

生物实验室系列

PCR 最新技术 原理、方法及应用

黄留玉 主编 王恒樑 史兆兴 苏国富 副主编



Chemical Industry Press



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

PCR 最新技术原理、方法及应用

黄留玉 主编

王恒樑 史兆兴 苏国富 副主编



化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北京 ·

(京)新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

PCR 最新技术原理、方法及应用/黄留玉主编. —北京:
化学工业出版社, 2004. 11

(生物实验室系列)

ISBN 7-5025-6327-X

I. P… II. 黄… III. 聚合酶-链式反应 IV. Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2004) 第 119434 号

生物实验室系列
PCR 最新技术原理、方法及应用

黄留玉 主编

王恒樑 史兆兴 苏国富 副主编

责任编辑: 郎红旗

责任校对: 陈 静

封面设计: 关 飞

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话: (010)64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京市昌平振南印刷厂印刷

三河市前程装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 27 字数 659 千字

2005 年 1 月第 1 版 2005 年 1 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-6327-X/Q · 122

定 价: 60.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

生物实验室系列图书

陆续出版的书目如下

- 发酵工程实验技术 (2004 年 3 月)
- 生物化学实验技术 (2004 年 4 月)
- 拟南芥实验手册 [影印] (2004 年 5 月)
- 现代生物科学仪器分析入门 (2004 年 6 月)
- 分子生物学与蛋白质化学实验方法 [译]
- 转基因动物技术手册 [译] (2004 年 9 月)
- RNAi——基因沉默指南 [译] (2004 年 10 月)
- 基因表达分析技术手册 [译]
- PCR 最新技术原理、方法及应用 (2005 年 1 月)
- 蛋白质与蛋白质组学实验指南 [译]
- 酵母育种实验技术
- 细胞分析技术
- 免疫分析技术
- 分析信息处理技术

主 编 黄留玉

副主编 王恒樑 史兆兴 苏国富

编 者 (以姓氏笔画为序)

马清钧	王 芑	王友亮	王军军
王恒樑	毛春明	方 言	邓继先
卢柏松	叶棋浓	史兆兴	冯尔玲
朱建华	刘秀丽	刘纯杰	刘志敏
刘 杰	刘 萱	许 龙	苏国富
杨志新	李凌凌	李 朝	李楚芳
李 霆	张 进	张 浩	张 燕
张部昌	张惟才	陈水平	林福玉
周建光	周晓巍	郑继平	赵庆国
段海清	侯利华	姜 涛	袁 静
袁盛凌	高亚兵	高荣凯	展德文
黄留玉	黄培堂	曹 诚	崔 芳
彭瑞云	蒋世卫	熊向华	颜 冰

出版者的话

21世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为21世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如17世纪Leeuwenhoek等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973年Cohn和Boyer完成了DNA体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988年Kary Mullis发明的PCR技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化工出版社组织出版了“生物实验室系列图书”。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列图书”的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列图书”的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

**谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的
科学工作者致以崇高的敬意！**

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
现代生物技术与医药科技出版中心

序

受作者之邀为这本书作序，初看书名我有点兴趣索然，因为当今 PCR 仪在实验室几乎是唾手可及，有关 PCR 的文章比比皆是，关于 PCR 的专著也不胜枚举。但本书的目录及编者诱使我浏览全书，翔实的内容及文风令我欣然命笔。

PCR 是分子生物学的常规方法，广泛的应用也促进了 PCR 自身的发展。PCR 已不再是单一的技术方法，而是一大类技术方法的总称。这些方法分散于多种书籍和资料之中，不便查寻和应用。本书对几十种 PCR 方法进行收集、分析和整理，比较全面地反映了 PCR 的全貌，在一定程度上将给广大分子生物学工作者的查阅提供方便。

PCR 是分子生物学的实用技术，需要对每种方面进行详细、实用的描述。这本书的编者正是一群几乎天天与 PCR 打交道的科研人员，他们将理论与实践相结合，对每一种 PCR 方法既介绍简要的原理，又有实用的操作步骤和应用示例，更有处理疑难问题的经验总结，是一本难得的 PCR 技术方法操作手册。

