

湖南科学技术出版社

聚合酶链反应原理及应用

张阳德 编译
周 健

聚合酶链反应原理及应用

主编译 张阳德 周 健

编译者 盛祖嘉 谢慎思 唐冬生 欧石生

黄醒亚 张阳德 周 健

湘新登字004号

聚合酶链反应原理及应用

张阳德 周 健编译

责任编辑：朱碧金

*

湖南科学技术出版社出版发行

(长沙市展览馆路8号)

湖南省新华印刷二厂印刷

*

1992年10月第1版第1次印刷

开本：850×1168毫米 1/32 印张：10.125 字数：262,000

印数：1—2,000

ISBN 7—5357—1003—4

O · 95 定价：8.20元

序 言

在自然科学研究中研究方法的创新往往对于学科的发展起着重要的作用，聚合酶链反应（PCR）便是近年来在分子生物学中出现的一项应用十分广泛的新技术。PCR创立于1985年，1985—1988年间杂志上发表的有关PCR的论文不足20篇，而1990年一年中发表的这方面的论文竟达一千余篇，由此可见这一技术的重要性及其飞速的发展。

我国的科学工作者在1984年自行由温泉中分离的细菌纯化了耐热DNA聚合酶并提供给全国各个实验室使用。到目前为止，国内已有不下100个单位在开展应用PCR技术的工作，包括遗传病检测、传染病原鉴定、奶牛育种、罪犯侦察和分子生物学研究等，而且先后已办了一二十个学习班。可以预见发展趋势还在继续。

在这种形势下，一本系统的PCR技术书籍为许多学者所渴望。张阳德等同志把美国最新出版的《PCR Protocols》等书及时地编译成中文，这是一件很有意义的工作，相信它对于推进我国PCR技术的研究和应用将会起到很重要的作用。

国家自然科学基金委员会生命科学部主任
复 旦 大 学 生 物 系 教 授 盛祖嘉

1991年5月于复旦大学

编译者前言

分子生物学方法的应用使得生物学、医学的微观纵深研究出现了一个新的飞跃，许多过去无法解决的难题现已能得出明确的结论。然而，人们为了从生物材料中获得某一段特定的DNA序列，却需花费大量的时间和许多重复的劳动。1985年美国发明了一项专利，即聚合酶链反应(PCR)，给分子生物学带来了新的生机。但是，DNA聚合酶的稳定性一直困扰着分子生物学工作者。不久，渴望的人们终于在温泉中找到了耐热的Taq酶，解决了PCR技术中的关键。至此，分子生物学方法发生了巨大的变革，人们不断地研究Taq酶的生产 and 纯化，并研究出自动化仪器——热循环仪，使研究者们从大量重复繁杂的工作中解脱出来，并且获得比以前更为欣慰的结果。PCR技术的发展，使得该高新技术得以广泛应用于遗传、法医、考古、肿瘤、微生物检测实践等等，并具有更为广泛的发展前景。

从事分子生物学或PCR的工作者，都渴求一本PCR技术的手册。为此，我们根据PCR技术发明者——Cetus公司编著的《PCR Protocols》和《PCR Technology》以及其他专著为蓝本，结合最新科技期刊有关论文报道编译成本书，以促进PCR在我国的发展。作为分子生物学、PCR实验室的案头蓝本，本书以实用方法为主。每章均以具体操作方法为重点并举有适当的应用实例，包括大量的应用样品图表，而对该方法的原理及技术难点，以讨论或提示的形式说明。本书共55章，分为五个部分。第一部分为基本原理与方法学，是本书的纲；第二部分是由基本方法发展的应用于研

究工作的实用方法，为本书纲与目之间的连结点；第三、四部分为PCR在遗传进化和临床诊断及法医等方面的具体应用，这些方法拿来即可用，立竿见影，此为本书之目；第五部分介绍仪器设备与材料，对初建PCR实验室者，该部分将告诉您怎样动手制作热循环仪等，该部分可看作本书之附录。

本书第一部分由Fanny唐冬生、张阳德、谢慎思、周健审校，第二部分由张阳德、周健、姚保山、欧石生审校，第三部分由张阳德、唐冬生、石明审校。第四部分由张阳德、杨友云、杨兴全、唐冬生审校，第五部分由唐冬生、黄景奎、石明审校。此外，张圣道、韩明、曹萍、赵伟强、徐冰冰、申竑、温腾远亦参加了部分章节的校对。由于PCR是最近几年发展的高新技术，有关PCR的中文书籍极少，某些专业术语的中文名称尚未统一，给本书的编译审校带来不少困难。我们尽量参考最近有关资料，力求使用比较公认的专业术语的中文名称。由于以上原因，加上我们对该技术的熟悉程度有限，以致本书会有不少欠妥之处，敬请广大读者谅解。

