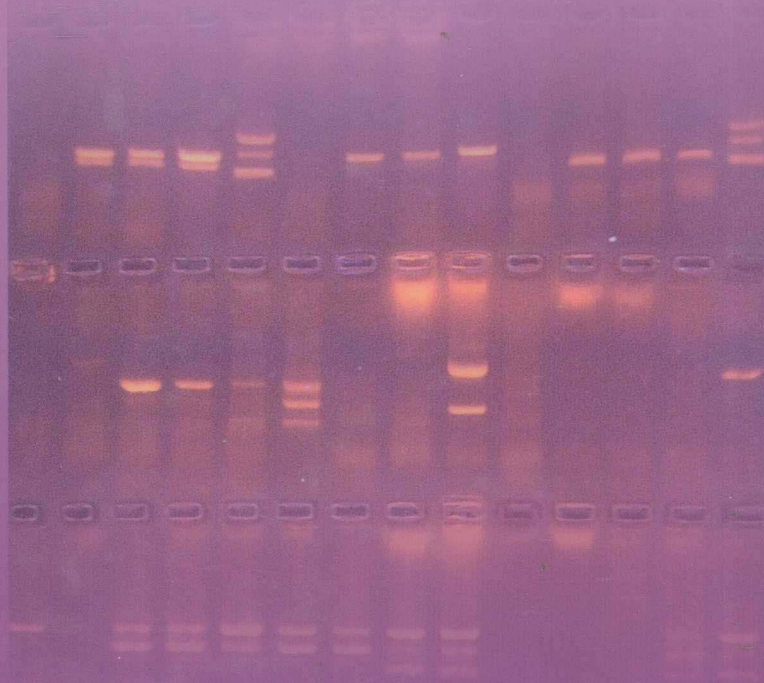


# 基因诊断 多重PCR和通用引物PCR

Genetic Diagnosis  
Multiple PCR and General Primer PCR

秦文斌 著

Author Qin Wenbin



科学出版社

基因诊断  
多重 PCR 和通用引物 PCR

Genetic Diagnosis  
Multiple PCR and General Primer PCR

秦文斌 著  
Author Qin Wenbin

科学出版社  
北京

## 内 容 简 介

本书著者,于1992~1994年期间,以访问学者身份到美国 Huisman 教授的实验室研究血红蛋白病的基因诊断。1994年访美归来,在学校领导的建议下开展感染性疾病病原体的基因诊断。本书内容就是此项研究的成果:①创建一种提取 DNA 的通用裂解液,它能够处理各种不同的临床标本;②创建一种扩增 DNA 的通用反应液,它能够包容各种引物序列,达到有效扩增目的。联合使用这两个“通用”(通用裂解液、通用反应液),能够顺利完成各种 PCR 实验(普通 PCR、多重 PCR、通用引物 PCR 等)。多重 PCR 是为妇科感染等患者服务,它能够提高工作效率(一个扩增解决两个或更多基因),降低成本、减轻患者负担。通用引物 PCR 为脑炎、脑膜炎患儿服务,检测脑脊液里有无病原体,给病因诊断提供重要线索。

### 图书在版编目(CIP)数据

基因诊断:多重 PCR 和通用引物 PCR / 秦文斌著. —北京:科学出版社, 2016.6

ISBN 978-7-03-048529-8

I. ①基… II. ①秦… III. ①聚合酶-链式反应-应用-人类基因-探针诊断 IV. ①R446.69

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2016)第 123188 号

责任编辑:李 植 / 责任校对:张怡君

责任印制:赵 博 / 封面设计:陈 敬

版权所有,违者必究。未经本社许可,数字图书馆不得使用

科学出版社 出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京佳信达欣艺术印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

\*

2016年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2016年6月第一次印刷 印张:23 1/2

字数:536 000

定价:128.00 元

## 著者简介



秦文斌，男，1928年生，沈阳人，虽已离休，还在做实验研究。他是1953年中国医科大学研究生班毕业，留校任助教。1956年支援边疆来到内蒙古，扎根边疆，直至今日。

本书著者一生的科研可分成三个阶段，第一阶段是研究血红蛋白，由1964年开始。第二阶段是研究红细胞电泳释放血红蛋白，由1981年开始。第三阶段是研究疾病的基因诊断，由1992年开始。第一阶段出版一本书，书名《血红蛋白病》，由人民卫生出版社出版。第二阶段出版一本书，书名《红细胞内血红蛋白的电泳释放》，由科学出版社出版。第三阶段出版的《基因诊断：多重PCR和通用引物PCR》，还由科学出版社出版。