全面而实用使本书具备了工具书的基本特点。作为分子生物学工作者，执此书于案头或实验台旁，或读或查，相信都将有益于提高科研工作的质量和效率，推动科技事业的发展。

黄翠芬

中国工程院院士，军事医学科学院研究员

2004 年 4 月 26 日于北京

前 言

PCR 是分子生物学的关键技术，又是常规技术。PCR 技术的出现极大地推动了分子生物学的发展，旋即被迅速推广和应用到生命科学的其他领域。广泛的应用带动了 PCR 技术的发展，PCR 技术的发展又产生了新的应用。如此螺旋上升，使 PCR 技术在 20 年的时间里，从无到有，从只能单纯扩增已知两端序列之间的 DNA 片段，发展到应用于各个领域的几十种 PCR 方法，而且这种发展还在继续。

本书的重点不是介绍常规 PCR 的原理和方法，因为已出版了不少介绍这方面内容的书籍。编写本书的目的是想把到目前为止已报道的各种各样的 PCR 方法呈现给读者。在编排过程中发现把这些方法单独罗列出来显得有些凌乱，于是我们设法按照设计这些 PCR 方法的目的和应用进行归类，本书就把它们归成十四章。但发现这种归类也不完全合理，例如第二章是“反转录 PCR”，并没有也不可能把所有与反转录有关的 PCR 都列在这一章，所以在其他章节也有反转录 PCR 的内容。第五章的标题是“致突变 PCR”，但其他章节的 PCR 方法有的也能引起突变。还有，由于一个 PCR 方法有几种不同的用处，不可能把它归到各个章节中去，例如多重 PCR 被归在第十二章“PCR 在遗传病诊断中的应用”，但它还可用于感染性疾病的诊断、法医学和检测转基因动植物。所以，建议读者在寻找符合自己实验目的的 PCR 方法时，除了阅读与自己实验目的相符的章节外，还可参阅其他章节。以亲子鉴定为例，首先阅读第十一章“PCR 在法医学中的应用”，再参阅其他章节，因为其他章也有可用于亲子鉴定的 PCR 方法。为便于读者快速检索，我们尝试着编出主题索引，以技术方法和应用领域的关键词为主，置于书后，读者可参考使用。

由于本书是介绍技术方法的书，所以在编写时力求使提供的方法尽可能详细，对每一种方法提供了详细的反应体系和反应条件，但读者在具体应用时，也不宜照本宣科，应在实验过程中因势制宜，对实验条件进行必要的优化。

由于时间仓促，水平有限，书中难免有疏漏和错误之处，恳请读者指正。

黄留玉

2004 年 4 月 20 日于北京

军事医学科学院

目 录

第一章 绪论.....	1	参考文献	27
第一节 PCR发展简史	1	第六节 RNA-PCR	29
第二节 PCR技术的基本原理和操作	2	一、引言	29
一、PCR的基本原理	2	二、原理	29
二、PCR的基本成分	2	三、直接PCR	29
三、PCR的基本操作	4	四、两步PCR	31
第三节 PCR的主要应用	5	五、注意事项	31
一、基础研究方面的应用	5	六、应用	32
二、PCR在临床上的应用	6	七、小结	34
三、在法医学中的应用	7	参考文献	34
参考文献	8	第三章 扩增已知序列两侧DNA的PCR	35
第二章 反转录PCR	9	第一节 反向PCR	35
第一节 常规RT-PCR	9	一、引言	35
一、引言	9	二、基本原理	35
二、原理	10	三、材料	35
三、方法	10	四、方法	36
四、注意事项	12	五、注意事项	37
五、应用	15	六、应用	38
第二节 一步RT-PCR	18	七、小结	41
一、引言	18	参考文献	41
二、原理	18	第二节 锚定PCR	42
三、方法	19	一、引言	42
四、应用	20	二、原理	42
第三节 多标志物RT-PCR	21	三、用连接锚定PCR从基因文库中扩增 已知基因侧翼序列	44
一、引言	21	四、用互补锚定PCR直接扩增已知序列 侧翼cDNA序列	45
二、原理	22	五、问题及对策	49
三、方法	22	六、小结	50
四、应用	22	参考文献	50
第四节 反转录-快速PCR	23	第三节 RACE——cDNA末端的快速 扩增	50
一、引言	23	一、引言	50
二、原理	23	二、RACE基本原理	51
三、方法	23	三、实验方案	53
四、应用	24	四、RACE的应用	56
第五节 反向连接介导的PCR	24	五、小结	57
一、引言	24	参考文献	57
二、原理	25		
三、方法	25		
四、应用	26		

