

PCR 技术原理 · 深度版

从「变性-退火-延伸」到「Ct 值、熔解曲线、防污染」，用大白话 + 文献把分子诊断的核心技术讲透，每个环节对应宝锐货号。销售应对客户技术质疑的底气来源。

BIORI BIOTECH · 刘子研新手上手包 · 诊断原料（核酸扩增）

目录：① PCR 三步循环 → ② 实时荧光定量 qPCR → ③ 探针法 vs 染料法 → ④ 逆转录 → ⑤ UNG 防污染 → ⑥ 热启动 → ⑦ 性能指标 → ⑧ LAMP 等温扩增 → 参考文献

① PCR 三步循环 —— 分子的「复印机」

PCR（聚合酶链式反应）的本质，是用一对引物把目标 DNA 片段在体外反复复制。每经历一个「变性→退火→延伸」的温度循环，目标 DNA 数量就翻一倍，n 个循环后放大到原来的 2^n 倍 —— 30 个循环就是约 10 亿倍。这就是它能把极微量的病毒核酸「放大到能看见」的根本原因。

三步温度循环

变性
94–98°C

退火
50–65°C

延伸
72°C



变性：高温把双链「拉开」成单链；**退火：**降温让引物结合到目标位点；**延伸：**聚合酶顺着引物合成新链。周而复始，指数扩增。

关键点

- 变性温度不够 → 解链不彻底，扩增失败
- 退火温度是关键：太高引物不结合（假阴性），太低非特异结合（假阳性）
- 延伸时间由片段长度和酶的延伸速率决定（Taq 约 1 kb/min）

对应宝锐货号

E20/FE20 Robustart Taq QS II

M2181 FastAmpli Premix

客户自配体系买酶，图省事买预混液（酶 + dNTP + 缓冲液已配好）。

 Saiki RK et al. (1988) Science 239:487–491 — 首次用耐热 Taq 酶实现自动化 PCR，是 PCR 走向实用的里程碑；
Mullis KB & Faloona FA (1987) Methods Enzymol 155:335–350 — PCR 原理奠基。

② 实时荧光定量 qPCR —— 边扩增边「数数」

普通 PCR 是「扩增完再看结果」，qPCR 则是每个循环都测一次荧光。荧光强度反映产物量，把每个循环的荧光连起来，就得到一条 S 形的**扩增曲线**：基线期（信号淹没在背景里）→ 指数期（每循环翻倍）→ 平台期（原料耗尽）。

扩增曲线与 Ct 值



Ct 值（循环阈值）：荧光信号首次超过阈值线时的循环数。Ct 越小 = 初始模板越多。样本里病毒越多，Ct 就越小（比如 20 vs 35）。

为什么 Ct 能定量？

因为扩增是指数的，初始模板量每差 10 倍，Ct 大约就差 3.3 个循环。用已知浓度的标准品做出「浓度—Ct」标准曲线，就能把未知样本的 Ct 换算成浓度。

对应宝锐货号

M2181-4 FastAmpli Premix-UNG IV

M2071 Superstart Premix

Probe qPCR 预混液 = 探针法定量专用。

 Higuchi R et al. (1993) Nat Biotechnol 11:1026—1030 — 首次实现 PCR 扩增的实时荧光监测，奠定 qPCR 基础。

③ 探针法 vs 染料法 —— 两条「发光」路线

qPCR 靠什么发光？两种主流化学：TaqMan 探针法和 SYBR 染料法。这是客户最常问、也最容易分不清的点。

TaqMan 探针法

特异性最高，多重检测首选

探针两端带**荧光基团** (5') 和**淬灭基团** (3')，完整时不发光

扩增时酶用 5'→3' **外切酶活性**把探针「咬断」，**荧光基团**和**淬灭基团**分离 → 发光

只认特定序列 → **特异性高**，一管可装多个探针做**多重检测**

成本较高，需专门设计探针

SYBR 染料法

便宜通用，特异性靠熔解曲线

染料结合**任何双链 DNA**就发光，不需探针

便宜、通用 → 适合初筛、大量样本

会结合非特异产物/引物二聚体 → **特异性弱**

靠**熔解曲线**（看产物 T_m 值）判断特异性

对应宝锐货号：宝锐主推 **Probe qPCR 预混液**（探针法），货号 **M2181 FastAmpli**

M2071 Superstart

M5244 Neoscript RT

。客户做多联检（呼吸道多合一）、要求特异性，推探针法体系。



Holland PM et al. (1991) PNAS 88:7276–7280 — 首次利用 Taq 酶 5'→3' 外切酶活性水解探针（TaqMan 原理）。

④ 逆转录 —— 让 RNA 也能测

很多病毒（新冠、流感、艾滋病）基因组是 RNA，而 PCR 只能扩增 DNA。所以要先**逆转录**：用**逆转录酶**把 RNA 复制成互补 DNA（cDNA），再进入 PCR。