本书著者，于1992~1994年期间，以访问学者身份到美国 Huisman 教授的实验室研究血红蛋白病的基因诊断。

1994年访美归来，学校领导提出“基础与临床结合”、“基础为临床服务”，要求开展创收性临床研究。研究什么呢？血红蛋白病少见，感染性疾病多见，著者决定开展感染性疾病病原体的基因诊断。由于没有经验，开始时使用市售的PCR试剂开展工作。

此时，中国出现“PCR热”，各厂家竞争激烈，个别人报出虚假结果，媒体哗然。卫生部下令：“PCR暂停”。

但是，著者还想开展PCR工作。PCR暂停，厂家都没了，所有东西都需自己解决。首先要解决的问题是如何由临床标本提取DNA。为此，经过多方比较研究，著者创建一种提取DNA的裂解液，它能够处理各种不同的临床标本，故称为“通用裂解液”。接着的问题是PCR扩增、需要扩增用的反应液。同样，经过一系列努力，著者创建一套配制反应液的方法，它能够包容各种引物序列，故称为“通用反应液”。

联合使用这两个“通用”（通用裂解液、通用反应液），能够顺利完成各种PCR实验（普通PCR、多重PCR、通用引物PCR等）。

先说普通PCR。利用两个“通用”，著者完成了大量普通PCR服务工作。许多研究单位，在PCR实验中遇到困难时找到这里，著者帮助解决，免费服务。特别是临床研究生，著者帮助他们设计毕业论文，帮助他们完成实验。

再说多重PCR和通用引物PCR。利用两个“通用”，著者开展了多重PCR。此项工作是为患者服务，多重PCR能够提高工作效率（一个扩增解决两个或更多基因），有时还能比较两个基因的相对含量（如LB/GR）。通用引物PCR的标本为脑脊液，可以给脑炎、脑

膜炎患儿的病因诊断提供有用线索。

总之，著者建立了一套 PCR 系统，应用于普通 PCR、多重 PCR 和通用引物 PCR，都得到满意结果。但是，这些成果构不成原创，是对经典 PCR 技术的学习和延续，错误肯定不少，请同行和读者们批评指正。

## 主要参与者

- 第一篇参与者： 睢天林 岳秀兰 周立社 闫秀兰  
第二篇参与者： 高丽君 周立社 苏 燕 韩丽红  
秦良谊 邵 国 秦艳晶 王占黎  
于 慧 王海龙 崔珊娜  
第三篇参与者： 高丽君 周立社 苏 燕 韩丽红  
闫 斌 邵 国 秦艳晶 闫秀兰  
王占黎 于 慧 高雅琼 宝勿仁 毕力格 秦良伟  
第四篇参与者： 高丽君 周立社 苏 燕 韩丽红 闫 斌  
邵 国 秦艳晶 闫秀兰 王占黎 于 慧  
高雅琼 宝勿仁 毕力格 秦良光  
第五篇参与者： 睢天林 岳秀兰 闫秀兰 秦良谊  
第六篇参与者： 周立社 苏 燕 韩丽红 闫 斌 睢天林  
岳秀兰 闫秀兰 高丽君 韩丽莎 王彩丽  
魏 枫 和姬苓 吴丽娥 闫春华 王媚媚  
王冬梅 邢晓雁 折志刚 王大光 丁海涛  
谢基明 王玉珍 刘 芬 王步云 李 琴  
周俊红 杨文杰 董立慧 白利平 沈木生  
王 程 于 玲 张永强 黄 颖 郝艳梅  
高雅琼 赵喜君 霍晓静 杨 森 张巨峰  
周俊红 苏丽娅 张 圆 张 坤 裴娟慧  
刘 佳 孙洪英 王津京 张艳辉 南 蕾  
贾妮亚 刘丽萍 田园青 贾 璐 李晓晶  
冯秋萍 李俊峰 张永红 冯笑梅 云哲琳

# 序

秦文斌教授是我国著名的生物化学与分子生物学专家，在血红蛋白和基因诊断等方面的研究工作硕果累累，享誉海内外。包头医学院的老师和学生都习惯称呼他秦老师，我也一样。

1982年我大学毕业分配到包头医学院工作，我所在的教研室和秦老师所在的教研室在同一幢楼的同一楼层。当时正是“文化大革命”后恢复高考第一、第二届学生毕业季，学校师资短缺，留校的、分配来的青年教师较多，我也是其中一员。从学生到教师，不仅是身份的转变，更重要的是思维模式的转变和能力的提高。当时我们这些青年教师都是每天白天听课，不仅听教研室开设的课程，还听自己认为需要的相关学科的课程，晚上基本都在办公室学外语、看看书、备备课等。晚上我经常能看到一位个子不高、戴着眼镜、清瘦的中年老师也常出现在楼里（秦老师显得比他实际年龄要年轻些，现在算来那时他已五十多岁了），我还纳闷，这么大岁数了还用加班备课？一问才知道原来秦老师是在做科研，当时的我们对于搞科研觉得很深奥和神秘，所以每当我路过秦老师的实验室时都会情不自禁地往里看看。