第四节 连接介导的 PCR	57	二、原理	96
一、引言	57	三、材料	96
二、原理	58	四、方法	96
三、材料	58	五、注意事项	99
四、操作步骤	59	六、应用	100
五、注意事项	61	七、小结	103
六、应用	62	参考文献	103
七、小结	65	第六节 外显子捕获 PCR	104
参考文献	65	一、引言	104
第四章 扩增未知 DNA 序列的 PCR	66	二、原理	104
第一节 差异显示 PCR	66	三、内部外显子捕获的方法	106
一、引言	66	四、3'端外显子捕获的方法	111
二、原理	66	五、注意事项	112
三、方法	67	六、应用	112
四、应用	71	七、小结	113
五、小结	73	参考文献	113
参考文献	74	第五章 致突变 PCR	115
第二节 限制性显示 PCR	75	第一节 随机错误掺入构建突变体库	116
一、引言	75	一、引言	116
二、基本原理	75	二、原理	116
三、材料与方 法	75	三、材料与方 法	116
四、注意事项	78	四、注意事项	117
五、应用	79	五、讨论	117
六、小结	80	第二节 构建定点突变序列或重组序列	118
参考文献	80	一、引言	118
第三节 消减 PCR	80	二、原理	118
一、引言	80	三、重叠延伸 PCR 构建定点突变体	121
二、原理	81	四、重组 PCR 构建定点突变质粒	123
三、材料	82	五、大引物 PCR 构建定点突变体	123
四、方法	83	六、注意事项	124
五、应用	85	七、讨论	124
六、小结	86	第三节 排除野生型 DNA 的定点突变	
参考文献	86	PCR	125
第四节 简并 PCR	86	一、引言	125
一、引言	86	二、原理	125
二、原理	87	三、材料与方 法	126
三、材料	87	四、注意事项	128
四、方法	87	五、讨论	128
五、注意事项	90	参考文献	130
六、应用	91	第六章 定量 PCR	131
七、小结	93	第一节 定量 PCR	131
参考文献	94	一、引言	131
第五节 Alu-PCR	95	二、原理	132
一、引言	95	三、方法	138

四、应用	139	七、小结	187
参考文献	139	参考文献	187
第二节 实时 PCR	139	第三节 PCR-ELISA	188
一、引言	139	一、引言	188
二、原理	140	二、原理	189
三、荧光标记与探针类型	141	三、材料	190
四、相对定量和标准曲线定量	145	四、方法	190
五、引物设计	146	五、注意事项	191
六、污染的预防 and 热启动	148	六、应用	191
七、实时 Q-PCR 实验	148	七、小结	194
八、实时反转录 PCR (实时 RT-PCR)	152	参考文献	194
九、实时 PCR 的局限性	157	第四节 原位 PCR	194
参考文献	157	一、引言	194
第三节 竞争性 PCR	159	二、基本原理	195
一、引言	159	三、原位 PCR 方法分类及其设计方案	195
二、原理	159	四、原位 PCR 基本步骤	197
三、方法	163	五、原位 PCR 方法的选择	199
四、应用	166	六、原位 PCR 操作注意事项	200
五、小结	169	七、原位 PCR 存在的问题和结果分析	201
参考文献	169	八、原位 PCR 的应用	202
第四节 内部控制的病毒粒子 PCR	171	九、原位 PCR 操作程序示例	203
一、引言	171	十、小结	206
二、原理	171	参考文献	206
三、材料和方法	171	第八章 重组和表达 PCR	207
四、注意事项	173	第一节 重组 PCR	207
五、应用	173	一、引言	207
六、小结	173	二、基本原理	207
参考文献	173	三、方法	207
第七章 免疫 PCR	174	四、应用	209
第一节 免疫 PCR	174	五、小结	213
一、引言	174	参考文献	213
二、原理	174	第二节 不依赖连接反应的克隆 PCR	214
三、材料和试剂	176	一、引言	214
四、方法	177	二、基本原理	214
五、应用	178	三、材料	216
六、小结	181	四、方法	217
参考文献	181	五、注意事项	217
第二节 免疫捕捉 PCR	181	六、应用	217
一、引言	181	参考文献	219
二、基本原理	182	第三节 融合 PCR	220
三、材料	182	一、引言	220
四、方法	183	二、融合 PCR 的原理	220
五、注意事项	185	三、融合 PCR 的具体操作步骤	220
六、应用	185	四、融合 PCR 的应用	221

