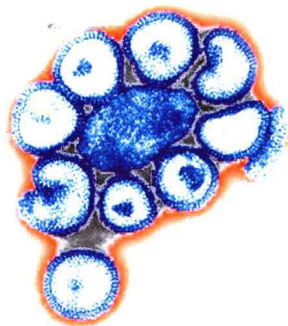


“十一五”国家重点图书出版规划项目



应用生物技术大系

Comprehensive Series of Applied Biotechnology

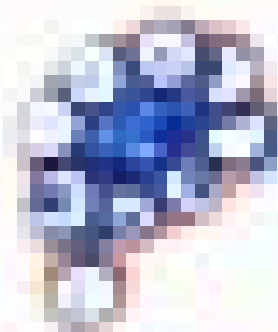


现代检验检疫技术

朱水芳 主编



科学出版社



现代检验免疫技术

第2版 第1次印刷

“十一五”国家重点图书出版规划项目

应用生物技术大系

现代检验检疫技术

朱水芳 主编

科学出版社

北 京

内 容 简 介

本书共十二章,主要介绍检验检疫领域最近几年开始应用的一些检验检疫技术、仪器及检验检疫实验室的要求等。在检测技术方面包括 PCR、实时荧光 PCR、基因芯片、微生物基因组测序 DNA 条形码及 DNA 指纹图谱技术、远程鉴定技术、纳米生物技术及流式荧光技术等的发展历史、基本原理及在本领域中应用的具体实例;仪器方面主要介绍检验检疫中常用的原子力显微镜、激光扫描共聚焦显微镜等仪器的基本原理、操作及在本领域中的应用。本书还介绍了在出入境口岸检验检疫实验室中所涉及的生物安全法规和计量标准、量值传递和溯源技术。

本书是从事检验检疫工作的一线人员、科技人员及高等院校相关专业研究生必备的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

现代检验检疫技术/朱水芳主编. —北京:科学出版社,2012

(应用生物技术大系)

ISBN 978-7-03-033287-5

I. ①现… II. ①朱… III. ①卫生检疫 IV. ①R185

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2011)第 281624 号

责任编辑:夏 梁 孙 青 / 责任校对:刘小梅

责任印制:钱玉芬 / 封面设计:耕者设计工作室

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>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2012 年 1 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2012 年 1 月第一次印刷 印张:21 插页:2

字数:495 000

定价:75.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前言

生物学基础理论和分析测试方法,是组成生物科学的两大核心内容,两者相互促进并共同发展。对初学者而言,要完整掌握一门生物学科,既要学习其基础理论,也必须掌握其分析测试方法。而对想在某一学科有所创新和发展的生物学科工作者而言,要想在理论上有重大突破,往往需要创新和开发新的分析测试技术方法。现代生物学分析测试方法对推动生物科学发展进步起到了越来越重要的作用,也引起了世界各国科学家的高度重视。其中核酸测序、PCR 方法、扫描隧道显微技术等分析测试技术对促进现代生物学发展有着突出贡献。它们的发明者分别获得了诺贝尔生物学或医学奖以及物理学奖,而利用这些方法取得重大科技成果的则更多。