秦老师的科研大致分为三个阶段，每个阶段出一本书。第一阶段是研究血红蛋白，出版《血红蛋白病》一书；第二阶段是研究红细胞电泳释放血红蛋白，出版《红细胞内血红蛋白的电泳释放》一书；第三阶段是研究疾病的基因诊断，出版《基因诊断 多重 PCR 和通用引物 PCR》一书。

1992~1994年期间，秦老师以访问学者身份到美国 Huisman 教授的实验室，研究血红蛋白病的基因诊断。1994年访美归来，学校提出科学研究要“基础研究与临床应用结合”、“基础为临床服务”，希望开展基础与临床对接的研究。研究什么呢？血红蛋白病少见，感染性疾病多见，秦老师决定开展感染性疾病病原体的基因诊断。由于没有经验，开始时使用市售的 PCR 试剂开展工作。当时，中国正出现“PCR 热”，由于过度夸大其作用，出现了一些乱象，卫生部下令整顿 PCR 临床诊断。

不过，秦老师还是想开展 PCR 工作。供应试剂的厂家没了，所有东西都需自己解决，怎么办？秦老师通过夜以继日的实验研究，终于建立起自己的基因诊断系统，其中包括高效的普通 PCR 技术、多重 PCR 技术和通用引物 PCR 技术。

秦老师建立的普通 PCR 技术帮助了许多研究单位解决实验中遇到的困难，其中包括外地的、本地的研究单位，并为多名研究生完成相关课题提供了帮助。

秦老师建立的多重 PCR 技术和通用引物 PCR 技术，解决许多临床问题，给患者的病因诊断提供了重要依据。

三十多年过去了，现在秦老师在整理这些年科研工作的成果，我曾经问过秦老师，做实验挺辛苦的，是什么让他坚持，他说：“做实验是我最大的乐趣。”

在此，秦老师把这些成果写成此书，希望它能推动 PCR 技术继续发展，成为年轻学者学习 PCR 技术的重要参考。

和彦苓

2016年1月5日

# 前 言

本书著者一生的科研工作可分成三个阶段，第一阶段是研究蛋白质，主要是血红蛋白，由 1964 年开始。第二阶段是研究红细胞，主要是红细胞电泳释放血红蛋白，由 1981 年开始。第三阶段是研究基因（核酸），主要是疾病的基因诊断，由 1992 年开始。

第一阶段出版一本书，书名《血红蛋白病》，由人民卫生出版社出版。第二阶段出版一本书，书名《红细胞内血红蛋白的电泳释放》，由科学出版社出版。第三阶段出版的就是这本书，《基因诊断 多重 PCR 和通用引物 PCR》，还是由科学出版社出版。下边说这本书的事情。

本书著者，于 1992~1994 年期间，以访问学者的身份到美国 Huisman 教授（已经去世）的实验室研究血红蛋白病的基因诊断。1990 年，Huisman 教授曾经来访我们的实验室，我们一起游览了成吉思汗陵，他提出让我访美，当时我是包头医学院院长，无法脱身，故未能成行。1991 年，由于一些有趣的原因，我辞去了院长职务。这时候我产生了去美国一趟的想法，因为有一些血红蛋白病的诊断需要带到美国解决。

那是美国佐治亚州 Augusta 市，佐治亚医科大学所在地，美国血红蛋白权威 Huisman 教授就在这里工作，他主持着这里的生物化学与分子生物学实验室，专门研究异常血红蛋白和血红蛋白病的基因诊断。

这里的标本来自全世界，所以，我要研究我带去的标本，还要研究来自其他国家的标本。这里的主要实验手段是，由血液标本提取 DNA、PCR 扩增、基因测序（当时，这里是手工操作基因测序）。这段时间的研究成果参见第五篇。

1994 年访美归来，在研究生的毕业论文中开始增加了基因诊断或基因多态性内容（变成血红蛋白及基因多态性两个内容）。一些临床研究生来求助时，我也建议将基因多态性与临床疾病关系作为研究生课题内容，并帮助完成部分实验。这部分研究成果参见第六篇。

访美归来后学校领导提出“基础与临床结合”、“基础为临床服务”，要求开始创收性临床研究。研究什么呢？血红蛋白病少见，感染性疾病多见，我们决定开展感染性疾病病原体的基因诊断。由于没有经验，开始时使用市售的 PCR 试剂开展工作。

