

PCR 实验操作注意事项

PCR 技术具有重复性好、灵敏度高、快速简便等突出优点，是科研研究最常用到的技术之一。但是由于灵敏度高，实验操作人员细微的操作失误就可能导致产生污染或没有扩增出目的条带，因此 PCR 实验对操作有一定的要求。

本文对 PCR 实验操作中的注意事项、PCR 实验污染问题及预防措施做一介绍。

PCR 实验操作注意事项

材料准备

- PCR 所用试剂除 buffer 外均不宜反复冻融，试剂最好分装使用。
- 模板：PCR 所用的模板一般稀释至纳克数量级，用量不宜过多，模板浓度过高会导致 PCR 实验失败（[如何确定模板的用量？](#)）。同时模板内避免含有酶抑制剂、蛋白酶、核酸酶等物质。
- 引物：详细引物设计原则请参见“[PCR 引物设计](#)”一文。反应体系中引物浓度要合适，太高容易引起错配及非特异性产物的形成。
- 酶：为了降低非特异性反应，酶最好最后加入 PCR 反应体系中。
- dNTP：四种 dNTP 的浓度要相同且浓度不宜过高，否则会引起错配。

实验操作

- 对照设置：最好设置阳性、阴性对照。设置阳性对照可证明实验体系正常，防止 PCR 抑制造成的假阴性。阴性对照可验证是否存在基因组 DNA 的污染。
- 添加试剂：PCR 试剂对温度十分敏感，最好需要通过冰浴使得 PCR 试剂和 PCR 板/管处于 0℃，所有试剂加好后要混匀。
- 电泳检测：扩增产物最好在 48h 以内检测，有些最好于当日电泳检测，大于 48h 后带型不规则甚至消失；

[PCR 常见问题分析及解决方法介绍](#)

PCR 污染问题

PCR 实验中一个令人头痛的问题是易污染，极其微量的污染就可造成假阳性结果。导致污染的原因有：

样本污染：收集标本的容器被污染；标本放置时，由于密封不严溢于容器外；容器外沾有标本造成交叉污染

试剂污染：在 PCR 试剂配置过程中，由于加样器、容器、双蒸水及其它溶液被 PCR 核酸模板污染；

PCR 产物污染：最主要的污染源。如果在 PCR 实验过程中形成了气溶胶（在空气与液体面摩擦时、在操作时比较剧烈的摇动反应管，开盖时、吸样时及污染加样器的反复吹打都可形成气溶胶，一个气溶胶可含 48000 拷贝），则气溶胶可能对之后进行 PCR 扩增实验产生污染。

防止措施

- 实验分区：将实验分在 4 个区域进行，分别为试剂储存和准备区，样品制备区，扩增区，扩增产物分析区。各个区域相互独立，仪器设备和各种物品分开，不能串用；
- 实验前后按要求作好实验室的清洁消毒工作，特别是实验完成后，消毒工作一定要彻底，破坏残留的 DNA；
- 降低 PCR 实验的频率（例如能一次做 50 个，不要分开 5 次每次做 10 个）；
- 在 PCR 实验操作过程中，工作人员都必须戴手套，并经常更换（加模板 DNA 后必须更换）；
- 每次实验前应做好吸嘴、Rppendorf 管、反应管、加样器、离心管等物品的高温消毒。常规消耗用品用后作一次性处理，避免反复使用造成污染；
- 试剂管用前先瞬时离心（离心 10s），使液体沉于管底，减少污染手套与加样器机会；
- 引物稀释时，要首先瞬时离心，以避免粉末状引物在开盖时弹出管外；
- 正确使用加样器：吸样时要特别小心应缓慢匀速，避免液体溅到加样器头上，尽量一次性吸完，忌反复多次抽吸，以免交叉污染或产生气溶胶。打出液体后拇指不应松开按钮，将吸嘴压掉后再将拇指松开，避免液体回吸；

