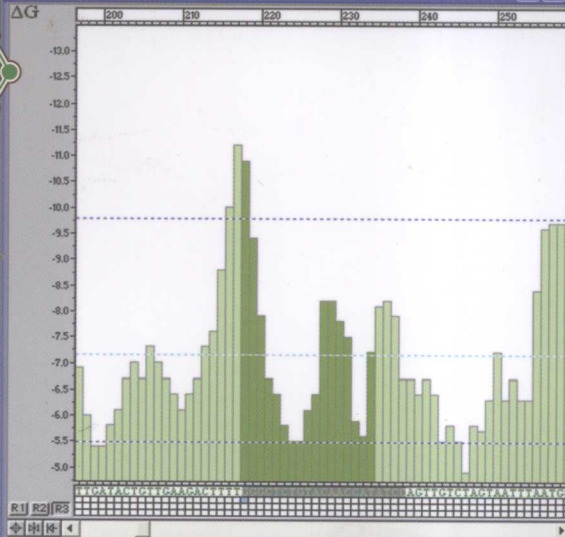




药
学
实
验
室
技
术
系
列



PHARMACY LAB TECHNIQUE SERIES

PCR聚合酶链反应

• 刘森 主编

PCR

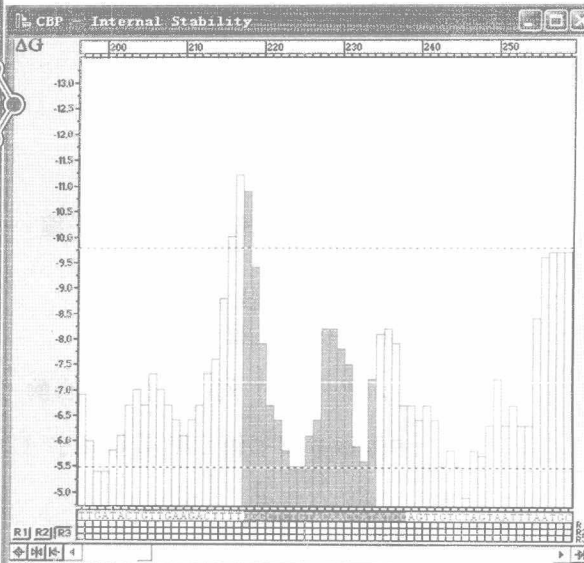
POLYMERASE CHAIN REACTION



化学工业出版社
生物·医药出版分社



药
学
实
验
室
技
术
系
列



PHARMACY LAB TECHNIQUE SERIES

N₁C

PCR

聚合酶链反应

· 刘森 主编

PCR

POLYMERASE CHAIN REACTION



化学工业出版社
生物·医药出版分社
· 北京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

PCR 聚合酶链反应/刘森主编. —北京: 化学工业出版社, 2009. 1

(药学实验室技术系列)

ISBN 978-7-122-03138-9

I. P… II. 刘… III. 聚合酶-链式反应 IV. Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 090487 号

责任编辑: 杨燕玲 韩文阳

装帧设计: 韩 飞

责任校对: 李 林

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京云浩印刷有限责任公司

装 订: 三河市前程装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 16½ 字数 304 千字 2009 年 1 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 36.00 元

版权所有 违者必究

目 录

原 理 篇

第 1 章 PCR 技术基本原理	3
1.1 基本原理	3
1.2 PCR 反应动力学	5
1.3 PCR 技术的特点	6
1.4 PCR 反应体系的组成	6
1.5 PCR 所需设备和器材	9
参考文献	9
第 2 章 PCR 技术的发展	11
2.1 PCR 新技术的发展	11
2.2 其他核酸扩增技术的发展	15
参考文献	18
第 3 章 PCR 技术在医学研究领域中的应用	19
3.1 PCR 在医学检验中的应用	19
3.2 对 PCR 技术医学应用的正确认识	21
3.3 PCR 技术在医学应用中的管理	22
参考文献	23

操作方法/技术篇

第 4 章 常规 PCR	27
4.1 常规 PCR 反应体系说明	27
4.2 PCR 操作	27
4.3 PCR 条件优化	48
参考文献	55
第 5 章 反转录 PCR	57
5.1 RT-PCR 原理	57
5.2 RNA 的提取和纯化	60
5.3 RT-PCR 的操作	66
5.4 衍生技术——基因表达系列分析	82
参考文献	85
第 6 章 实时荧光定量 PCR	87
6.1 原理	87
6.2 实验操作与优化	89
6.3 实时定量 PCR 数据分析	93
6.4 qPCR 的常用软件——Primer Express	99
6.5 qPCR 仪的选择	107