在生物学早期研究的二、三百年时间内,科学家们主要对生物多样性、生态行为、外观形态、细胞学结构等大量科学问题进行了广泛全面的研究,当时主要依靠的是标本、显微镜技术等及科学家的辛勤劳动。而现代分子生物学的研究,需要找出生物个体行为、宏观生态现象与细胞组织水平、分子和原子水平三个层次之间的关系,既需要传统生物学技术方法,更需要现代分子生物学、细胞生物学分析测试高新技术,每深入一个层次,所需要的研究精力和产生的信息量都以成千上万倍增长。现代生物学分析测试技术的最大特点是生物学、分析化学、物理学、材料科学、计算机自动控制等学科高度融合,发展形成了一些以全自动、快速、超灵敏、高通量、智能分析、可视直观、高精度等为特征的现代分析测试方法。每一种新方法出现不久,又迅速得到改进和扩展,由此衍生出了一系列方法。例如,1985 年发明的 PCR 方法,很快就衍生出了反转录 PCR、巢式 PCR、荧光定量 PCR、反向 PCR、杂交诱捕 PCR 等几十种不同用途的 PCR 方法;1982 年第三代显微镜——扫描隧道显微镜出现后,很快就出现了更先进的原子力显微镜(AFM),并在此基础上又相继发明了扫描近场光学显微镜、摩擦力显微镜、横向力显微镜、磁力显微镜、静电力显微镜、扫描热显微镜、扫描离子电导显微镜等;1987 年出现第一台商品化激光共聚焦仪显微镜,它结合了显微镜技术与细胞荧光标记、分层扫描与计算机成像技术,该仪器最新型号的分辨率达到了分子水平;20 世纪 70 年代出现第一代 DNA 测序技术,包括末端终止法和化学断裂两种测序方法(均获得诺贝尔奖),第二代高通量测序方法——焦磷酸盐测序、可逆的末端终止及双色球测序法已经大规模投入商业化应用,测序效率提高上万倍,目前第三代更高效的测序方法已经出现。另外,还有一些全新的检测鉴定方法不断出现,并得到广泛应用,如基因芯片、流式微球分析技术、纳米生物技术、DNA 条码及远程鉴定技术等。现代生物技术还导致新的学科领域的出现,如生物法医学,在打击犯罪、追查生物灾害来源、生物资源知识产权保护等方面应用前景广阔。现代生物学研究,更加重视生物安全和分析测试方法的可靠性和可比性,一些有关生物安全的国内外法规和计量标准、量值传递和溯源,成为生物学工作者必须掌握的常识。

本书各章节作者都是该领域一线科技工作者,与广大读者分享他们最新的工作经验,书中也列出了各技术领域的最新参考文献。本书可供生物学领域学生与科研工作者参考。虽然编著者对本书进行了认真的校对,但疏漏之处在所难免,学术观点也可能不同,欢迎批评指正。

朱水芳

2011年7月29日

目 录

前言

第一章 PCR 技术	1
第一节 多重 PCR 技术	2
第二节 实时荧光 PCR 技术	11
第三节 肽核酸杂交诱捕 PCR 技术	27
第四节 其他 PCR 技术	33
参考文献	36
第二章 基因芯片技术	40
第一节 技术起源	40
第二节 基本原理	40
第三节 分类	42
第四节 应用范围	43
第五节 技术优缺点	45
第六节 基本操作步骤	46
第七节 应用举例	51
参考文献	62
第三章 原子力显微镜技术的生物学应用	64
第一节 技术起源	64
第二节 基本原理	66
第三节 主要方法	71
第四节 应用范围	77
第五节 技术优缺点	81
第六节 生物学应用注意事项	83
第七节 应用举例	87
参考文献	101
第四章 激光扫描共聚焦显微镜技术	107
第一节 概述	107
第二节 原理、结构及功能	109
第三节 荧光探针的选择	115
第四节 荧光探针的标记和影响因素	126
第五节 实验中存在的问题	130
第六节 主要仪器介绍	131
第七节 生物学研究中的应用	134
第八节 基本操作步骤	144

参考文献	151
第五章 有害生物远程鉴定技术	153
第一节 远程鉴定技术的发展	153
第二节 远程鉴定技术在检验检疫中的应用	162
第三节 远程鉴定技术展望	176
参考文献	177
第六章 微生物基因组学	179
第一节 概述	179
第二节 微生物基因组测序	186
第三节 微生物基因组数据的分析	190
参考文献	205
第七章 DNA 条形码	209
第一节 DNA 条形码的起源与发展	209
第二节 DNA 条形码的意义	210
第三节 DNA 条形码的原理与操作	211
第四节 DNA 条形码的应用	216
第五节 植物条形码基因	217
第六节 有关 DNA 条形码的争议	218
第七节 DNA 条形码展望	220
参考文献	221
第八章 DNA 指纹图谱技术	223
第一节 DNA 指纹图谱技术起源与发展	223
第二节 DNA 指纹图谱技术原理与应用	224
第三节 DNA 指纹图谱技术的优势与劣势	230
参考文献	231
第九章 纳米技术与病原菌检测	232
第一节 纳米材料的特性	232
第二节 纳米粒子的制备	233
第三节 生物学常用纳米粒子及表征	234
第四节 核壳荧光纳米粒子	234
第五节 量子点	241
第六节 纳米金及其应用	244
第七节 磁性高分子微球	244
参考文献	246
第十章 流式荧光技术及应用	248
第一节 发展史概述	248
第二节 流式荧光技术的发展简史	248
第三节 流式荧光技术的原理	250
第四节 检测仪器的的工作原理	253