五、融合 PCR 操作方法的注意事项	224	七、小结	257
六、结语	225	参考文献	258
参考文献	225	第五节 巢式 PCR	258
第四节 表达 PCR	226	一、引言	258
一、引言	226	二、原理	258
二、基本原理	226	三、材料	259
三、材料	227	四、方法	259
四、方法	227	五、注意事项	260
五、应用	229	六、应用	260
参考文献	229	七、小结	260
参考文献	229	参考文献	260
第九章 其他 PCR 方法	231	第十章 PCR 在基因分型中的应用	261
第一节 高 GC 含量 DNA 的 PCR 扩增	231	第一节 任意引物 PCR	261
一、使用增强剂改善高 GC 含量 DNA		一、引言	261
模板的 PCR 扩增	231	二、任意引物 PCR 的基本原理及技术	
二、NaOH 对模板进行预处理改善高 GC		特点	261
含量 DNA 的 PCR 扩增	235	三、AP-PCR 方法	262
三、利用高温 PCR 体系改善高 GC 含量		四、RAP-PCR 方法	263
DNA 模板的 PCR 扩增	236	五、注意事项	264
四、应用	237	六、应用	264
五、小结	237	七、小结	268
参考文献	238	参考文献	268
第二节 长片段 PCR	238	第二节 广谱 PCR	269
一、引言	238	一、广谱 PCR 简介	269
二、原理	239	二、广谱 PCR 模板制备方法	271
三、材料	239	三、引物设计	272
四、方法	240	四、应用举例——HPV 广谱 PCR	
五、注意事项	241	检测	275
六、应用	243	参考文献	276
七、小结	245	第三节 共同区 PCR	278
参考文献	245	一、引言	278
第三节 不对称 PCR	245	二、基本原理	278
一、引言	245	三、材料	279
二、引物浓度不对称 PCR	246	四、方法	280
三、热(引物长度)不对称 PCR	248	五、注意事项	282
四、应用	252	六、应用	282
五、小结	253	七、小结	284
参考文献	253	参考文献	284
第四节 降落 PCR	254	第四节 两对交叉引物 PCR	285
一、引言	254	一、引言	285
二、原理	254	二、基本原理	286
三、材料	254	三、材料	286
四、方法	255	四、方法	286
五、降落 PCR 与常规 PCR 的比较	255	五、注意事项	287
六、应用	257		

六、应用	287	五、注意事项	316
七、小结	287	六、应用	316
参考文献	287	七、小结	317
第五节 REP-PCR	288	参考文献	318
一、引言	288	第二节 小卫星可重复序列 PCR	319
二、基本原理	288	一、引言	319
三、材料	289	二、原理	319
四、方法	289	三、方法	320
五、注意事项	290	四、应用	323
六、应用	291	五、小结	324
七、小结	293	参考文献	325
参考文献	293	第三节 全基因组 PCR	326
第六节 稀有限制性位点 PCR	294	一、引言	326
一、引言	294	二、全基因组 PCR 的种类	326
二、原理	295	三、基因组 DNA 模板的制备	331
三、材料	297	四、不同 WGA 方法的比较	331
四、方法	297	五、WGA 的产物分析及应用	332
五、注意事项	298	六、小结	334
六、应用	298	参考文献	334
七、小结	299	第十二章 PCR 在遗传病诊断中的应用	336
参考文献	299	第一节 多重 PCR	336
第七节 序列特异性引物 PCR	300	一、引言	336
一、引言	300	二、原理	336
二、基本原理	300	三、方法	336
三、应用	300	四、应用	339
四、注意事项	303	五、小结	342
五、在其他方面的应用	304	参考文献	342
六、小结	305	第二节 等位基因特异 PCR	343
参考文献	305	一、引言	343
第八节 简单序列重复区间 PCR	306	二、原理	344
一、引言	306	三、材料	345
二、原理	306	四、方法	345
三、材料	306	五、注意事项	345
四、方法	307	六、对等位基因特异 PCR 的改进	346
五、注意事项	308	七、应用	346
六、应用	308	八、小结	347
七、小结	309	参考文献	347
参考文献	309	第三节 缺口 PCR	348
第十一章 PCR 在法医学中的应用	310	一、引言	348
第一节 短串联重复序列的 PCR	310	二、基本原理	348
一、引言	310	三、材料	349
二、原理	311	四、操作步骤	349
三、材料	312	五、注意事项	350
四、方法	312	六、应用	350