此时，中国出现“PCR 热”，各厂家竞争激烈，个别人报出虚假结果，媒体哗然。卫生部下令：“PCR 暂停”。

但是，我们还想开展 PCR 工作。PCR 暂停，厂家都没了，所有东西都需自己解决。首先要解决由临床标本提取 DNA 问题。为此，经过多方比较研究，我们创建一种裂解液，它能够处理各种临床标本，故称为“通用裂解液”。还有 PCR 扩增时的反应液配制问题。也是经过一系列努力，我们创建一套配制反应液的方法，它能够包容各种引物序列，故称为“通用反应液”。

---

本书为作者在不同时期发表或参与的论文和作品，在编辑形成本书时，为与原文保持一致，部分未进行统一处理，因此存在单位、体例等方面的不一致。



两个“通用”（通用裂解液、通用反应液），成为包医 PCR 系统的核心成分，两者联合使用或单独使用，都能帮助完成各种 PCR 实验（普通 PCR、多重 PCR、通用引物 PCR 等）。

普通 PCR：利用两个“通用”，我们完成了大量普通 PCR 服务工作。许多研究单位，在 PCR 实验中遇到困难时找到这里，我们帮助解决，免费服务，还要搭上 Taq 酶和各种消耗品。特别是临床研究生，我们帮助他们设计毕业论文，帮助他们完成实验，服务水平同上。他们的毕业论文多数属于基因多态性方面内容，参见本书第六篇。

多重 PCR 和通用引物 PCR：利用两个“通用”，我们开展了多重 PCR。此项工作是为患者服务，多重 PCR 能够提高工作效率（一个扩增解决两个或更多基因），降低成本、减轻患者负担。利用两个“通用”，我们还开展了通用引物 PCR，标本为脑脊液，可以给脑炎、脑膜炎患儿的病因诊断提供重要线索。

另外，为了一次鉴定多个 PCR 结果，我们扩大了琼脂糖凝胶的加样孔数量，最多时 70 孔，一次电泳可以解决多个标本的问题，效率明显提高。众所周知，琼脂糖凝胶制备起来很麻烦，而且溴乙啶又有毒性。为了减轻这方面的负担，我们摸索、试验了凝胶的重复使用，简称“重复胶”。制胶一次，最多可重复使用 6~7 次，工作效率明显提高。“重复胶”已经进入日常工作。由于可以随时使用，有些临床研究生拿来扩增产物直接上样，省去制胶和后处理的许多时间。

总之，我们建立了一套 PCR 系统，应用于普通 PCR、多重 PCR 和通用引物 PCR，都得到满意结果。但是，这些成果并非原创，是对经典 PCR 技术的学习和延续，有些内容可能属于杜撰，不妥之处在所难免，请同行和读者们批评指正。

秦文斌

2016 年 1 月 于鹿城 包头

# 目 录

## 第一篇 PCR 概况

第一章 PCR 简史	1
第二章 PCR 基本原理	3
第三章 PCR 特点	5
第四章 PCR 技术的新进展	6
第一节 改进标本制备	6
第二节 多重 PCR	6
第三节 通用引物 PCR	6
第四节 荧光定量 PCR	7
第五章 PCR 标本处理	8
第六章 PCR 基本操作	9
第一节 PCR 扩增体系	9
第二节 PCR 扩增 DNA 操作举例	10
第三节 PCR 扩增产物的检测和分析	10
第四节 琼脂糖凝胶电泳	11

## 第二篇 包医基因所 PCR 系统

第一章 简介	12
第二章 通用裂解液的制备	13
第三章 通用裂解液的应用	14
第一节 由临床拭子(男、女拭子)提取 DNA	14
第二节 由组织标本提取 DNA	14
第三节 由尿液提取 DNA	15
第四节 全血标本提取 DNA	15
第五节 由痰液标本提取 DNA	16
第六节 从前列腺液或精液标本提取 DNA	17
第七节 由脑脊液或胸水提取 DNA	17
第八节 由血清或血浆标本提取 DNA	18
第四章 通用反应液的配制	19
第一节 通用反应液配制的基础操作	19
第二节 通用反应液配制的活用操作	19
第五章 基础型※通用反应液的应用	21
第一节 各种 cDNA 的扩增(此时不用通用裂解液)	21

第二节 大批量科研标本的扩增 (此时需要通用裂解液) .....	21
第六章 多孔琼脂糖凝胶电泳 .....	23
第七章 凝胶的重复使用 .....	25
第八章 包医 PCR 系统小结 .....	26

