定) 30 秒

延伸 72℃ 1 分钟

循环 30-50 次

C. 终延伸 72℃ 10 分钟

6.3.4 将扩增 DNA 产物分析和保存。

7. 相关文件

无

8. 参考标准与文献

《分子克隆实验指南》第三版，ISBN 7-03-010338-6