本书的编译出版得到各个方面的大力支持。首先感谢 Cetus 公司提供该书最新版本。承蒙国家自然科学基金委员会黄醒亚主任、叶鑫生教授及该基金委员会生命科学部主任、复旦大学生物系教授盛祖嘉老前辈的支持和鼓励。同时，湖南科技出版社作了大量的编辑加工工作；“世界之星”包装设计大师李渔先生亲自为本书设计封面；本书在出版的全过程中，得到的南医科大学和附一医院领导，有关单位的专家、同仁的帮助与指导；湖南省新华印刷二厂给予大力支持，在此一并感谢。

编译者 张阳德等

1991年于美国纽约和中国长沙

目 录

□第一部分 基本原理与方法学

1 PCR的优化技术	(1)
2 基因组DNA的扩增	(8)
3 RNA的扩增	(14)
4 RACE, cDNA末端快速扩增	(19)
5 DNA扩增的变性引物	(28)
6 应用变性引物克隆cDNA	(32)
7 PCR用7-Deaza-2'-脱氧鸟苷三磷酸盐	(37)
8 竞争PCR进行mRNA定量	(41)
9 定量PCR	(48)
10 不对称PCR产生单链DNA	(53)
11 PCR进行克隆	(57)
12 寡聚核苷酸连接测定	(62)
13 非同位标记探针和引物	(66)
14 生物素化dUTP的结合	(77)
15 PCR产物的非同位素检测	(81)
16 耐热DNA聚合酶	(88)
17 减少PCR产物残留的方法	(94)
18 血液、细胞和其它体液标本的制备	(97)
19 石蜡包埋组织的标本制备	(102)
20 古代DNA的扩增	(107)

□第二部分 研究应用

- 21 PCR模板的体外转录(112)
- 22 重组PCR(118)
- 23 DNA酶I足迹(122)
- 24 TaqDNA聚合酶测序(126)
- 25 用噬菌体启动子直接测序(130)
- 26 变性梯度凝胶电泳鉴定DNA多态性(136)
- 27 反向PCR扩增旁侧序列(145)
- 28 同源重组体的检测(151)
- 29 RNA处理: 戴脂蛋白B(158)
- 30 以转录为基础的扩增系统(163)
- 31 λ gt11基因库的筛选(168)

□第三部分 遗传与进化

- 32 HLA DNA分型(172)
- 33 多重PCR诊断杜兴氏肌营养不良(180)
- 34 真菌菌丝体和单个芽胞DNA的分离(186)
- 35 甲型血友病的遗传学预测(190)
- 36 单个精子或二倍体细胞的单倍型分析(199)
- 37 核糖体RNA基因的扩增进行分子进化研究(205)
- 38 真菌核蛋白体RNA基因的直接测序和扩增研究种系发生(210)

□第四部分 诊断学和法医学

- 39 人类T细胞淋巴瘤和白血病病毒的检测(217)
- 40 人类免疫缺陷病毒检测(228)
- 41 乙型肝炎病毒的检测(236)
- 42 人类生殖乳头状瘤病毒的分型和检测(241)
- 43 人类巨细胞病毒的检测(250)
- 44 肠道病毒的PCR扩增(253)
- 45 新病毒(257)
- 46 PCR和寡核苷酸杂交分析ras基因点突变(262)

47	B细胞淋巴瘤; t(14, 18) 染色体重排.....	(266)
48	PCR和基因探针检测环境水样中细菌病原体	(272)
49	PCR诊断视网膜母细胞瘤	(277)
50	亲缘关系的鉴定.....	(283)

□第五部分 仪器设备和材料

51	茶杯内PCR	(291)
52	一个低耗价的空气驱动循环炉	(295)
53	组织包埋机改作自动PCR仪	(301)
54	组建一个PCR工作实验室.....	(301)
55	基本设备和材料.....	(310)

