

# 聚合酶链式反应技术在DNA检测中的应用与优化

许云斐\*

(安徽新莱蒂克司法鉴定中心, 合肥 230031)

**摘要:** 聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术能够在体外快速扩增特定脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)片段, 这对于提高DNA检测灵敏度与效率有着重要意义, 同时, 还能确保科研人员在微量样本中获取充足的DNA量, 在这一特性的支持下使得PCR技术开始广泛应用到食品安全检测、医学诊断以及疾病监测等领域。基于此, 本文探究PCR技术在DNA检测中的应用, 阐述该技术在疾病诊断、食品检测以及古生物学等领域的应用情况, 同时从引物设计、反应条件以及反应体系等方面入手, 探究PCR技术在DNA检测中的优化路径, 旨在推动PCR技术在生命科学领域的进一步发展, 也为相关研究提供更为高效的技术支持。

**关键词:** 聚合酶链式反应技术; DNA检测; 应用场景; 优化方向

## 0 引言

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)作为分子生物学核心技术, 是脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)检测与分析的关键手段, 广泛应用于医学检验、食品安全、环境监测等多个领域, 为精准识别核酸序列提供重要理论与技术支撑。当前, 随着检测场景不断拓展, 对DNA检测的特异性、灵敏度和准确性要求持续提高, 传统PCR技术在复杂样本检测、低丰度模板扩增等方面仍存在局限, 相关优化研究已成为行业热点。基于此, 本文围绕PCR技术在DNA检测中的应用展开系统梳理, 探讨针对性优化路径。通过分析技术原理与实践应用的适配性, 提出改进策略, 以期提升检测效率与精准度, 降低应用成本, 为PCR技术在多领域的规范化、高效化应用提供参考, 更好地满足社会各领域对DNA检测的现实需求。

## 1 PCR技术在DNA检测中的应用

### 1.1 在亲子鉴定中的应用

PCR技术以其高灵敏度、高特异性和高效扩增能力, 已成为DNA检测领域的核心技术, 广泛应用于法医鉴定、疾病诊断、物种溯源与亲子鉴定等领域<sup>[1]</sup>。其中, 亲子鉴定是其最为成熟和普及的应用方向之一。在亲子鉴定实践中, 首先从被鉴定人(父母与子女)的血液、口腔黏膜细胞等易得样本中提取基因组DNA。随后, 利用PCR技术特异

性扩增短串联重复序列(short tandem repeat, STR)位点, 这些位点具有高度多态性, 并且遵循孟德尔遗传规律: 子代在每个STR位点上的2个等位基因, 必有一个源自父亲, 一个源自母亲。通过对PCR扩增产物进行毛细管电泳和基因分型, 对比亲代与子代间的STR位点匹配情况, 即可计算亲权指数及累积亲权指数。该技术具有检测周期短、样本需求量少、准确率极高等优势, 既能满足个人亲缘关系确认的需求, 也能为司法鉴定提供权威的科学依据, 是目前亲子鉴定领域的主流技术<sup>[2]</sup>。

### 1.2 在疾病诊断中的应用

现阶段, PCR技术已经能够被成熟应用到医疗行业疾病诊断领域, 尤其是在遗传性疾病与传染性疾病检测中更具优势<sup>[3]</sup>。遗传性疾病是由于患者遗传物质发生改变而引发的疾病, 以囊性纤维化(cystic fibrosis, CF)为例, 该疾病因囊性纤维化跨膜传导调节因子(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR)基因突变而导致, 患者将会出现呼吸道以及消化系统功能异常等情况, 目前已知的CFTR基因突变类型高达2000余类, 其中最常见的是 $\Delta F508$ 突变。在PCR技术应用中, 实验人员首先会从患者的口腔黏膜等样本中提取DNA组织并通过PCR扩增, 在扩增后便可通过直接测序法等识别基因突变类型与区域。此外, 实验人员还可采用等位基因特异性PCR(allele-specific PCR, AS-PCR)技术, 与直接测序法相比, 该方法操作更为简便、检测成本更低, 且能快速实现对特定突变位点的精