第五节 流式荧光技术的特点·····	254
第六节 流式荧光技术的应用·····	255
第七节 展望·····	262
参考文献·····	263
第十一章 生物计量与基标准 ·····	269
第一节 生物计量概述与起源·····	269
第二节 生物计量特点·····	270
第三节 生物计量的任务·····	271
第四节 生物计量基标准·····	272
第五节 生物计量和基标准应用实例·····	297
参考文献·····	303
第十二章 实验室生物安全 ·····	304
第一节 生物安全的概念·····	305
第二节 加强实验室生物安全的重要性·····	306
第三节 我国的生物安全规范·····	308
第四节 病原微生物危险度评估·····	309
第五节 病原微生物实验室生物安全要求·····	310
第六节 动物实验室的生物安全·····	315
第七节 转基因实验室生物安全要点·····	316
第八节 实验室区域设置原则·····	316
参考文献·····	320
附录 ·····	322
图版	

第一章 PCR 技术

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种体外酶促基因扩增技术。该项技术于 1985 年由美国的 Mullis 等首创, 并由美国 Cetus 公司开发。

DNA 在细胞中的复制是一个比较复杂的过程。参与复制的基本因素有: DNA 聚合酶、DNA 连接酶、DNA 模板、由引发酶合成的 RNA 引物、核苷酸原料、无机离子、合适的 pH 以及解开 DNA 的超螺旋及双螺旋等结构的若干酶与蛋白质因子等。

PCR 过程中进行的 DNA 复制反应, 类似于 DNA 的天然复制过程, 其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 过程由变性、退火、延伸三个基本反应步骤构成。①模板 DNA 的变性: 模板 DNA 经加热至 93℃ 左右一定时间后, 模板双链 DNA 或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离成为单链, 以便与引物结合; ②模板 DNA 与引物的退火 (复性): 模板 DNA 经加热变性成单链后, 温度降至 55℃ 左右, 引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合; ③引物的延伸: DNA 模板-引物结合物在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下, 以 dNTP 为原料, 以靶序列为模板, 按碱基互补配对与半保留复制原理, 合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。重复循环变性-退火-延伸过程, 就可获得更多的“半保留复制链”, 而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4min, 2~3h 即可将待扩增目的基因扩增放大几百万倍。到达平台期所需循环次数取决于样品中模板的拷贝数。

PCR 的三个反应步骤反复进行, 使 DNA 扩增量呈指数上升。反应最终的 DNA 扩增量可用 $Y = (1 + X)^n$ 计算。Y 代表 DNA 片段扩增后的拷贝数, X 表示平均每次的扩增效率, n 代表循环次数。平均扩增效率的理论值为 100%, 但在实际反应中平均扩增效率达不到理论值。反应初期, 靶序列 DNA 片段的增加呈指数形式, 随着 PCR 产物的逐渐积累, 被扩增的 DNA 片段不再呈指数增加, 而进入线性增长期或静止期, 即出现“停滞效应”, 这个时期称为平台期。PCR 扩增效率与 DNA 聚合酶的种类和活性以及非特异性产物的竞争等因素有关。

PCR 扩增产物可分为长产物片段和短产物片段两部分。短产物片段和长产物片段是由于引物所结合的模板不一样而形成的。短产物片段的长度严格地限定在两个引物链 5' 端之间, 是需要扩增的特定片段。以一个原始模板为例, 在第一个反应周期中, 以两条互补的 DNA 为模板, 引物是从 3' 端开始延伸, 其 5' 端是固定的, 3' 端则没有固定的止点, 长短不一, 这就是“长产物片段”。进入第二周期后, 引物除与原始模板结合外, 还要同新合成的链 (即“长产物片段”) 结合。引物在与新链结合时, 由于新链模板的 5' 端序列是固定的, 这就等于这次延伸的片段 3' 端被固定了止点, 保证了新片段的起点和止点都限定于引物扩增序列以内、形成长短一致的“短产物片段”。不难看出“短产物片段”按指数倍数增加, 而“长产物片段”则以算术倍数增加, 几乎可以忽略不计, 这使得 PCR 的反应产物不需要再纯化, 就能保证足够纯的 DNA 片段供分析与检测。