### 第三篇 多重 PCR

第一章 简介 .....	27
第二章 白色念珠菌引物与加特纳菌引物的双重 PCR .....	29
第三章 滴虫引物与解脲支原体引物的双重 PCR .....	31
第四章 淋球菌引物与沙眼衣原体引物的双重 PCR .....	33
第五章 发酵支原体引物与人型支原体引物的双重 PCR .....	35
第六章 生殖道支原体引物与肺炎支原体引物的双重 PCR .....	37
第七章 人乳头瘤病毒常见低危型引物的多重 PCR .....	39
第八章 全面检测低危型人乳头瘤病毒 (HPV-LR I、II) .....	41
第九章 一对引物扩增出六种常见高危型人乳头瘤病毒 (16 18 31 33 52 58) .....	43
第十章 全面检测高危型人乳头瘤病毒 (HPV-HR I、II、III) .....	45
第十一章 单纯疱疹病毒 1 型、2 型 (HSV-I、HSV-II) .....	47
第十二章 一对引物扩增出四种疱疹病毒 (HSV-I HSV-II CMV EBV, 简称 HV-4) .....	49
第十三章 巨细胞病毒引物与弓形虫引物的双重 PCR .....	51
第十四章 乳酸杆菌与细菌通用引物的多重 PCR .....	53
第十五章 有关菌群失调的文章 .....	55
妇女阴道分泌物乳酸杆菌与菌群比值的基因检测 .....	55
第十六章 多重 PCR 小结 .....	59

### 第四篇 通用引物 PCR

第一章 简介 .....	61
第二章 细菌通用引物 PCR .....	62
第三章 真菌通用引物 .....	64
第四章 衣原体通用引物 .....	66
第五章 支原体通用引物 .....	68
第六章 疱疹病毒通用引物 .....	70
第七章 脑脊液中病原体基因诊断 空白化验单 .....	72
第八章 脑脊液病原体基因诊断 I .....	74
第九章 脑脊液病原体基因诊断 II .....	76
第十章 脑脊液病原体基因诊断 III .....	78
第十一章 脑脊液病原体基因诊断 IV .....	80
第十二章 脑脊液病原体基因诊断 V .....	82
第十三章 通用引物 PCR 小结 .....	84

## 第五篇 血红蛋白病的基因诊断

第一章	血红蛋白 A2 凉城的基因鉴定	85
第二章	血红蛋白 Pyrgos 和血红蛋白 Legnano 的基因鉴定	89
第三章	血红蛋白 Fannin-Lubbock	92
第四章	有或无轻型 $\beta$ -地贫的杂合体中 $\alpha$ Q-链变异物的数量问题	99
第五章	$\alpha$ -地贫与胎儿血红蛋白	103

## 第六篇 基因多态性研究

第一章	简介	106
第二章	内蒙古地区基因多态性分析	107
第一节	内蒙古蒙古族人群血管紧张素 I 转换酶 (ACE) 基因多态性分析	107
第二节	蒙古族谷胱甘肽 S-转移酶 GSTT1 和 GSTM1 基因多态性	111
第三节	内蒙古地区汉族 AITD 与 VitD 受体基因多态性 相关性分析	116
第四节	包头地区汉族血管紧张素 I 转换酶 (ACE) 基因多态性分析	121
第三章	基因多态性与银屑病的关系	126
第一节	包头地区寻常型银屑病与 HLA-Cw*0602 等位基因的相关性研究	126
第二节	包头汉族人 HLA-DQA1 基因型与寻常型银屑病的相关性研究	130
第三节	内蒙古地区汉族血管紧张素转化酶 (ACE) 基因 多态性与寻常型银屑病的相关性研究	133
第四节	干扰素- $\gamma$ +874 位点基因多态性与银屑病的相关性研究	139
第五节	包头地区寻常型银屑病与 HLA-DRB1*0701 等位 基因的相关性研究	146
第六节	银屑病的相关基因及因素的研究进展	151
第四章	基因多态性与心脑血管疾病的关系	158
第一节	内蒙古包头地区汉族原发性高血压与 HLA-DQA1*0301 等位基因的相关性研究	158
第二节	包头汉族人群 CX3CR1 基因多态性研究	163
第三节	内蒙古包头地区汉族血管紧张素转换酶基因插入/缺失多态性与冠心病关系的研究	168
第四节	血管紧张素 II1 型受体基因 A1166C 多态性与脑梗死的关联研究	172
第五节	血管紧张素 II1 型受体基因多态性与原发性高血压及脑梗死的关系	184
第六节	过氧化物酶体增殖物受体与心血管疾病	188
第七节	缺血性脑血管病趋化因子 Fractalkine 受体 CX3CR1 基因 V249I 多态性研究	188
第五章	基因多态性与糖尿病的关系	201
第一节	CDKAL1 基因 rs4712523 多态性与内蒙古地区汉族人群 2 型糖尿病相关	201
第二节	内蒙古包头地区汉族人血管紧张素转换酶基因 与糖尿病肾病的相关性研究	204