第一部分 基本原理与方法学

1 PCR的优化技术

聚合酶链反应 (PCR) 技术是进行分子生物学研究的一个具有独创性的新方法, 它对于分子生物学研究工作的影响与当年限制性内切酶的发现和Southern印迹的发明一样重大。PCR技术非常灵敏, 它可以使一个DNA分子被扩增, 也可以按常规从基因组序列的混合物中提取出单个的拷贝基因, 并且在琼脂糖凝胶上区分出可见的带。来自于单个噬菌斑或细菌菌落的插入基因, 也可以用PCR技术进行直接快速筛选和/或序列测定。PCR技术的改进, 譬如由Kary Mullis发明的耐热DNA聚合酶的应用和操作的自动化促进了PCR技术的各种应用的发展。因此, PCR技术的每一次新的应用对它都提出最优化的要求。我们遇到的一些问题包括: 缺乏可被检测得出的产物, 或者说希望得到的一些产物量很少; 由于引物的错误配对或错误延伸而导致的非特异背景带的存在; “引物二聚体” (“primer dimers”) 的形成与所需产物竞争性扩增; 由于错误接合而导致的突变和异质性。本章的主要目的是以讨论影响特异性、精度、所需产物的产量的参数来促进最优化的进程。以下这些建议来自于我们应用Taq DNA聚合酶的实践经历。

1.1 标准PCR扩增方法

当我们在标准条件下扩增众多靶序列的时候, 这一标准条件

主要是指设计PCR技术的新的应用而提供的起始条件。对于即将进行一个PCR的应用，这些条件有利于PCR的最优化，尤其有利于那些需要适当操作的重复诊断或分析步骤。

1. 在一个0.5ml的微量离心管中，其中反应物加入100 μ l的反应物，混匀，然后在试管中液体上面加一层矿物油，

模板DNA ($10^5 \sim 10^6$ 个靶分子*)

每种引物20pmol ($T_m > 55^\circ\text{C}$ 最好)

20mM** Tris-HCl (pH8.3) (20°C)

1.5mM MgCl_2

25mM KCl

0.05% Tween 20

100 μ g/ml高压灭菌的明胶或去掉核酸酶的牛血清白蛋白

每种dNTP50 μ M

2个单位的Taq DNA聚合酶

2. 利用下列温度进行PCR操作25~35次循环：

变性温度 96°C ，15秒（常常可以得到较长的起始时间）

引物退火温度 55°C ，30秒

引物延长温度 72°C ，1.5分钟

3. PCR操作的循环次数应包括在 72°C 约5分钟的最后一次延长。冷却至 4°C 和/或加入EDTA至10mM以终止反应。

1.2 酶 浓 度

Taq DNA 聚合酶的一个比较好的浓度范围在其他参数都最合适的时候每100 μ l反应物含1~2.5单位 ($\text{SA} = 20\text{u}/\text{pmol}$)。然而，酶的需要量是随特定的模板或引物而变化的。当要用PCR技

* 1 μ g人的单拷贝基因组DNA等于 3×10^5 个靶分子；10ng酵母DNA等于 3×10^5 个靶分子；1ng大肠杆菌DNA等于 3×10^5 个靶分子；一个M13噬菌斑的1%等于 10^6 个靶分子。

** mM代表mmol/L，M代表mol/L。

术成功地作一个试验的话，我们建议试验者测试一下酶浓度，范围0.5~5个单位/100 μ l，并用凝胶电泳测定一下结果。如果酶的浓度太高，非特异的背景产物增加，如浓度太低，不能产生足量的所需产物。

注意：来自不同厂商的Taq DNA聚合酶的作用可以不同，是由于配方、测定的条件和/或单位的标准不同。

1.3 三磷酸脱氧核苷酸

贮存的dNTP溶液应中和至pH7.0，并且它们的浓度应该用分光光度计测定一下。将原始的贮存液稀释至10mM，分成几份，贮存于20℃。要用的贮存液最好每一种dNTP含1mM。dNTP溶液的稳定性在用PCR技术重复50次之后将保持50%。每种脱氧核苷酸浓度在20和200 μ M之间，可在产量、特异性和精确度方面得到最好的平衡。这四种dNTP应该用相等的浓度以减少错配，用低浓度dNTP将提高PCR技术的特异性和精确度，而不像以前用Klenow介导的PCR技术那样(每种1.5mM)。低浓度的dNTP可以减少引物在非靶位的错误引导并且降低延长时错误配对核苷酸的可能性。为了一定长度和组成的靶序列，实验应该决定dNTP的最低浓度。例如，在一个100 μ l的反应物中，每种dNTP20 μ M在理论上可以合成2.6 μ g的DNA或10pmol的400bp的序列。最近，在ras点突变的等位基因特异扩增中，运用低浓度的(每种2 μ M)能得到较高的灵敏度(1/10⁷)。