更多优质服务推荐

1

SingleB® mAb Discovery Service

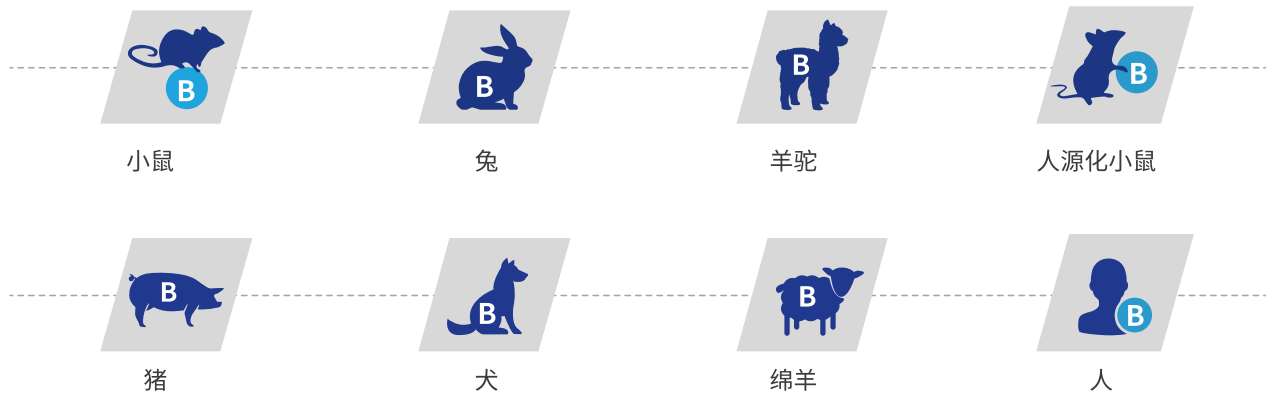
SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务,利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台,实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象,从动物免疫到获得单抗,快至29天,比传统杂交瘤技术至少节省120天。

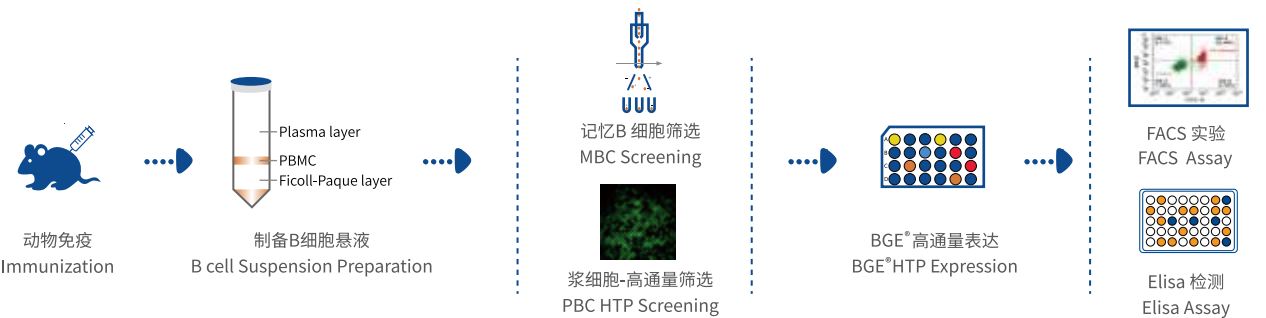
平台优势

- | | |
|--------------------------|-------------------------|
| 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等多种类型抗原免疫 | 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选,保证B细胞多样性 |
| 单细胞扩增阳性率高,无需刺激培养,减少多样性损失 | 重轻链天然配对,亲和力更优 |
| 高通量,周期短,单抗发现快至29天 | ELISA、FACS、WB、IHC等多平台验证 |

可开发单抗物种



服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

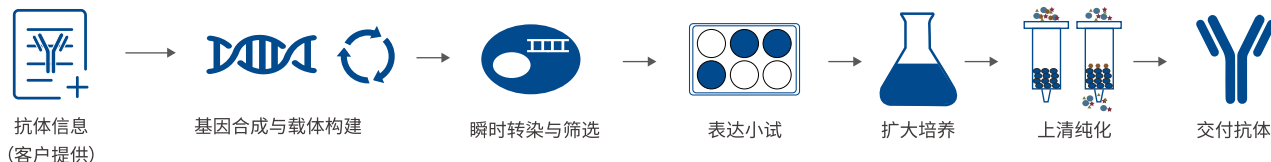
重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、 $(\text{Fab}')_2$ 、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