参考文献	112
第 7 章 免疫 PCR	115
7.1 原理	115
7.2 实验操作	121
7.3 条件优化	125
参考文献	128
第 8 章 利用 PCR 构建突变体	131
8.1 定点突变	131
8.2 随机诱变 PCR	144
8.3 衍生技术	147
参考文献	155
第 9 章 未知序列的克隆	157
9.1 RNA 连接酶介导的 cDNA 5'末端快速扩增	157
9.2 单侧特异性引物扩增未知 DNA 序列	161
9.3 反向 PCR	163
参考文献	166
第 10 章 其他医学领域常见 PCR 技术	167
10.1 PCR 技术应用于病原微生物检测鉴定	167
10.2 遗传性疾病诊断的常用 PCR 技术	175
10.3 PCR 技术在肿瘤方面的应用	182
10.4 甲基化特异性 PCR	186
参考文献	193
第 11 章 PCR 软件使用	195
11.1 Oligo 6 的使用	197
11.2 PerlPrimer 的使用	206
11.3 引物在线设计	210

常见问题解答

1 为什么完全没有 PCR 扩增产物?	215
2 为什么除目的条带外, 还出现多条非特异扩增条带?	215
3 为什么目的条带未出现但有非特异扩增条带出现?	216
4 为什么 PCR 产物很少?	216
5 为什么同一批 PCR 反应中包括阴性对照在内的平行管出现相同的阳性结果?	216
6 为什么 PCR 产物出现片状拖带或涂抹带?	216
7 如何提高 PCR 的保真度?	217
8 如何减少 PCR 污染?	217
9 如何特异扩增极微量的目的基因片段?	217
10 如何确定最适退火温度?	217
11 如何进行长片段 PCR 扩增?	218
12 如何提高 PCR 的特异性?	219
13 RNA 制备过程中如何避免 RNase 污染?	219
14 进行 RNA 相关实验时, 塑料制品、玻璃和金属物品需要怎么	

处理?	219
15 什么时候需要分离 mRNA?	220
16 如何判定分离的总 RNA 的纯度?	220
17 提取 RNA 时什么时候需要加入 RNA 载体?	220
18 如何除去纯化的 RNA 中微量的基因组 DNA?	220
19 纯化的 RNA 样品如何保存?	220
20 组织和细胞样品如何收集和保存?	220
21 如何估计 RNA 的产量?	220
22 RNA 制备过程中哪个环节要特别注意?	221
23 RT-PCR 要求模板 RNA 的 260nm/280nm 的值最低为多少, 如果 太低是不是会影响结果?	221
24 RT-PCR 时的引物设计是不是一定要先知道目的基因的序列?	221
25 如何选择 RT-PCR 的方法?	221
26 RT-PCR 的常用内标 β -actin 和 GAPDH 的使用是否有选择性, 比如 不同的细胞、不同的刺激?	221
27 如何确定 PCR 的线性期?	222
28 引物的特异退火温度怎样设定? 是否可以根据 GC 和 AT 含量算出? 是否可以用引物报告单上的 T_m 值?	222
29 PCR 时 20 μ L 体系中 cDNA 应加多少比较合适? $MgCl_2$ 应加多少? 各个成分的量有无确定标准? 20 μ L 是指体积还是量?	222
30 PCR 结果进行电泳, actin 有, 但无其他目的条带, 有几种原因? 是否 与 cDNA 的量少有关? Mg^{2+} 太多是否会抑制 Taq 酶的活性?	223
31 RT-PCR 的引物如何设计?	223
32 如何确认 RNA 的质量?	224
33 RT-PCR 中的定量如何控制?	225
34 RT-PCR 的实验设计需注意哪些事项?	225
35 RT-PCR 结果可以代替蛋白表达的结果吗?	226
36 DNA 残留是否会影响 RT-PCR?	226
37 RT-PCR 定量测定中产物长度是否有限制?	226
38 RT-PCR 中内参照的意义是什么?	226
39 RT-PCR 中应选择什么作为内参照?	226
40 RT-PCR 定量实验中的凝胶成像要注意什么?	226
41 提取 RNA 时沉淀 RNA 步骤要注意什么?	227
42 RNA 的保存要注意什么?	227
43 从临床样品中提取 RNA 有哪些注意事项?	227
44 PCR 基因诱变的意义是什么?	227
45 定点突变时, 转化率低或仅能得到很少菌落怎么办?	227
46 怎么解决定点突变中低突变率的问题?	228
47 如何避免 PCR 定点诱变中出现的假阳性问题?	228
48 怎样控制 PCR 随机基因突变的突变率?	228
49 在随机突变 PCR 后, 看不到目的 DNA 产物条带怎么办?	228
50 QF-PCR 实验中无 C_T 值 (信号) 出现是什么原因?	229
51 QF-PCR 中 C_T 值出现过晚是什么原因?	229