1.4 镁浓度

将镁浓度最优化是有好处的。镁浓度可以影响下面所有这些，引物的退火，模板与PCR产物的解链温度，产物的特异性，引物二聚体的形成和酶活性及精度。TaqDNA聚合酶需要最终能被模板DNA、引物和dNTP所结合的镁离子。

应注意在引物贮存液或模板DNA中EDTA或其他螯合物的存在会影响镁的有效浓度。

1.5 其它反应成分

一个较好的PCR缓冲液是在20℃时测定的 10~50mM Tris-HCl (pH8.3~8.8)。Tris是双极性离子缓冲液, 它的pKa在20℃是8.3, ΔpK_a 是 $-0.021/^\circ\text{C}$, 因此, 在典型的热循环条件下20mM Tris(pH8.3)在20℃时的真实pH变动于7.8和6.8之间。加入50mM以上的KCl会抑制Taq DNA多聚酶的活性。DMSO在用大肠杆菌DNA多聚酶I的Klenow片段进行PCR中是有用的10%, DMSO会抑制50%的Taq DNA多聚酶活性(见第16章), 同时它很少被人们用于众多的实验, 一个例外就是Chamberlain 等的实验记录描述了在同一反应中扩增多序列(见第33章)。

尽管许多实验操作未加任何蛋白, 但是含有明胶或牛血清白蛋白(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和非离子化的去污剂如Tween20 或 Laureth 12(0.05~0.1%) 有助于稳定酶。

1.6 引物退火

引物退火所需要的温度和时间长短是由起扩增作用的引物的碱基组成、长度及浓度决定的。一个可行的退火温度为低于引物 T_m 5℃的温度, 因为Taq DNA多聚酶可以在一个较宽的温度范围内有活性, 所以引物延长可发生在较低的温度, 包括退火这一步。在20~85℃之间酶活性变化为两个数量级。一般来说, 退火温度在55~72℃之间会产生好的结果。在标准的引物浓度(0.2 μM)下, 退火只需几秒。

升高退火温度可以增强对于错误退火的引物的识别力以及减少核苷酸在引物3'末端的错误延长。因此, 严格退火温度, 尤其是在开始的几次循环中, 将有助于提高特异性。要在起始的循环中产生最高的特异性, Taq DNA多聚酶应该在第一次变性后的引物退火过程中加入。较低的延长温度同时伴随着较高的 dNTP浓度将导致引物的错误延长和错配核苷酸的延长。由于这些原因, 一些研究者认为 PCR 操作应用较长的引物且只需两个温度, 例

如：从55~75℃为退火和延长温度，94~97℃为变性和解链的温度。

1.7 引物延长

延长时间是由靶序列的浓度和长度以及延长温度所决定的。引物延长以往是在72℃下操作的，因为这个温度接近M13为模板的引物延长的最优温度。对于在72℃核苷酸配对的速率估计是35~100个核苷酸/秒，这是由缓冲液、pH、盐浓度及DNA模板性质决定的。在72℃延长时间为1分钟，对于产生长度为2kb的产物是足够的。然而，如果引物浓度很低，延长时间较长对于最开始的几次循环和当产物浓度已超过酶浓度的最后几次循环是很有用的。

1.8 变性的时间和温度

导致PCR失败的最可能的原因是靶模板和/或PCR产物变性不彻底。典型的变性条件是95℃约30秒或97℃约15秒；然而，较高的温度也合适，尤其是对于G+C丰富的靶序列来说。在一个DNA的解链温度(T_{ss})下保持DNA变性只需几秒钟；然而，在一个反应试管中，却要一定的时间才能达到 T_{ss} 。在一个反应试管中加入小型热电偶的探针以监视温度不失为一个好办法。不完全的变性将使得已变性的DNA又重新合在一起，因而将会使产量减少。与其他步骤相比较，变性这一步温度太高或时间太长，从而导致酶活性的不必要的丧失。Taq多聚酶活性的半衰期在92.5℃，95℃和97.5℃时分别为大于2小时，40分钟和5分钟(见第16章)。