一步法 vs 两步法

- **一步法 (One-step)**：逆转录 + qPCR 同一管完成，省事、污染风险低 → 宝锐 RT 预混液主形态
- **两步法 (Two-step)**：先单独逆转录成 cDNA，再 qPCR，更灵活、适合大量样本复用 cDNA

对应宝锐货号

E13/FE13 Neoscript RTase （逆转录酶，自配体系）

M5244 Neoscript Fast RT Premix MD2104 SensiDirect RT Premix （一步法预混液）

销售要点：客户问「你们逆转录酶耐不耐高温？」—— 高温逆转录能打开 RNA 二级结构，效率更高、假阴性更少。Neoscript RTase 耐高温是卖点。

 Verma IM (1977) Biochim Biophys Acta 473:1–38 — 逆转录酶经典综述。

⑤ UNG/dUTP 防污染 —— 防止「假阳性」

qPCR 最大的敌人是**气溶胶污染**：上一次扩增的产物飞溅到空气里，污染下一次反应，造成「样本没病毒却测出阳性」（假阳性）。防污染的成熟方案是 **UNG/dUTP 体系**：

1. 反应里用 **dUTP 代替 dTTP**，扩增产物里就带「尿嘧啶 U」标记
2. 反应前加 **UNG 酶**（尿嘧啶 DNA 糖基化酶），它专切含 U 的 DNA
3. 上轮残留的产物（含 U）被 UNG 降解，真正的样本（含 T，不含 U）不受影响

对应宝锐货号：宝锐预混液**标配 UNG**（货号名里的「-UNG」就是防污染），如

M2181 FastAmpli Premix-UNG IV ；也可单独买 **E01 UNG** 搭配自配体系。

 Longo MC et al. (1990) Gene 93:125–128 — 首次提出用尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG/UNG）控制 PCR 交叉污染。

⑥ 热启动 —— 消灭「低温错配」

PCR 配液时温度低，酶可能提前工作，把错配的引物「乱扩」，产生非特异产物。解决方法是**热启动 (Hot Start)**：常温下抑制酶活性，升温到变性温度后才激活。

两种热启动修饰

方式	原理	特点
抗体修饰	抗体堵住酶活性中心	激活快、无需额外步骤
化学修饰	化学基团修饰酶	更稳定、但需短时高温激活

对应宝锐货号：**E20/FE20 Robustart Taq QS II**（热启动 Taq）、**E03 HS Taq**、**E29 Neoscript RTase HS**（热启动逆转录酶）。「QS」「HS」就是热启动的标志。

 Chou Q et al. (1992) Nucleic Acids Res 20:1717–1723 — 热启动 PCR 提升低拷贝扩增的经典研究。

⑦ 性能指标 —— 客户拿来「比货」的硬指标

客户对比原料时，盯的就是这几个数。能看懂、能解释，才算「懂技术」的销售。

指标	含义	好坏的判断
灵敏度 / LOD	能可靠检出的最低浓度	越低越好，如「5 拷贝/反应」
特异性	只扩增目标、不碰非目标	熔解曲线单峰、无非特异扩增
扩增效率	每循环模板翻倍率	90–110% 为佳（理想 100%）
线性范围	Ct—浓度线性对应区间	越宽越实用
批间差	不同批次性能一致性	越小越好，原料厂核心竞争力
稳定性	储存/冻融后性能不衰减	冻融耐受次数、货架期

 Bustin SA et al. (2009) Clin Chem 55:611–622 — **MIQE 指南**，qPCR 实验设计、执行、报告的国际标准，客户质疑数据时可用它作权威依据；2025 年已更新为 MIQE 2.0。

⑧ LAMP 等温扩增 —— 不要 PCR 仪的快检

LAMP（环介导等温扩增）在恒定温度（60–65℃）下就能扩增，不需要反复升降温度，因此不需要昂贵的 PCR 仪，非常适合 POCT、现场快检、基层检测。核心是 Bst DNA 聚合酶（具链置换活性）。

对应宝锐货号： PFHW1007 Lamp Premix Plus （Bst2.0/3.0 热启动）、 FE103 Bst 2.0 HS （Bst 酶）。

 Notomi T et al. (2000) Nucleic Acids Res 28:e63 — LAMP 技术奠基论文。

参考文献

1. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335–350.
2. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988;239:487–491.
3. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *PNAS* 1991;88:7276–7280.
4. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nat Biotechnol* 1993;11:1026–1030.
5. Longo MC, Berninger MS, Hartley JL. Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 1990;93:125–128.
6. Chou Q, Russell M, Birch DE, Raymond J, Bloch W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Res* 1992;20:1717–1723.
7. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000;28:e63.
8. Bustin SA, Benes V, Garson JA, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009;55:611–622.
9. Verma IM. The reverse transcriptase. *Biochim Biophys Acta* 1977;473:1–38.