52	QF-PCR 中标准曲线的线性关系不佳是什么原因?	229
53	QF-PCR 中阴性对照也出现明显的扩增是什么原因?	230
54	QF-PCR 中熔解曲线不止一个主峰是什么原因?	230
55	QF-PCR 中扩增效率低是什么原因?	230
56	QF-PCR 中实验重复性不好是什么原因?	230
57	如何知道 QF-PCR 中变性温度是否合适?	230
58	QF-PCR 中如何选择变性时间?	230
59	QF-PCR 中如何知道退火温度和时间是否合适?	231
60	QF-PCR 中应该在哪一步读取荧光信号?	231
61	与常规的 5'-RACE 相比, RML-RACE 有什么特点?	231
62	IPCR 的主要用途是什么?	231
63	PCR-SSCP 实验中有哪些注意事项?	232
64	如何优化多重 PCR 反应?	233
65	原位 PCR 要注意哪些问题?	234
66	PCR 测序实验要注意哪些事项?	236
67	MSP 与常规 PCR 有何不同?	236
68	为何有些组织 DNA 样品在 MSP 中同时出现甲基化和非甲基化 两种结果?	236
69	MSP 中如何设置对照?	236
70	采用软件设计的引物是否一定比自己根据经验设计的引物好?	237

附 录

附录 1	临床基因扩增检验实验室管理暂行办法	241
附录 2	临床基因扩增检验实验室基本设置标准	245
附录 3	临床基因扩增检验实验室工作规范	247

原 理 篇

第1章 PCR 技术基本原理

1.1 基本原理

现在生物医学实验中广泛使用的 PCR 技术都是以 Mullis 发明的 PCR 技术为基础的。一个典型的 PCR 反应过程包括多个“变性 (denaturation)—退火 (annealing)—延伸 (elongation)”循环。其一般反应过程为 (图 1-1):

① 变性。将体系加热至 95°C 左右并维持一定时间,使模板 DNA 互补双链解离成为单链 DNA,以便它与引物结合,为下轮反应做准备。

② 退火。将体系温度降低至 $40\sim 72^{\circ}\text{C}$ (通常以 55°C 作为初选),让寡核苷酸引物与模板 DNA 单链上的互补序列杂交。同时,体系中的 DNA 聚合酶在此温度下也被部分激活,一旦引物与模板杂交, DNA 聚合酶就结合到杂交序列上使引物开始沿着模板 DNA 延伸。这一步对扩增产物特异性有重要的决定作用。

③ 延伸。将反应体系升温至 DNA 聚合酶的最佳扩增温度 (常用的大多数酶为 72°C),使引物延伸以最快速度完成。与模板 DNA 结合的引物在 DNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的 DNA 链。

④ 重复以上 3 步,根据所需产量,循环 $25\sim 40$ 次。

⑤ 将体系温度保持在 DNA 聚合酶的最佳扩增温度数分钟,使体系中未完成延伸的 DNA 链得以继续完成。

⑥ 将体系温度降低至室温或 4°C ,结束 PCR 过程。

在 PCR 反应中,每个循环都以前一循环完成后的所有产物为模板,因此扩增产物是以指数方式增长的 (图 1-2)。如果 PCR 反应的效率达到 100%,那么 20 个循环即可以将模板 DNA 扩增 100 万 (2^{20}) 倍, $1\mu\text{g}$ 的人类基因组 DNA (大约有 3×10^5 个分子) 模板就能得到