七、小结	350	三、操作方法	379
参考文献	350	四、注意事项	380
第十三章 PCR在癌症诊断中的应用	352	五、应用	380
第一节 BCR-ABL PCR	352	第二节 PCR偶联连接酶链式反应	381
一、引言	352	一、原理	381
二、应用	354	二、材料	382
三、小结	359	三、方法	383
参考文献	360	四、注意事项	384
第二节 柄柄式 PCR	361	五、应用	385
一、引言	361	第三节 PCR-单链构象多态性	386
二、原理	362	一、原理	386
三、材料	362	二、材料	386
四、操作步骤	362	三、方法	387
五、应用	365	四、注意事项	388
参考文献	365	五、应用	390
第三节 杂合性缺失 PCR	367	第四节 PCR-变性梯度凝胶电泳	390
一、引言	367	一、原理	390
二、基本原理	367	二、材料	391
三、材料	367	三、操作方法	391
四、方法	368	四、注意事项	393
五、注意事项	368	五、应用	393
六、应用	369	第五节 序列特异性寡核苷酸多态性 PCR	394
七、小结	370	一、原理	394
参考文献	370	二、试剂	394
第四节 单细胞 PCR	370	三、方法	395
一、引言	370	四、注意事项	399
二、基本原理	370	五、应用	399
三、材料和方法	371	第六节 PCR测序法	400
四、注意事项	375	一、直接测序法	400
五、应用	375	二、循环测序方法	401
六、小结	376	三、全自动 DNA 测序	403
参考文献	376	四、应用	404
第十四章 PCR与其他方法联合应用	378	参考文献	405
第一节 限制性片段长度多态性 PCR	378	索引	407
一、原理	378		
二、材料	378		

第一章 绪 论

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是体外扩增 DNA 序列的技术。它与分子克隆和 DNA 序列分析方法几乎构成了整个现代分子生物学的实验工作的基础。在这三种实验技术中, PCR 方法理论上出现最早, 实践中应用也最广泛。PCR 技术使微量的核酸 (DNA 或 RNA) 操作变得简单易行, 同时还可使核酸研究脱离于活体生物。PCR 技术的发明是分子生物学的一项革命, 极大地推动了分子生物学以及生物技术产业的发展。

第一节 PCR 发展简史

核酸研究已有 100 多年的历史。20 世纪 60 年代末 70 年代初人们致力于研究基因的体外分离技术, 但由于核酸的含量较少, 在一定程度上限制了 DNA 的体外操作。Khorana 于 1971 年最早提出核酸体外扩增的设想: “经过 DNA 变性, 与合适的引物杂交, 用 DNA 聚合酶延伸引物, 并不断重复该过程便可合成 tRNA 基因”。但由于当时基因序列分析方法尚未成熟, 热稳定的 DNA 聚合酶尚未报道, 以及寡聚核苷酸引物合成还处在手工及半自动合成阶段, 这种想法似乎没有实际意义。

1983 年的一天, 美国科学家 Kary Mullis 驱车在蜿蜒的州际高速公路上行驶中, 孕育出了 PCR 技术的原型。经过两年的努力, 他在实验上证实了 PCR 的构想, 并于 1985 年申请了有关 PCR 的第一个专利, 在 Science 杂志上发表了第一篇 PCR 的学术论文。从此 PCR 技术得到了生命科学界的普遍认同, Kary Mullis 也因此获得了 1993 年的诺贝尔化学奖。但 Mullis 最初使用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段, 这虽然较传统的基因扩增具备许多突出的优点, 但由于 Klenow 酶不耐热, 在 DNA 模板进行热变性时, 会导致此酶钝化, 每加入一次酶只能完成一个扩增反应周期, 给 PCR 技术操作程序添了不少困难。这使得 PCR 技术在当时成了一种笨拙的中看不中用的实验室方法。

1988 年初, Keohanog 改用 T4 DNA 聚合酶进行 PCR, 其扩增的 DNA 片段很均一, 真实性也较高, 只有所期望的一种 DNA 片段。但每循环一次, 仍需加入新酶。