该技术自发明以来,因其高灵敏度、高效率、高特异性的特点已经成为当前生命科学研究与相关领域中的重要方法。该技术经过不断完善,目前已经发展出了一系列相关技术,如多重 PCR、实时荧光 PCR、诱捕 PCR (captured-PCR, C-PCR) 等,这几种 PCR 技术已经渗透到生命科学的各个领域,本章将详细介绍这几种 PCR 技术的基本原理、技术方法、主要优缺点及应用范围等。

第一节 多重 PCR 技术

一、基本原理

多重 PCR (multiplex PCR) 又称多重引物 PCR 或复合 PCR,是在普通 PCR 的基础上加以改进产生的。其原理与常规 PCR 基本相同,只是在一个 PCR 反应体系中加入两对以上引物,针对多个 DNA 模板或同一模板的不同区域扩增多个目的片段的 PCR 技术。该技术自 1988 年 Chamberlain 首次应用于杜氏营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy) 基因外显子缺失检测以来,由于能同时扩增多个目的基因,具有节省时间、低成本、高效率,特别是节省珍贵实验样品的优点,所以一经提出即得到众多研究者的青睐,并且发展迅速,已经成为生命科学各个领域里的一项成熟而重要的研究手段。

二、技术方法

随着分子生物学的迅速发展,结合不断涌现的新技术,多重 PCR 开发出更多更广泛的应用。例如,双寡聚核苷酸引物 (dual priming oligonucleotide, DPO) 多重 PCR 技术、多重 PCR 生物芯片技术、AFLP 多重 PCR、多重逆转录 PCR、实时多重 PCR 技术、荧光定量多重 PCR 等,以适应多种不同研究与应用的需要。其中最近发展起来的 DPO 多重 PCR 技术具有广泛的应用前景,它克服了传统多重 PCR 的一些缺点,增加了反应的特异性,简化了操作步骤。后面将详细介绍 DPO 多重 PCR 技术的原理、特征及其应用。

三、多重 PCR 技术在生命科学研究中的应用

(一) 检验检疫领域的研究与应用

1. 病毒的检测与诊断

病毒因其繁殖力强、侵染性高、易变异等特点,极易造成病毒病的大流行,因此实现快速灵敏的分析鉴定,是控制病毒病的首要选择。传统的病毒检测方法,如传统的生物学方法、免疫学方法等,其最大的缺点就是周期长、灵敏度低。而多重 PCR 灵敏快捷,适于大规模检测,能同时进行多种病毒的鉴定,对于病毒病的检测与预防,尤其是在检测受到多种病毒复合感染的样品时,具有不可替代的作用。现已证实,多重 PCR

(或多重 RT-PCR) 是病毒检测和诊断的强有力工具。可以通过选择不同的引物来区分同一种病毒的不同株系, 或者使用在特定位置含有不同核苷酸的引物来确定不同属。也可以通过扩增存在株系差异的限制性内切核酸酶切割位点区段来区别不同的株系。国际上, 有关多重 RT-PCR 的报道很多, 如 Nie 和 Singh 等利用多重 RT-PCR 方法鉴定了 PVY 的不同株系。目前, 国内也有很多关于多重 RT-PCR 应用的报道, 如王中康等利用多重 RT-PCR 方法同时检测出 5 种 (马铃薯 A 病毒 PVA、马铃薯 S 病毒 PVS、马铃薯 X 病毒 PVX、马铃薯 Y 病毒 PVY 和马铃薯卷叶病毒 PLRV) 侵染马铃薯的病毒。

2. 病原细菌的检测与鉴定

在同一 PCR 反应管中加入多种病原细菌的特异性引物进行多重 PCR 扩增, 可实现快速检测和分析多种病原细菌的目的。目前大多数病原细菌对人感染剂量很低, 1~10cfu 的菌体细胞就足以使人致病。Ramesh 等通过改良 DNA 提取方法, 采用多重 PCR 技术检测牛奶中的金黄色葡萄球菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌, 敏感性为 10^4 cfu / mL。Li 等建立的多重 PCR 方法同时检测沙门氏菌和单核增生李斯特菌的敏感性为 10^3 cfu / mL, 但需要对 PCR 产物进行杂交鉴定。志贺菌、沙门氏菌和大肠杆菌均是属于肠杆菌科的病原细菌, 其形态和生化特性十分相似, 容易交叉污染, 共同导致食物中毒。Vantarakis 等调查发现 90% 的蚌类海产品都易同时感染沙门氏菌和志贺菌, 他们使用多重 PCR 扩增, 增菌后可同时检测到 10~100cfu/mL 的沙门氏菌和志贺菌。肉制品中常易同时感染大肠杆菌 O157 : H7、沙门氏菌和志贺菌, Li 等应用多重 PCR 方法对肉制品中的这三种病原菌进行检测, 结果显示其敏感性在牛肉、鸡肉中可达到 0.2cfu/g, 在猪肉中达到 1.2cfu/g。此外, 将多重 PCR 与其他技术相结合在多种病原细菌的同时检测中也有不少应用, 如 Morin 等根据大肠杆菌 O157 : H7 编码脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的 *rfbE* 基因, 编码鞭毛抗原的 *fliC* 基因, 霍乱弧菌 O1 编码 LPS 的 *rfbE* 基因, 伤寒沙门菌编码 LPS 的 *tyv* 基因设计引物, 建立了反转录多重 PCR 方法, 能同时检测到此三种病原细菌。