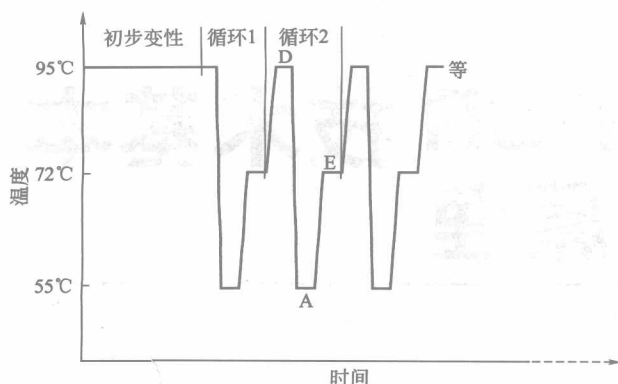


图 1-1 PCR 循环示意

模板 DNA 先在 95℃ 彻底变性 (D)，然后迅速降温至 55℃ 使引物与模板结合 (A)，之后升温至 72℃ 进行延伸合成 (E)

3×10^{11} 个目的产物片段。但是实际情况下，这个效率不可能达到，不过 10^5 倍以上的扩增产量往往是能够获得的。普通 PCR 每个循环所需时间约 2~4min，这样只需 2~3h 就能将目的基因扩增放大几百万倍。这意味着，一般情况下，即使是只有微量的模板 DNA，经过一轮 PCR 反应后的产量就已经足以满足一般实验的需求，例如用溴化乙锭 (ethidium bromide, EB) 染色的琼脂糖凝胶分析和克隆到载体 (vector) 中进行后续实验。这种特性也正是 PCR 技术最大的魅力所在。

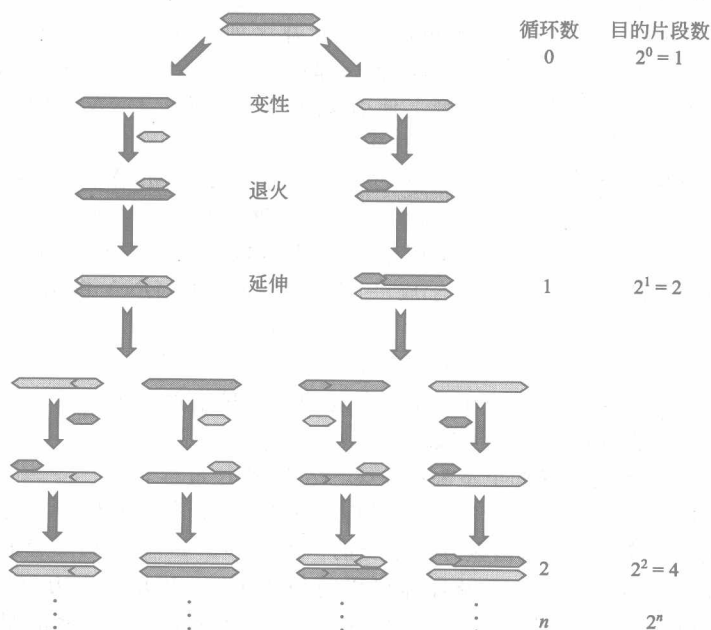


图 1-2 PCR 扩增产物指数型增长示意

1.2 PCR 反应动力学

根据 PCR 反应产物数量的增长状态，一个 PCR 实验过程可以分为 3 个部分，如图 1-3 所示，分别为早期（early phase, E 期）、中期（mid phase, M 期）和晚期（late phase, L 期）。

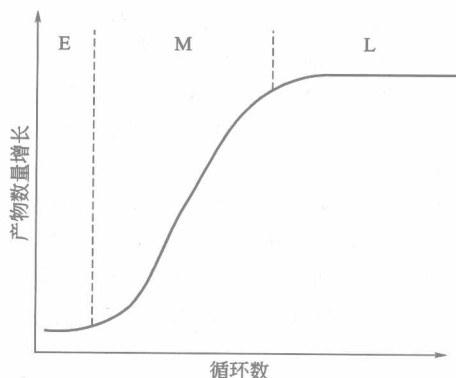


图 1-3 PCR 反应动力学过程

这 3 个时期的划分，对应于 PCR 体系 3 种不同的状态：

① 早期（E 期）。即一个 PCR 反应中最初的几个循环。此时，PCR 体系中主要发生的事件是引物在单链 DNA 模板上搜索它们的互补序列，并与模板的特定位点杂交。