第三节	TCF7L2 基因 rs7903146 T/C 和 rs7901695T/C 单核苷酸多态性与内蒙古汉族人群 2 型糖尿病易感性的相关性研究*	210
第四节	2 型糖尿病肾病与 PPAR- $\gamma$ 2 Pro12Ala 单核苷酸多态性的相关性研究	215
第五节	包头地区过氧化物酶体增殖体受体 $\gamma$ 2 基因多态性与 2 型糖尿病并发冠心病的相关性研究	218
第六节	包头地区 PPAR- $\gamma$ 2 基因多态性与 2 型糖尿病合并冠心病的相关性研究	222
第七节	PPAR- $\gamma$ 2 Pro12Ala 基因多态性与 2 型糖尿病肥胖的相关性研究	226
第六章	基因多态性与甲状腺疾病的关系	231
第一节	包头地区 TGF- $\beta$ <sub>1</sub> 基因+869T/C 多态性与甲状腺疾病关系的研究	231
第二节	TRAIL 基因多态性与甲状腺疾病的临床试验研究	236
第三节	转化生长因子- $\beta$ <sub>1</sub> 基因+869T/C 位点的多态性与自身免疫性甲状腺疾病的关系	243
第四节	TRAIL 与甲状腺疾病的相关性研究	248
第七章	基因多态性与慢性支气管炎及肺疾病的关系	253
第一节	CYP2A6 基因多态性与慢性阻塞性肺疾病的相关性研究	253
第二节	干扰素 $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 基因多态性与内蒙古地区汉族人群慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的相关性研究	258
第三节	支气管哮喘与糖皮质激素受体基因多态性的关系	263
第四节	CC16 基因 38A/G 多态性与慢性阻塞性肺疾病的相关性研究	268
第八章	基因多态性与肾脏疾病的关系	272
第一节	GSTT1 基因多态性与 IgA 肾病易感性的研究	272
第二节	PAI-1 基因 4G/5G 多态性与内蒙古地区 IgA 肾病的相关性研究	275
第三节	干扰素- $\gamma$ 基因多态性与 IgA 肾病临床、病理及预后的相关性	278
第四节	内蒙古汉族 TNF $\beta$ 基因多态性与 IgA 肾病的相关性	284
第五节	肌球蛋白重链 9 基因单核苷酸多态性与内蒙古自治区汉族 IgA 肾病临床、病理及预后的关系	288
第六节	IgA 肾病相关基因的研究进展	294
第七节	内蒙古汉族 IgA 肾病患者 TNF $\alpha$ 、 $\beta$ 基因多态性与临床特征、病理类型及预后关系的研究	297
第八节	慢性肾脏病患者非肌性肌球蛋白重链 9 基因多态性与高血压易感性的研究	310
第九节	肿瘤坏死因子 $\beta$ 基因多态性与慢性肾功能衰竭的关联性研究	316
第十节	内蒙古包头地区汉族人群肿瘤坏死因子 $\alpha$ -308 位点基因多态性与 IgA 肾病的相关性研究	321
第九章	基因多态性与牙周炎的关系	325
第一节	CYP1A1 基因 MSPI 酶切位点多态性与慢性重度牙周炎易感性的关系	325
第二节	内蒙古地区慢性牙周炎与 ACE 基因插入/缺失多态性关系的研究	328
第三节	GSTT1、GSTM1 基因多态性与重度慢性牙周炎易感性关系的研究	333

---

第十章 妊高征孕妇血管紧张素转换酶基因 多态性研究 .....	339
第十一章 肿瘤基因研究 .....	344
第一节 C-erbB-2 在贲门癌中的扩增及其临床意义 .....	344
第二节 差别 PCR 技术检测食管癌 C-erbB -2 原癌基因的研究 .....	347
第三节 差别 PCR 技术检测乳腺癌 C-erbB-2 癌基因扩增的研究 .....	351
第四节 BRCA1 抑癌基因遗传不稳定性与大肠癌关系的研究 .....	354

# 第一篇 PCR 概况

---

## 第一章 PCR 简史

随着分子生物学的进展,今天的科学家们已经可以离开生物体,在试管里用人工方法进行 DNA 的复制,这种技术称为聚合酶链式反应(PCR)。PCR 技术的原理并不复杂,首先用加热的方法使 DNA 双链拆开,加入设计好的两种寡核苷酸引物,分别与两条 DNA 链配对,然后由 DNA 聚合酶从这两种引物开始,合成出两条新 DNA 链来。重复这样的过程,每一次循环可以使这两种引物之间的 DNA 片段的数量按几何级数递增。这个过程,就像核裂变的链式反应一样,可以在短短几小时内把特定的 DNA 量提高 1000 万倍。