3. 病原真菌的检测及鉴定

病原真菌种类繁多且致病力强, 对其的早期准确检测及鉴定是控制病情、减小危害的重要措施。传统检测采用鉴别培养基或免疫学方法, 样品需纯化, 费时又费力; PCR 技术能检出混杂样品中的微量 DNA 片段。秦文彦、程洁等根据黄曲霉毒素生化途径中的关键调控基因 *afIR*、*omt-1* 和 *ver-1* 的序列以及真菌共有的 5.8S rDNA 的 ITS (在 rDNA 基因中, 16S rDNA 和 23S rDNA 基因间隔序列称为 ITS) 序列分别设计了 ApaF/ApaR、OmtF/OmtR、VerF/VerR 及 ITS1/ITS4 4 对引物, 研究建立了产黄曲霉毒素真菌及其潜在饲料或食品污染的多重 PCR 快速灵敏检测体系。董秀丽、赵斌为了快速、准确又经济地鉴定植物根内与根际的菌根真菌区系, 设计和应用了多重 PCR 技术, 对 4 种孢子 HAUO3、*Glomus intraradices*、*Scutellospora castaneae* 和 *Glomus* sp. HAUO4 的研究结果表明, 嵌套多重 PCR 反应灵敏度高、特异性强, 准确率可达到 95%。

4. 线虫的检测及鉴定

病原线虫种类繁多,危害极其严重。且很多线虫幼虫形态非常相似,难以根据其特征进行快速准确的种类鉴定。马以桂等根据剪股颖颗粒线虫、小麦粒线虫和维氏粒线虫的 rDNA-ITS 区域序列,分别设计筛选了特异性引物 AgrF1/AgrR1、TriF1/TriR1、WevF1/WevR1,构建了这 3 种线虫单条幼虫多重 PCR 检测体系,获得了 3 个大小差异明显的片段,适合用于这 3 种线虫的快速准确检测。薄新文、李祥瑞根据捻转血毛线虫 β -微管蛋白基因组 DAN 序列设计了 2 对引物,建立了检测捻转血毛线虫苯并咪唑类药物抗性的多重 PCR 方法,该方法灵敏性高,特异性强,具有很大的应用前景。

(二) 医学领域的研究与应用

疾病的快速、准确的早期诊断具有十分重要的意义,快速特异灵敏的诊断是高水平疗效的前提和保证。PCR 技术一经建立,就迅速应用于各种临床疾病的诊断。如今多重 PCR 已经成为这一领域的主力军,它结合传统经典的检测手段为疾病的快速灵敏特异诊断和最佳治疗方案的确定展示了广阔的前景。

1. 基因诊断

基因诊断当属世界医学研究攻关课题,它不仅是最权威的医学诊断方法,而且还是医学基础研究中的高新手段。多重 PCR 技术因其高效、快速、诊断量大、实用性强的特点,被竞相研究。在优生学上,基因诊断的意义非同寻常。脊椎肌肉萎缩是常染色体上 SMN1 基因纯合缺失所引起的一种隐性遗传病,表型正常的基因携带者夫妇所育后代的患病概率高达 25%,因此产前诊断十分重要。Malcov 等建立了多重巢式 PCR 检测体系,对 17 周孕龄的孕妇进行羊水细胞检测,能同时扩增检测 SMN1 基因的外显子 exon7 和 exon8,实现了产前准确诊断。基因诊断的另一个重要应用领域是法医学。多重 PCR 技术可以用于个体鉴定与亲子鉴定。线粒体基因组上广泛存在单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP),据此可以进行个体鉴定。Vallone 等结合多重 PCR 技术和毛细管电泳技术,通过设计特异性引物,可同时扩增 11 个特异区域,实现了准确的个体鉴定。Schlenk 等根据短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 位点和性别特异位点,建立了同时扩增 13 个位点的多重 PCR 检测体系,所需模板 DNA 用量可低至 120pg,准确率高达 99.99%。此项技术已经十分成熟,德国 Serac 公司开发出的诊断试剂盒已经面市。在遗传性耳聋诊断、Y 染色体微缺失分析等方面,多重 PCR 也已成为一个重要的分子诊断方法。