② 中期（M 期）。在一个 PCR 反应的中期循环中，产物数量呈爆炸式增长。主要特点是引物与特异性位点的杂交变得容易，在 DNA 聚合酶的作用下，引物在模板上进行延伸，扩增反应顺利进行。在这一时期产物呈指数型增长。

③ 晚期（L 期）。也称为平台期（plateau phase），此时反应体系渐渐不适宜于产物的继续扩增，这通常是由于反应物过度损耗（往往是 DNA 聚合酶）或者产物的抑制造成的。

理想情况下，我们希望在 E 期能够增强引物的选择性，以扩增出需要的特异性序列；在 M 期能够达到最大的扩增效率，得到更多的产物；而在 L 期到达之前终止反应，获得最好的纯度和效率。通常情况下，30~35 个循环是比较合适的，能够比较高效率地得到高纯度的 PCR 产物，而更多的循环往往会造成产物纯度和扩增效率的下降。如果需要更高的产物量，可以取少量 PCR 产物作为模板进行第二次 PCR。对这些过程的调节和控制，将在本书后面的相关章节中进行详细论述。

1.3 PCR 技术的特点

PCR 技术能够得到广泛的应用，主要由于它具有以下几个特点。

(1) 高特异性 PCR 的特异性主要指扩增产物的专一性。扩增产物的专一性由引物与 DNA 模板中靶序列互补的专一性决定，即取决于引物与模板 DNA 互补的特异性。因此，PCR 引物的设计直接关系到 PCR 反应的成败，要尽可能地避开重复序列，尽可能选择模板 DNA 中的单拷贝区。要想特异地扩增某一 DNA 片段，必须事先已知该 DNA 的序列，至少要知道引物所在位点的 DNA 序列。反之，只要知道任何一段模板的 DNA 序列，往往都能设计出相应的引物，对其进行特异性的体外扩增。

(2) 高敏感性 PCR 技术具有高度的敏感性，理论上，一根毛发的毛囊或一个细胞中所含有的 DNA，就能满足 PCR 扩增的需要。然而，高度的敏感性也使 PCR 反应极易产生令人头痛的交叉污染，因为如果反应条件特异性不高，极微量的污染物就能够产生大量的非特异性片段。

(3) 高产率 PCR 技术能在 2~3h 内将靶 DNA 序列扩增到上百万倍的水平，皮克 (pg) 级的 DNA 模板可以扩增到微克 (μg) 级的水平，这已经能够满足大多数后续研究的需要。

1.4 PCR 反应体系的组成

在常规 PCR 反应中，体系通常由模板、引物、缓冲液、脱氧核苷酸、DNA 聚合酶、 Mg^{2+} 和 K^{+} 等成分组成，其一般比例如表 1-1 所示。

表 1-1 PCR 反应体系一般组成

成分	体系终浓度
模板	$10^4 \sim 10^6$ 个 DNA 模板
正向引物	$0.1 \sim 0.5 \mu\text{mol/L}$
反向引物	$0.1 \sim 0.5 \mu\text{mol/L}$
$10\times$ 反应缓冲液	$1\times$
Mg^{2+}	$1.0 \sim 3.0 \text{mmol/L}$
dNTP(dATP、dTTP、dGTP、dCTP) 混合物	每种 $200 \mu\text{mol/L}$
DNA 聚合酶	$1 \sim 4 \text{U}/100 \mu\text{L}$ 体系

1.4.1 模板

模板 (template) 是 PCR 产物产生的基础，PCR 反应过程就是不断地合成 DNA 互补链的过程。PCR 反应中所采用的模板，既可以是

纯化过的基因组、质粒 DNA、RNA 反转录的 cDNA，也可以是未经纯化处理的样品，如细菌、噬菌体和动植物组织样品。

1.4.2 引物

引物 (primer) 通常是两条 20~30 个碱基左右长度的寡聚核苷酸链。其中，在 PCR 反应中与 DNA 负链结合，扩增产物为 DNA 正链的引物称为正链引物 (plus-strand primer)、正向引物 (forward primer) 或正义引物 (sense primer)，而与 DNA 正链互补，扩增产物为 DNA 负链的引物称为负链引物 (minus-strand primer)、反向引物 (reverse primer) 或反义引物 (anti-sense primer)。引物的作用有两个：①按照碱基互补的原则，与模板 DNA 上的特定部位杂交，决定扩增目的序列的特异性；②两条引物结合位点之间的距离决定最后扩增产物的长度。