说来有趣,PCR 技术是美国生物化学家 Kary Mullis 偶然之中发现的。那是 1983 年 4 月的一个周末之夜, Mullis 正驾车急速行驶在通往加利福尼亚的山间公路上,望着公路两旁一排排树木从车窗外一晃而过,他突然如有神启,在他的脑海里迸发出 PCR 的最早想法(由 DNA 的半保留复制,联想到聚合酶催化下的 DNA 体外扩增)。第二天一早,他来到公司上班,第一件事就是在电脑中进行以“DNA 聚合酶”为关键词的文献检索,结果没有发现一篇关于 DNA 体外扩增的文章。此后, Mullis 花了一年时间,反复进行实验,终于发明了 PCR 技术。这一技术发明后,立即被广泛应用于分子生物学的研究中。利用这一技术,可以在数小时内使单个 DNA 片段扩增到数百万个,这对基础和临床基因研究都具有重大意义。

PCR 是 polymerase chain reaction 的简写,它的中文译名为“聚合酶链反应”,许多中文 PCR 书里都使用这个名称。但是,chain 有多种翻译,可以翻译成链条,也可翻译成连锁,笔者认为“聚合酶连锁反应”可能比“聚合酶链反应”更能反映实验过程。

PCR 是一种用于放大、扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术,可以认为是生物体外的特殊 DNA 复制。PCR 的最大特点,是能将微量的 DNA 大幅增加,因此,无论是化石中的古生物、历史人物的残骸,还是几十年前凶杀案中凶手所遗留的毛发、皮肤或血液,只要能分离出微量的 DNA,就能用 PCR 加以放大,进行比对。

PCR 技术迅速渗透到生命科学的各个领域,成为当今最重要的分子生物学技术之一,正是 Mullis 的这项突出贡献,使得他当之无愧地获得了 1993 年诺贝尔化学奖,见图 1-1-1。

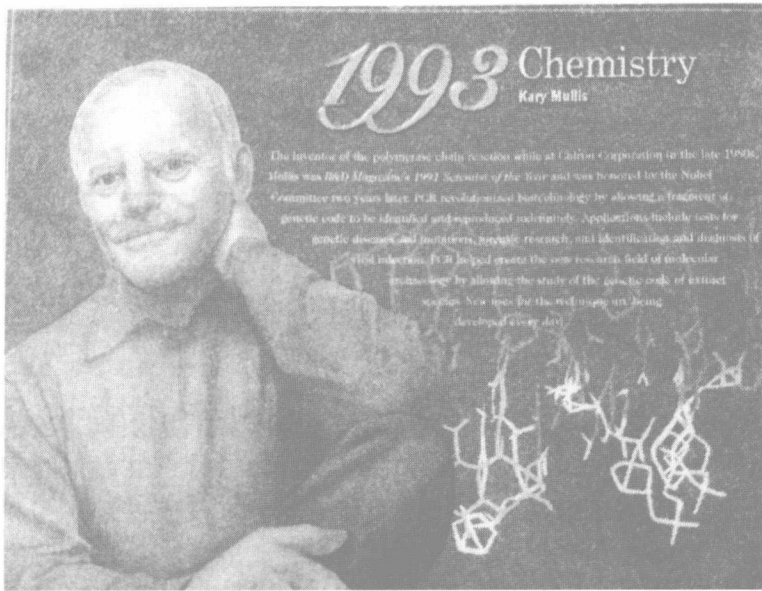


图 1-1-1 Kary Mullis 获得 1993 年诺贝尔化学奖

PCR 的出现可以说和 DNA 聚合酶的发现是分不开的。DNA 聚合酶 I 最早发现于 1955 年，但直到 20 世纪 70 年代 Klenow 等才从大肠杆菌得到 DNA 聚合酶活性 Klenow 片段，并发现其重要实验价值。就在这个基础上，Mullis 利用 Klenow 片段进行实验，终于发现了举世瞩目的 PCR 技术。但是，Klenow 片段不耐热，在 PCR 操作过程中需要反复加热变性和降温复性，此时 Klenow 片段失活，每个循环都需要添加新的聚合酶。这样一来，操作烦琐、价格昂贵，此时的 PCR 并没有显示明显的商业价值。这个时候 Mullis 提出对耐热性 DNA 聚合酶的需求，后来美国的一个研究所从黄石国家公园温泉的嗜热菌株（*Thermus aquaticus*）提取出来耐热的 DNA 聚合酶，这就是现在我们每天用的 Taq DNA 聚合酶。Taq 酶具有以下特点：①特异性强。特别是延伸温度较高（通常 72℃），更提高了特异性、灵敏度和扩增效率。②耐高温。95℃两小时后，仍保留 40%活性；93℃两小时后，仍保留 60%活性；70℃两小时后，仍保留 90%活性。因此，在 PCR 过程中，不必每次循环后再加入新的聚合酶。