2. 肿瘤的诊断与研究

多重 PCR 技术一经诞生就成为癌症诊断和研究的重要手段。血管为肿瘤细胞提供养分和氧气,清除废物,血管的形成在肿瘤细胞的增殖与转移中十分关键。血管内皮生长因子 VEGF 广泛存在于众多肿瘤组织中。采用多重反转录 PCR 已经鉴定出 VEGFA、VEGFB、VEGFC 和 VEGFD 4 种血管内皮生长因子,证实病变的甲状腺组织中它们

均有表达。此外，多重 PCR 广泛应用于视网膜母细胞瘤基因杂合性突变的检测、细胞黏附因子的表达研究等诸多方面，对于肿瘤的早期诊断、肿瘤的发展与治疗有着十分重要的意义。

（三）遗传学领域的研究与应用

况少青等建立了一种以 TaqStart™ 抗体为 Taq DNA 聚合酶保护剂的扩增多个微卫星位点的多重 PCR 方法，该方法产量高、成本低，适用于人类基因组计划，尤其是基因作图、基因定位及人类进化等研究。扩增多个微卫星位点的多重 PCR 不仅在人类遗传学研究中发挥重要作用，而且在其他动物，如小鼠、鸡、猪的遗传学研究方面也是一种主要的研究手段，它为群体遗传学、医学遗传学、法医学及人类进化等研究提供了广阔的应用前景。研究不同民族之间基因座差异对于基因诊断与基因治疗具有重要意义。邹浪萍等采用多重 PCR 对我国汉族的 *CSF1PO*、*TPOX* 和 *TH01* 基因座进行等位基因频率调查。该技术可简捷地从同一 DNA 样品中迅速获得较多的基因座数据，是多态性研究的最佳方法。作为一种新的遗传标志——短的串联重复序列（STR），也称微卫星（microsatellite），是以 1~6 个碱基对作为核心单位，串联重复排列而成的一类 DNA 序列，在人类基因组中分布广泛，高度多态，并且呈孟德尔共显性遗传，因而用于构建高分辨率的遗传连锁图以及复杂性相关基因定位等研究。在复杂性状的遗传研究中，常用的策略是对具有同种表型特征的不同人群进行常见微卫星位点的基因分型和连锁分析。

四、多重 PCR 技术的优缺点

1. 多重 PCR 技术的优点

多重 PCR 技术的优点表现在以下三个方面。

- （1）高效性。在同一反应中同时检出多种病原物或对多个目的基因进行扩增分析。
- （2）系统性。多重 PCR 很适宜对症状相同的一组病原物进行分析。
- （3）经济简便性。多种病原物在同一反应管中同时检出，将大大节省检测时间和试剂。

2. 多重 PCR 技术的缺点

任何技术都不是完美无瑕的，多重 PCR 技术也不例外，也存在一定的弊端。

- （1）引物设计过程复杂，要求引物自身或者引物之间尽量避免形成发夹结构或者二聚体，并保证各引物有相近的退火温度。
- （2）操作过程中需要对大量的引物进行筛选，对其影响因素及条件进行优化。
- （3）容易出现扩增效率不高和假阳性现象。

五、多重 PCR 技术的影响因素和条件优化

自然界的每一物种都有其完全不同于其他物种的高度保守的核酸（DNA 和 RNA）

序列。理论上根据这些保守序列设计特异性引物，结合 DNA 聚合酶的高保真性，在多重 PCR 反应体系中可扩增出数量不限的目的 DNA 片段。Tettelin 等已成功进行了 15 对引物的多重 PCR。但是多重 PCR 反应体系与普通 PCR 相比更为复杂，实际操作中常遇到扩增效率下降、非特异性扩增等许多问题，下面将影响多重 PCR 反应的主要因素分叙如下。