1.4.3 缓冲液

反应缓冲液 (buffer) 的作用主要是控制 PCR 体系的 pH 值和离子强度，使反应在最适条件下进行。缓冲液的离子强度、pH 值、 Mg^{2+} 浓度和缓冲能力等都对 PCR 反应有非常重要的影响，不能随意配制。PCR 中一般使用 10~50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液，很少使用其他类型的缓冲液。Tris-HCl 缓冲液是一种双极化的离子缓冲液， pK_a 为 8.3 (20℃时)。当温度发生改变时，其 pK_a 值也会改变，温度升高 (降低)， pK_a 值降低 (升高)， ΔpK_a 约为 0.021/℃。因此，采用 pH 值为 8.3 的 20mmol/L Tris-HCl (20℃) 为 PCR 缓冲液时，在反应的延伸阶段 (温度为 72℃左右)，反应体系的 pH 值会下降到 7.2 左右，达到热稳定 DNA 聚合酶的最佳工作 pH 值环境。

1.4.4 脱氧核苷酸

脱氧核苷酸 (deoxynucleotid) 是 DNA 的基本组成元件，为 DNA 合成所必需。PCR 中使用的脱氧核苷酸通常是 4 种脱氧核苷酸的等摩尔混合物，即腺嘌呤脱氧核苷酸 (dATP)、鸟嘌呤脱氧核苷酸 (dGTP)、胞嘧啶脱氧核苷酸 (dCTP) 和胸腺嘧啶脱氧核苷酸 (dTTP)，通常统称为 dNTP。

4 种脱氧核苷酸必须等摩尔混合，否则将会导致 DNA 合成时碱基错配水平升高。通常，在一个 25~50 μ L 的标准 PCR 反应体系中，每种 dNTP 的浓度介于 200~250 μ mol/L，这种浓度的 dNTP 可以满足 6~6.5 μ g 的 DNA 产物的合成。由于 dNTP 可以和反应体系中的 Mg^{2+} 螯合，从而影响 Mg^{2+} 对热稳定 DNA 聚合酶的激活作用，所以过高浓度的 dNTP 反而会抑制 PCR 扩增。反复冻融会破坏 dNTP 的分子结

构, 导致其失效, 因此, 实验中常将 dNTP 小量分装在微碱性溶液 (pH 8.1) 里, 在 -20°C 保存。多次使用时, 会有少量水分蒸发而凝结附于试管壁, 因此使用前可将试管内液体混匀、短暂离心将液体收集到管底, 以减少浓度的改变。

1.4.5 DNA 聚合酶

DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 是推动 PCR 反应进行的机器, 如果没有它的存在, PCR 反应就不可能进行。常规 PCR 中最常用的 DNA 聚合酶是 *Taq* DNA 聚合酶, 因为它便宜、高效, 而且保真度也满足一般实验的需求。但是随着实验要求的不断提高, 现在也出现了很多更为高效和保真度更高的聚合酶。

1.4.6 Mg^{2+}

几乎所有热稳定 DNA 聚合酶的活性都依赖于游离的二价阳离子的存在。PCR 反应体系中使用的二价阳离子通常是 Mg^{2+} , 它的有效浓度是 PCR 反应的一个重要影响因素。由于 Mg^{2+} 能与 PCR 反应体系中的 dNTP、模板 DNA 和寡核苷酸引物内的磷酸基团结合形成复合物, 因而 PCR 反应系统中的 Mg^{2+} 浓度应高于 dNTP、模板 DNA 和引物中磷酸基团数的总和, 能发挥作用的是游离的 Mg^{2+} 。正因为如此, 很难提出一个适用于所有 PCR 体系的标准 Mg^{2+} 浓度。通常当各种 dNTP 的浓度为 $200\mu\text{mol/L}$ 时, 所采用的 Mg^{2+} 浓度为 1.5mmol/L 。对于特殊的体系, 可以在此基础上对 Mg^{2+} 浓度进行优化, 以获得理想的实验结果。 Mg^{2+} 的浓度过低会降低反应产物得率, 过高则会增加非特异扩增和碱基错配。如果要提高扩增的保真度, 通常选择较低的 Mg^{2+} 浓度。