1988 年 Saiki 等从温泉中分离的一株水生嗜热杆菌 (*Thermus aquaticus*) 中提取到一种耐热 DNA 聚合酶。此酶耐高温, 在热变性时不会被钝化, 不必在每次扩增反应后再加新酶, 从而极大地提高了 PCR 扩增的效率。为与大肠杆菌聚合酶 I Klenow 片段区别, 将此酶命名为 *Taq* DNA 聚合酶 (*Taq* DNA polymerase)。此酶的发现使 PCR 方法得到了广泛的应用, 也使 PCR 成为遗传与分子分析的根本性基石。

在以后的十多年里, PCR 方法不断地被改进。例如, 应用具有 3'→5'修复合性的热稳定 DNA 聚合酶代替不具 3'→5'修复合性的 *Taq* DNA 聚合酶, 减少了在扩增过程中产生的错误配对, 大大提高了在复制过程中的真实性。原来的 PCR 只能扩增两段已知序列之间的 DNA, 现在可以扩增到已知序列两侧的未知序列^[1], 甚至可以扩增到序列未知的新基因^[2]。PCR 的模板也从原来要用的 DNA 发展到直接用 RNA 作为模板, 即反转录 PCR, 这就使得从真核生物中扩增目的基因变得很容易。PCR 原本是一种定性的方法, 只能回答样品中有

无目的基因存在，现在已经可以用来定量测定^[3]，即回答样品中原始模板的确切数目。PCR 扩增的片段也从原先只能扩增几个 kb 的基因到目前已能扩增长达几十个 kb 的 DNA 片段^[4]。PCR 也从单纯用来扩增基因到能将两个以上的基因连接起来，省去了限制性内切酶消化和用连接酶连接的步骤，这就是所谓的克隆 PCR^[5]。再加上 PCR 方法与其他方法联合应用，到目前为止已报道的 PCR 方法有几十种之多。

总之，自 PCR 方法建立以来，在 20 多年的时间里发展很快，已有一系列 PCR 方法被设计出来，并广泛应用于遗传学、微生物学乃至整个生命科学研究中。PCR 的建立大大地推动了生命科学的发展。由于 PCR 的实用性和极强的生命力，PCR 方法还将会被不断完善，进一步在生命科学研究中发挥更大的作用。

第二节 PCR 技术的基本原理和操作

一、PCR 的基本原理^[6]

PCR 的基本工作原理是以拟扩增的 DNA 分子为模板，以一对分别与模板互补的寡核苷酸片段为引物，在 DNA 聚合酶的作用下，按照半保留复制的机制沿着模板链延伸直至完成新的 DNA 合成。不断重复这一过程，可使目的 DNA 片段得到扩增。因为新合成的 DNA 也可以作为模板，因而 PCR 可使 DNA 的合成量呈指数增长（图 1-1）。

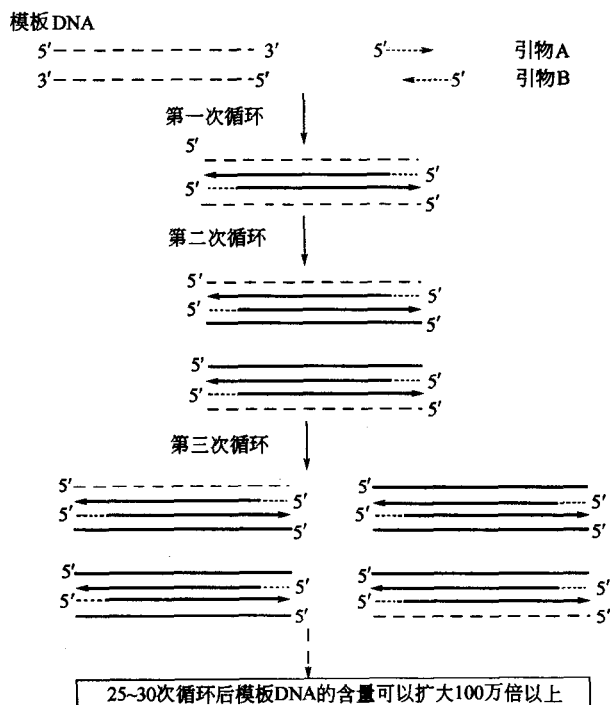


图 1-1 PCR 工作原理

二、PCR 的基本成分

PCR 包括 7 种基本成分：模板 DNA、特异性引物、热稳定 DNA 聚合酶、脱氧核苷三磷酸（dNTP）、二价阳离子、缓冲液及一价阳离子。