准判定。AS-PCR 的操作过程更为简单且更加快速,因此非常适合应用于大规模筛查。将 PCR 技术应用到 CFTR 基因检测中,一方面能够在确定病情后尽早干预治疗,另一方面还可以应用于遗传风险评估当中,如针对有遗传病史的人群,通过 PCR 技术检测 CFTR 基因突变能够有效评估其后代患 CF 的可能性,并以此为生育提供科学决策<sup>[4]</sup>。此外,PCR 技术在传染性疾病预防中同样具备显著优势,随着人口流动的加快以及生态环境的恶化,目前各类传染性疾病均呈现出快速传播趋势。引发新冠肺炎传染病的新冠病毒为 RNA 病毒,在病原体检测过程中技术人员首先需要将病原体 RNA 逆转录为 cDNA,随后便可以通过荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 技术进行扩增,此项检测技术的原理是依据荧光基因的荧光信号以实现 PCR 扩增产物量的检测,进而实现对新冠病毒核酸的定性定量分析<sup>[5]</sup>。

### 1.3 在食品安全检测中的应用

目前,PCR 技术主要应用于食品病原体、转基因等成分检测中<sup>[6]</sup>。以食品中的病原体检测为例,病原体是引发食品污染的首要原因,近些年 PCR 技术凭借其特异性强、灵敏度高优势,已经成为食品病原体检测的关键技术。食品中常见的病原体包括细菌、真菌以及微生物等,以大肠杆菌与沙门氏菌为例,当消费者摄入病原体超标的食品后会出现头晕、恶心以及呕吐等情况,严重时甚至会危及患者的生命。应用 PCR 技术检测食品病原体时首先要做好样本前处理,如实验人员需要将细菌等病原体从食品中分离并提取基因组 DNA<sup>[7-8]</sup>。其次需要依据病原体特异性基因序列设计引物,如针对大肠杆菌的 *uidA* 基因以及针对沙门氏菌的 *invA* 基因等,完成上述准备工作后进入 PCR 扩增环节,若食品中含有目标病原体,那么在扩增阶段将会出现目标 DNA 片段,在完成扩增后实验人员可通过凝胶电泳进行初步检测,或者通过荧光定量 PCR 技术进行定量分析<sup>[9]</sup>。美国食品药品监督管理局提供的数据表明,食源性疾病的发生与食品生产加工环节存在密切联系,因此将 PCR 技术应用到食品致病性微生物检测中,能够从源头处预防食源性疾病。如在肉类产品加工前企业检测机构可使用 PCR 技术对原材料中的沙门氏菌、李斯特菌以及大肠杆菌等进行检测,或者在生产完成后将该技术应用到抽样检测中,以此从源头处确保消费者的饮食安全。与传统检测技术相比,PCR 技术可在数小时内得到检测结果,因此非常适用于大批量食品快速检测,并助力食品企业及时发现安全隐患<sup>[10-11]</sup>。

## 2 PCR 技术在 DNA 检测中的优化策略

### 2.1 引物设计优化

引物设计是确保 PCR 实验成功的基础,且引物的设

计质量将会直接决定 DNA 扩增的特异性<sup>[12]</sup>。为此,实验人员在技术应用中首先需要掌握引物设计原则,通常情况下其长度需要控制在 15~30 bp 之内,且理想长度范围是 18~27 bp,最大不宜超过 38 bp。若引物过长,延伸温度将会超过 Taq DNA 聚合酶的最适合反应温度,进而将会对扩增效率造成影响。此外,引物的 GC 含量通常需要保持在 40%~60%之间,若超过这一范围,那么引物的退火时间将会升高,且容易出现与模板结合困难的情况,相反的是,若达不到这一区间,则会对引物的稳定性造成影响,同时还会出现非特异性结合<sup>[13]</sup>。此外,在检测过程中还需要确保引物 GC 含量相一致,防止因差距过大而对扩增效果造成影响。在检测过程中若发现常规引物无法满足检测需要,那么就需要设计非常规引物。首先,巢式引物作为一类常见的特殊引物,其可以依托两轮 PCR 反应以增强扩增特异性,首轮 PCR 中使用一对外部引物扩增目标区域,产物可作为第二轮 PCR 模板,在第二轮中使用一对内部引物,这对引物位于第一轮扩增产物的内部。这种方式能够高效控制非特异性扩增,同时确保扩增的特异性<sup>[14-15]</sup>。