1.4.7 K^{+}

标准的 PCR 缓冲液中含有 50mmol/L 的 KCl, 在此浓度下, K^{+} 能够促进引物退火。但有研究表明, 高于此浓度的 KCl 或者用 50mmol/L 的 NaCl (或 NH_4Cl 、 NH_4Ac) 时, 会抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性; 如果 KCl 浓度达到 200mmol/L , 则会导致酶失活。

1.4.8 增强剂

在实际的 PCR 实验中, 除了以上基本组成成分以外, 有的体系还需要另外添加一些辅助成分, 用来优化 PCR 反应, 这类物质称为 PCR 增强剂。PCR 增强剂一般能增加引物的特异性、提高 DNA 聚合酶的热稳定性以及使反应体系适应较宽范围的退火温度和 Mg^{2+} 浓度等。但增强剂对 PCR 的影响常常是难以预测的, 对一种 PCR 系统有效的

增强剂，用于另一种 PCR 系统时可能完全无效。因此，在建立一个新的 PCR 扩增系统时，需要对选用的 PCR 增强剂的作用重新予以检验。常用的 PCR 增强剂见表 1-2。

表 1-2 常用的 PCR 增强剂

增 强 剂	使用浓度	功 能
乙酰胺(acetamine)	5%	降低双链 DNA 的 T_m 值,增加 PCR 特异性
甜菜碱(<i>N,N,N</i> -trimethylglycine)	1mol/L	稳定 <i>Taq</i> DNA 聚合酶
PEG 8000	8%	提高 PCR 引物与模板的结合效率
甘油(glycerol)	10%	稳定 <i>Taq</i> DNA 聚合酶
二甲基亚砷(dimethylsulfoxide,DMSO)	5%	提高 PCR 引物与模板的结合效率
甲酰胺(formamide)	5%	降低双链 DNA 的 T_m 值,增加 PCR 特异性
热稳定焦磷酸酶(thermostable pyrophosphatase)	5U	消除反应中产生的焦磷酸对 PCR 的不利影响
TMAC(tetramethylammonium chloride)	50mmol/L	稳定 <i>Taq</i> DNA 聚合酶
DNA 单链结合蛋白(single-stranded DNA-binding protein,SSB)	5 μ g/mL	稳定单链 DNA,增加 PCR 特异性
小牛血清白蛋白(bovine serum albumin,BSA)	10 μ g/mL	稳定 <i>Taq</i> DNA 聚合酶
明胶(gelatin)	10 μ g/mL	稳定 <i>Taq</i> DNA 聚合酶
NP-40	0.05%	中和模板 DNA 中残留的离子去垢剂的影响
聚山梨醇 20(吐温 20)	0.05%	中和模板 DNA 中残留的离子去垢剂的影响

1.5 PCR 所需设备和器材

PCR 实验所需的设备和器材包括：全自动 PCR 仪、微量移液器和 PCR 试管、移液嘴等。PCR 技术面世不久，就实现了自动化。PCR 的变性—退火—延伸 3 个步骤中，精确的温度调控非常重要，是 PCR 能否成功的关键。全自动 PCR 仪首先实现了精确、快速的温度调控，其次是 PCR 3 个步骤的自动循环往复，从而提高了 PCR 的效率，降低了实验过程中的系统误差和随机误差，全自动 PCR 仪已经成为开展 PCR 技术所必需的设备。为了使 PCR 反应试管内的温度变化尽可能地与 PCR 仪同步，最好采用薄壁 PCR 专用试管。

由于 PCR 高度灵敏，PCR 反应体系必须在一个洁净的环境中进行。因此，PCR 所需的试管和移液嘴只能一次性使用。PCR 反应体系各成分常常是微量添加的，对各反应成分的浓度要求也很严格，因此，取样必须使用校准过的微量移液器。

(刘 森)

参 考 文 献

- [1] Genome News Network timeline. <http://www.laskerfoundation.org/rprimers/>

gnn/timeline/1869a. html.

- [2] Paetkau V H, Khorana H G. Preparation of a circular bihelical deoxyribonucleic acid containing repeating dinucleotide sequences. *Biochemistry*, 1971, 10 (9): 1511-1521.
- [3] Discovery of PCR. [http: //www. pcrstation. com/inventor-of-pcr](http://www.pcrstation.com/inventor-of-pcr).
- [4] What is PCR. [http: //www. discoss. com/archives/16168. html](http://www.discoss.com/archives/16168.html).
- [5] Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, 239 (4839): 487-491.