（一）核 酸 模 板

用于 PCR 的模板核酸可以是 DNA，也可以是 RNA。当用 RNA 作模板时，首先要进行反转录生成 cDNA，然后再进行普通的 PCR 扩增。核酸模板来源广泛，可以从动植物细胞、培养的细胞、细菌、真菌、病毒、组织、病理样品、考古样品中提取。PCR 反应时加入的 DNA 模板量一般不高于几百纳克，太多的核酸会对扩增产生抑制作用，现在的技术水平已经能从单个细胞中制备出相应的 cDNA 文库。模板的量和纯度是影响 PCR 实验结果的重要因素之一。模板量太少，会出现阴性结果或条带很弱；模板量太多，则会出现条带弥散，模糊不清。合适的 DNA 模板量，可以减少因 PCR 多次循环带来的碱基错配。模板纯度低或被降解会导致扩增不整齐。提高模板的纯度可以提高扩增速率，减少非特异性扩增。

（二）引 物

加入多重 PCR 体系中的每对引物都应当满足单引物对 PCR 体系的引物设计原则，这些原则包括以下几个。

（1）引物的长度。引物过短会影响 PCR 的特异性，要求有 13~30bp，以保证特异性结合；引物过长使延伸温度超过 *Taq* DNA 聚合酶的最适温度（74℃），也会影响产物的特异性。

（2）G+C 含量一般为 40%~60%。

（3）4 种碱基随机分布，避免有连续 3 个以上的相同嘌呤或嘧啶存在。

（4）避免引物自身或引物之间形成 4 个或 4 个以上的连续配对。

（5）引物与非特异靶区之间的同源性不要超过 70% 或者有连续 8 个互补碱基同源，否则会导致非特异性扩增。

（6）引物的 3' 端避免使用碱基 A，并且避免出现 3 个或 3 个以上连续相同的碱基。

（7）为避免污染的基因组 DNA 的扩增，引物设计最好能跨两个外显子。

由于多重 PCR 体系中同时有多对引物，因而还应注意一些特别的问题。①所有引物对的最适退火温度要尽可能相同，这样有助于多重 PCR 选择的退火温度能保证每对引物都有相同的扩增效率。 T_m 值受缓冲液成分、引物、模板浓度等的影响，在实际操作中应进行优化。一般退火温度控制为 55~58℃，延伸时间应较普通 PCR 稍长，退火温度较普通 PCR 扩增时低 4~6℃，循环数应为 28~30 次。②应尽量确保所有引物间没有任何形式的相互作用，在引物设计时可通过分子生物学软件进行分析，如 Primer 5.0。③多重 PCR 的引物必须有合适的比例才可成功扩增。一般来讲，较短的片段较容

易得到扩增，较长的片段扩增能力较弱，所以应增加较长片段的引物浓度，减少较短片段的引物浓度，具体的比例应通过实验摸索以找到最佳比例。弱位点的引物浓度应适当增加，强位点的引物浓度应适当减小，终浓度为 $0.04 \sim 0.60 \mu\text{mol/L}$ 。④不同引物对所扩增产物的大小要能通过电泳或其他方法区分开。

（三）缓 冲 液

缓冲液提供 PCR 反应最适的酸碱度和所需的某些离子，一般使用 Tris-HCl 缓冲液，标准浓度为 10mmol/L ，并调节 pH 至 $8.3 \sim 8.8$ 。缓冲液中含有 50mmol/L KCl，有利于引物的退火。有人加入牛血清白蛋白 ($100 \mu\text{g/L}$)、明胶 (0.01%)、Tween-20 ($0.05\% \sim 0.1\%$) 或二巯基苏糖醇 (DDT, 5mmol/L) 等，认为这些物质可以保护 Taq DNA 聚合酶。

（四） Mg^{2+} 浓度

Mg^{2+} 是 Taq DNA 聚合酶活性所必需的，对反应有显著影响。浓度过低，酶活力显著降低，浓度过高，则易催化非特异性扩增。 Mg^{2+} 浓度还影响引物退火、模板与 PCR 产物的解链温度、引物二聚体的生成等。Taq DNA 聚合酶的活性只与游离的 Mg^{2+} 浓度有关，而 PCR 反应体系中，dNTP、引物、DNA 模板等中的所有磷酸基团均可与 Mg^{2+} 结合而降低 Mg^{2+} 的游离浓度。因此， Mg^{2+} 的总量比 dNTP 的浓度高 $0.2 \sim 2.5\text{mmol/L}$ 。如果反应体系中含有 EDTA 等螯合剂，也可结合掉部分 Mg^{2+} 。

