

正交试验在选择聚合酶链反应最适条件中的应用

孙晨光^① 罗超权 伍新尧 杨英浩 扶庆国

(中山医科大学生化教研室;广州,510089)

主题词 聚合酶链反应; 研究设计

中图分类号 Q 3-3

聚合酶链反应(PCR)是80年代兴起的一种体外DNA扩增技术。它能快速特异地扩增目的基因或DNA片段,已经广泛地应用于分子生物学的各个领域。由于PCR是一种微量的多因素参与的酶促反应,尤其是对 Mg^{2+} 、模板DNA、引物、dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP的统称)等因素反应十分敏感。不同的PCR实验都有自己的最适反应条件。此外,各个实验室的条件(如仪器设备和试剂等)均不相同,即使文献报道成功的PCR扩增条件,在不同的实验室也不一定能获得最佳效果。因此,实验者每建立一种新的或引用他人的PCR检测方法时,仍需自己摸索反应条件。传统的办法是固定其它因素,每次只改变其中的一个因素,对比实验结果,找出该因素的最适条件。然后用同样的方法找出其他因素的最适条件。这时若要确定4个因素(Mg^{2+} 、模板DNA、引物、dNTP)3个不同浓度水平的最佳搭配的实验条件

时,需进行81次试验才能达到目的。这样十分繁琐费时,而且因没有考虑到各因素之间的相互影响,故得出的“最适条件”不一定就是最合适的。

我们根据统计学原理,利用正交试验,确定引物、模板DNA、 $MgCl_2$ 和dNTP 4种反应物为影响PCR扩增结果的主要因素,扩增产物电泳后照像经图像分析仪得到各管产物的产量(以灰度计算),再按“信号/噪音比”公式计算评估扩增效应。据此来确定各反应成分的最佳比例。

再按照正交实验所得的结果指导以后的实验,结果均十分满意,特异性扩增条带清晰,无非特异性扩增产物,实验的重复性好。因而我们认为这是一种值得推广的新方法

(1996-07-22收稿 1996-11-16修回)

(上接封2)

外,对多次IVF周期失败,或前次IVF周期中受精率 $<20\%$ 的不育症患者也是一个适当的选择。

ICSI法受精与正常受精过程相当或更快,本研究中有10%的异常受精率,考虑与注射时精卵不处于绝对相同的细胞分裂周期有关^[3]。ICSI受精机理与穿刺卵膜,回收部分胞浆以及将精子注入胞浆后退针,精子制动等过程与激活卵子有关,但仍存在一些影响精卵结合并进一步生长发育的有关因素,有待进一步研究。

- 1 Palermo G, Joris H, Devroey P, *et al.* Pregnancies after intracytoplasmic injection of a single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 1992, 340: 17
- 2 庄广伦, 周灿权, 张秀俊, 等. 体外受精精-胚胎移植34例报告. *生殖医学杂志*, 1992, 1(1): 20
- 3 Edwards, RG. Cell cycle factors in the human oocyte and the intracytoplasmic injection of spermatozoa. *Reprod Fertl*, 1995, 7: 143

参 考 文 献

(1996-09-23收稿 1996-10-07修回)

^① 1953年出生,男,讲师,本校在职申请学位人员