### 2.2 反应条件优化

首先,温度设计将会直接影响扩增效率和特异性,且在变性、退火等阶段均需做好温度参数优化。在变性阶段,DNA 双链解离一方面会受时间影响,而另一方面则会受到温度影响,通常情况下初始变性温度为 94 °C,时间为 2~5 min,此时模板 DNA 将被解链为单链,若温度或者时间达不到要求,将会对 DNA 双链解离造成不利影响,进而影响到扩增效率<sup>[16]</sup>。研究表明,温度过低时扩增产物量下降,非特异性条带增加;而当温度过高时,如 98 °C 下虽然能够确保 DNA 完全变性,但是高温环境下 DNA 聚合酶活性将会受到影响,进而对酶的使用寿命造成影响。此外,实验人员需要依据引物 Tm 值确定退火温度,通常情况下退火温度要低于 Tm 值 3~5 °C,此外实验人员可以通过公式(1)估算 Tm 值:

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T) \quad (1)$$

式中: Tm 为引物解链温度, °C; G、C 分别为引物序列中鸟嘌呤、胞嘧啶碱基数量, 个; A、T 分别为引物序列中腺嘌呤、胸腺嘧啶碱基数量, 个。

但在实际检测中考虑到引物与模板结合的复杂性,还需借助实验进行优化。退火温度较高情况下将会引发结合不稳定问题,相反则会出现非特异性结合情况,并由此产生非特异性扩增产物。最后,延伸温度与时间是决定 DNA 聚合酶合成新链效率与准确性的关键因素,最适宜 Taq DNA 聚合酶的延伸温度是 72 °C,该温度下 Taq 酶活性将达到最高状态,并有利于新 DNA 链的合成。在循环次数优化中,PCR 反应初期时 DNA 片段将会成倍增长,但是经过数次循环后扩增产物量的增长将会受到限制,部分情况下甚至还会出现下降情况,这是因为在反应过程中核昔三

磷酸(nucleoside triphosphate, NTP)等成分逐渐被消耗,且反应过程产生的非特异性产物也会对扩增造成影响<sup>[17-18]</sup>。为此,实验人员需要确定最合适的循环次数并依此开展预实验,实验阶段实验人员需设计不同的循环次数并进行 PCR 扩增,预实验完成后通过电泳结果以确定最为合适的循环次数,大部分 PCR 实验最佳循环次数为 30~35 次,但是针对扩增片段较长等特殊情况时,则需要考虑适当延长循环次数<sup>[19]</sup>。

### 2.3 反应体系优化

实验人员可以通过酶的选择、dNTP 优化等对反应体系做出优化<sup>[20]</sup>。以酶的选择为例,实验人员首先可以选择使用 Taq 聚合酶,其在热稳定、扩增效率等方面有着独特优势,但是其在使用过程中也会产生非特异性扩增问题,因此 Taq 聚合酶仅适用于对保真度要求不高的实验检测中,而 Pfu 聚合酶、Phanta 聚合酶等属于保真酶,其错误率要明显低于 Taq 聚合酶,因此在测序等对保真度要求较高的扩增实验中应当优先选择使用 Pfu 聚合酶等。除了酶的选择之外,实验人员还需充分考虑酶的热稳定、持续合成能力等,如热稳定较高的酶能够确保在整个循环过程中始终保持最佳状态,而持续合成能力反映了 DNA 聚合酶在解离之前在合成新链的过程中能够整合的核苷酸数量,对于长片段 DNA 的合成尤为重要<sup>[21]</sup>。