（五）dNTP

dNTP 为 PCR 反应的合成原料。每种核苷酸的浓度应相同，通常的浓度范围为 $20 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ ，在此范围内，PCR 产物量、反应的特异性与忠实性之间处于最佳的平衡。dNTP 的浓度过低，则反应不充分，影响扩增效率；若 dNTP 的浓度大于 $50 \mu\text{mol/L}$ ，则抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。

（六）Taq DNA 聚合酶

多重 PCR 反应体系中同时存在多个 DNA 扩增反应，不同反应之间对 Taq DNA 聚合酶存在竞争，这种反应之间的竞争会使效率相对较低的 DNA 扩增受到很大程度的抑制。在多重 PCR 体系中适当多加入一些 Taq DNA 聚合酶可减弱竞争产生的抑制作用，但 Taq DNA 聚合酶过多则极易造成非特异性扩增。通常可根据不同产品的说明书进行调整优化。

六、双寡聚核苷酸引物多重 PCR 技术 (DPO-multi-PCR)

(一) 基本原理

特异性差、设计及操作过程复杂是限制普通多重 PCR 发展的因素。DPO 引物由 5' 端、多聚脱氧次黄嘌呤核苷 (polyI) 区和 3' 端三部分组成。由于脱氧次黄嘌呤核苷的退火温度比天然的碱基低, 在 PCR 扩增时, 多聚脱氧次黄嘌呤核苷区并不与模板结合, 而是形成了泡状突起, 使引物的 5' 端和 3' 端各具不同的功能: 5' 端的 18~25 个碱基起始引物与模板结合, 起固定作用; 3' 端的 6~12 个碱基则决定引物的特异性延伸, 两者相互作用, 既保证了扩增的特异性, 又大大提高了扩增效率。

(二) DPO 多重 PCR 的优势

对传统的多重 PCR 来说, 引物设计的好坏是其成败的关键。在设计引物的过程中, 不仅要考虑引物自身以及引物之间形成的二级结构, 还要考虑引物与模板的错配, 这就需要对大量的引物进行筛选, 费时费力。而 DPO 引物, 由于其特殊的结构, 引物自身以及引物之间很少形成二级结构, 使引物的设计变得更加简单。DPO 引物特异性非常强, 与模板发生错配的概率很小, 一旦有三个以上碱基错配, 就不会成功扩增。此外, DPO 引物适用范围较广, 对温度不敏感, 试验过程中无需对温度进行优化, 使操作过程变得更加简单。DPO 引物与多重 PCR 方法相结合, 既增强了 PCR 的特异性, 又提高了它的扩增效率。

DPO 引物因具有发生错配概率很小的特点还可以被用来检测基因突变。2007 年, Joog-Yoon Chun 和 Kyoung-Joong Kim 等首次把 DPO 多重 PCR 技术应用于呼吸道病毒的检测。2008 年, J. K. Kim 和 H. J. Lee 等设计的 DPO 引物成功地检测出了 HBV 病毒的突变株系。

(三) 以检测马铃薯病毒为例介绍 DPO 多重 RT-PCR 技术

田间条件下, 马铃薯种苗经常受到多种病毒的复合侵染。目前, 已经报道的危害马铃薯作物的病毒超过 25 种, 这些病毒严重地制约着马铃薯产业的发展。在我国, 常见且危害严重的马铃薯病毒有马铃薯 Y 病毒 (PVY) 和马铃薯 X 病毒 (PVX)。它们和黄瓜花叶病毒 (CMV) 一起危害广泛, 被世界上众多国家作为生产控制对象, 在种薯贸易中属于限定的非检疫性有害生物。烟草环斑病毒 (TRSV) 和马铃薯 V 病毒 (PVV) 是侵染马铃薯的两种具有检疫意义的病毒。针对这些病毒建立有效的检测方法, 对于保障种薯质量, 防止检疫性病毒扩散具有重要的意义。

针对我国具有重要检疫意义的马铃薯病毒 (PVV 和 TRSV) 和其他危害马铃薯的主要病毒, 采用 DPO 引物, 建立多重 RT-PCR 快速检测体系, 为马铃薯检验检疫和种薯健康评测提供有效手段。