在 PCR 的早期，要有三个容器，分别保持变性、复性、延伸三种温度，把反应管放在这三种温度里来回倒，而且反复进行，很费劲。此时，产生了对自动化仪器的需求，PCR 仪就这样产生了。早期的 PCR 仪属于水浴式，它的特点是，受热均匀、升降温快，但机械臂容易出故障。后来出现半导体式、气流式、压缩机制冷式、金属模块式等；这些 PCR 仪，都采用微处理机控制，可储存多个循环程序和参数，多数仪器还具有断电保护装置和循环记录，自动化程度很高。



## 第二章 PCR 基本原理

PCR 是体外酶促合成特异性 DNA 的一种方法。它利用人工合成引物介导的 DNA 聚合酶酶促反应，扩增位于两段已知序列之间的 DNA 片段。其主要步骤是：人工合成一对寡核苷酸引物，与待扩增 DNA 片段两条链的两端序列分别互补，由高温变性、低温复性和适温延伸组成一个周期，循环进行，使目的 DNA 得以迅速扩增。由此可见，PCR 就是在引物介导下反复进行“热变性—复性—延伸”而扩增 DNA 的循环过程（图 1-2-1）。

### POLYMERASE CHAIN REACTION

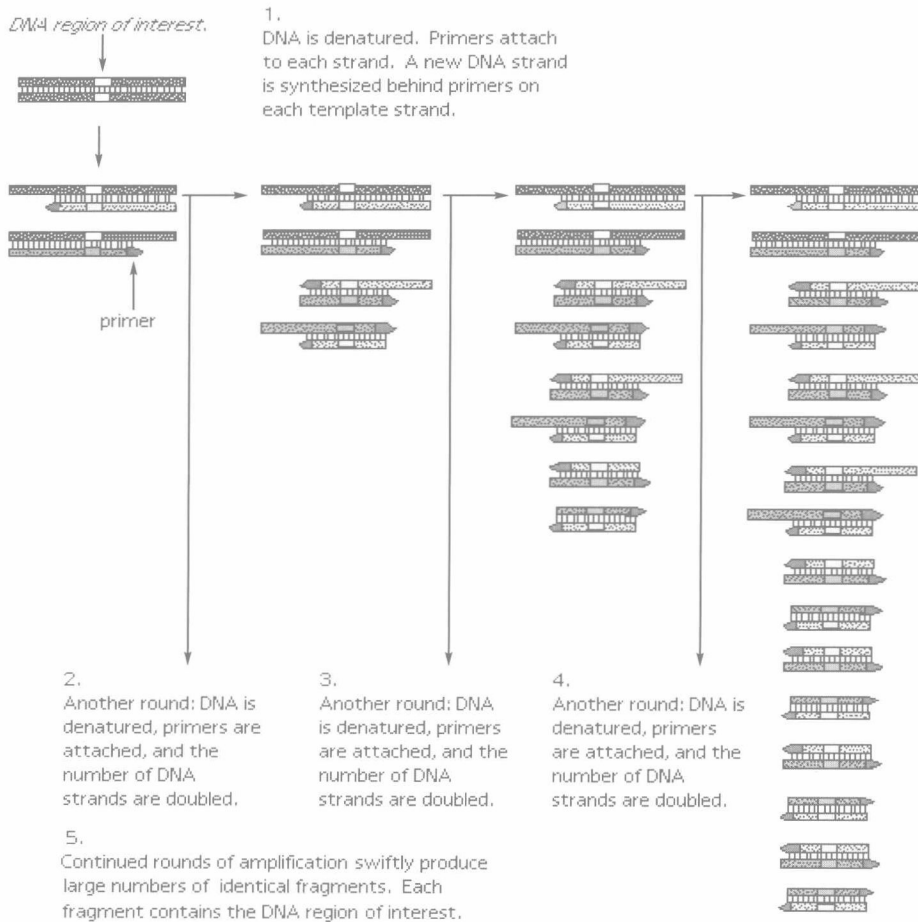


图 1-2-1 PCR 反应的基本原理

变性—复性—延伸三大步骤，各有自己的任务：变性是，模板 DNA 在 94℃ 下变性，双螺旋结构解开，成为单链。复性是，将反应化合物降温，引物与单链 DNA 模板上的互补序列复性，形成“模板—引物”复合物。延伸是，在 72℃ 条件下，由 Taq 酶催化，将单