## 3 结束语

综上所述,PCR 技术凭借高特异性、高灵敏度等优势已经成为 DNA 检测中的核心工具,且已经广泛应用到食品、医疗等各个领域,这为 DNA 精准检测提供了强有力的技术支撑。因此,为充分发挥 PCR 技术优势,实验人员有必要通过引物设计优化、反应条件优化以及反应体系优化持续提升技术稳定性,从而为生命科学研究提供更为精确的技术解决方案。

### 参考文献

- [1] 张强,王雅彤,敦晓旭,等. 实时荧光定量 PCR 技术在药品生产过程中微生物快速检测的验证与应用[J]. 中国处方药, 2025, 23(21): 23-27.
- [2] 庞磊. 法医物证中亲权鉴定的现状及其伦理问题[J]. 现代养生, 2023, 23(4): 315-318.
- [3] 邵燕琴,朱明智,梅宾,等. GeneXpert MTB/RIF 和 TB-DNA 两种荧光 PCR 检测技术检测脓液标本对骨关节结核的诊断价值[J]. 浙江医学, 2025, 47(21): 2336-2340.
- [4] 余尚倍. 转基因食品定量 PCR 检测技术分析[J]. 中外食品工业, 2025(21): 94-96.
- [5] 刘明月,李慧婷,付欣悦,等. 3 种分子检测技术在人源干细胞种属鉴别和细胞交叉污染检测上的应用研究[J]. 药物分析杂志, 2025, 45(10): 1649-1659.
- [6] 丁洪锋. 实时荧光定量 PCR 技术在天等辣椒酱常见致病菌检测中的应用与综合效益评估[J]. 食品安全导刊, 2025, 19(30): 101-105.
- [7] 张静,吉旭瑶,迟伟群,等. 数字聚合酶链反应技术在 DNA 甲基化检测中的应用[J]. 检验医学与临床, 2025, 22(19): 2732-2736.
- [8] 卜菁. 新型 PCR 技术在食品微生物快速检测中的应用与优化[J]. 中国食品工业, 2025(19): 94-96.
- [9] 陈雨萱,陆亮,方敏瑶,等. 基于环境 DNA 多重 PCR 技术的大藻入侵监测引物开发与验证[J]. 上海海洋大学学报, 2025, 34(5): 968-977.
- [10] 卢其馨,官俊峰,杨芳. 高灵敏 HBV-DNA 检测技术在乙肝两对半诊断中的应用价值[J]. 实验室检测, 2025, 3(17): 211-213.
- [11] 张翼飞,丁博. PCR 技术在乳制品细菌检测中的应用研究[J]. 食品安全导刊, 2025, 19(25): 153-155.
- [12] 盛桂莲,吴恋娟,赖旭龙. 古 DNA 实时荧光定量 PCR 实验中标准品的制备[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26(4): 386-391.
- [13] 谢新娜,邱满艳,张锡茹,等. 基于 CRISPR/Cas12a 的乳制品中荧光假单胞菌荧光检测技术的建立[J]. 食品科学, 2025, 46(23): 13-20.
- [14] 田钊. 基于 PCR 技术的食品微生物检测探究[J]. 工业微生物, 2025, 55(4): 58-60.
- [15] 王静,张兴吉. PCR 技术在食品微生物检测中的应用与优化[J]. 现代食品, 2025(15): 134-136.
- [16] 安红玉. 环介导等温扩增技术快速检测呕吐毒素产生菌的研究[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2025.
- [17] 孔国红,梁佳. 核酸分子检测技术在食品药品检测中的应用探析[J]. 现代食品, 2025(14): 165-167.
- [18] 牛青青. PCR 技术应用于沙门菌检测中的进展研究[J]. 当代医药论丛, 2025, 23(19): 117-119.
- [19] 黄一鸣,王慧珍,向国旗,等. 数字 PCR 技术在植物病原物检测中的应用[J]. 中国农业科技导报(中英文), 2026, 28(2): 128-136.
- [20] 邓云金,蒙嘉鹏. 基于 PCR 的食品微生物安全检测技术探析[J]. 中外食品工业, 2025(12): 46-48.
- [21] 王越,曹焜其,丛文杰,等. PCR 技术快速检测食源性致病菌的进展[J]. 工业微生物, 2025, 55(3): 73-78.