服务优势



服务流程

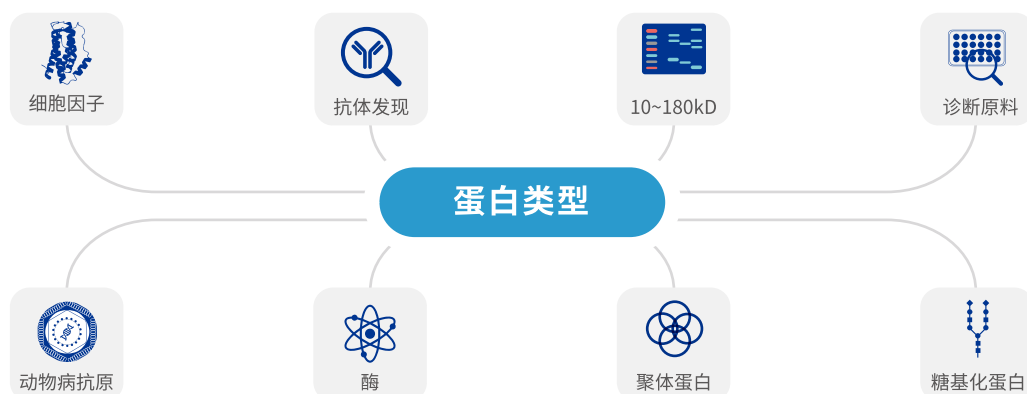


Recombinant Protein Expression Service

重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术,能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

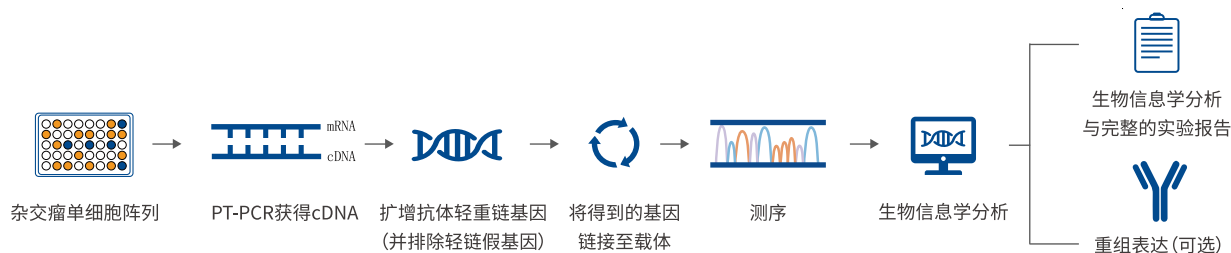
应用场景

- 抗体序列保护:获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份:杂交瘤存在退化转阴风险,抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造:获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

服务优势

- 极速体验:测序5天,表达5天,全程高通量
- 细胞需求少:只需1~5个细胞,可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确:采用Failsafe®假基因排除技术,可排除κ轻链假基因
- 测序范围广:可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务:德泰生物拥有丰富经验,可提供表达验证服务

服务流程



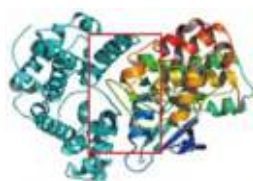
5

Biomolecular Interaction Analysis Service

分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振 (SPR) 平台及生物膜干涉技术 (BLI) 平台,能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比, 具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

检测范围



蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度>90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

服务流程

- 1 Antibody sequence confirmation
- 2 Human germline acceptor selection
- 3 CDR grafting
- 4 Back mutation
- 5 Mutation energy ranking
- 6 Antibody expression
- 7 Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

服务流程



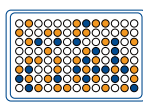
基因合成&质粒抽提



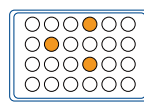
稳定转染



On-chip筛选



压力筛选



扩大培养



交付单克隆细胞株

服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株
较传统方法快近100天



百k级筛选通量

一次筛选640k细胞
优选高表达细胞株



可视化筛选结果

先进DeepLight®平台
高表达细胞株实时成像



稳定高产

可稳定转代50代
重组单抗可达5 g/L