1.9 循环次数

当其它条件都已最优化后，最适当的循环次数主要取决于靶DNA的起始浓度。人们常犯的错误是做许多次循环。用Ksary Mullis的一句话来说就是“如果你做了40次循环以扩增一个拷贝的基因，那你的PCR就出现很严重的错误”。太多循环将会增加非特异背景产物的量及复杂程度(见平台效应)。当然，太少的循环

又会使产量很低。一些靶分子起始浓度对应的循环次数如下。

靶分子数	循环次数
3×10^5	25~30
1.5×10^4	30~35
1×10^3	35~40
50	40~45

1.10 引 物

引物浓度在 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{M}$ 是最合适的。较高的引物浓度将提高引物错配和非特异产物的积聚以及增加不依赖模板的引物二聚体产生的可能性。非特异产物及引物二聚体都是PCR的底物并且与所需的产物竞争酶、dNTP和引物，由此导致所需产物的产量很低。

一些简单的规则有助于高效率引物的设计。典型的引物是18~28个核苷长度，具有50~60%的G+C成分。如果可能的话，应该在引物内部避免回文序列。如果这些都不行的话，常常就得另用一对不同的引物试一下。一些引物失败的不太明显的原因是由于模板DNA二级结构的存在。在这种情况下，用7-deaza-2'-dGTP代替dGTP是很有效的（见第7章）。

为特殊目的而设计的引物将在其它章节进行讨论。简单地说，引物可能包含5'端延伸或错配于与限制酶结合的位点上，该位点是一个ATG起始密码子，或把启动序列包含在靶序列中（见第11章），被放进去的错配的碱基会产生突变。在基因和/或氨基酸序列相似的基础上，变性的引物可被用于分离新的基因（见第5、6章）。一些作者建议含次黄嘌呤核苷的引物代替变性引物。当用变性引物时，它有助于避免3'末端的退变，因为错配的碱基不足以延伸。

1.11 平台效应

“平台效应”这个词用于描述在PCR循环的后期，所需产物积聚到 $0.3 \sim 1 \text{ pmol}$ 时，产物积聚的指数速率的衰减。依赖于反应条

件和温度的循环，下述一个或多个因素会影响平台：①底物的应用（dNTP或引物）；②反应物的稳定性（dNTP或酶）；③终产物抑制（焦磷酸，双链DNA）；④非特异产物或引物二聚体竞争反应物；⑤特异产物在高于10mM的浓度下重新退火（可能降低延长速率或Taq DNA多聚酶的工作活性或引起产物链的侧支游离和引物的错误安置）；⑥在高产物浓度下不完全的变性/产物的解链。

到达平台的一个最严重的后果是来自于引物错配的低起始浓度的非特异产物会继续被优先扩增。PCR循环次数的最优化是避免扩增背景产物的最好方法。

1.12 精度的考虑

引起错误结合升高的情况包括：当脱氧核苷酸浓度大大低于 K_m （即 $<1\mu M$ ）或当一种dNTP的浓度相对低于其它三种之时。我们证明，一个相当大的“链终端”序列阶梯可以产生而不需要用在四个分开的测序反应中受一种dNTP限制的双脱氧核苷酸。相比之下，当四种dNTP的浓度均大于 $10\mu M$ 且被平衡之后，我们没有观察到错配带（背景为测序用琼脂糖凝胶）。我们推荐用dNTP被平衡好了的浓度以消除错配。因为错配碱基将不会有效地延长，错配将在PCR促进链终止时发生。链终止限制了缺陷分子的扩增且有助于保持精度。

用什么方法才可测知是否有错配的延长？Petruska等表明（用果蝇DNA多聚酶）酶对于延长的错配末端的区分主要基于 K_m 的不同；A-T配对末端的延长比G-T错配的延长快200倍，比C-T错配的延长快1400倍，比T-T错配的延长快2500倍。对于Taq DNA多聚酶来说，也可能是如此。因此，反应中dNTP的浓度可预知对PCR精度有相当大的影响（在高dNTP浓度，即 $>1mM$ ，错配将会更有效地延长）。总之，高温退火/延长（ $>55^\circ C$ ）和低dNTP浓度（每种 $10\sim 50\mu M$ ）在PCR的最终产物中将得到最高的精度。

2 基因组DNA的扩增

PCR 是一种在体外合成核酸的方法,利用它可以特异地复制DNA中特殊的一段。它包括两个寡聚核苷酸引物,它们分别位于需要扩增和反复循环的DNA的两侧,循环是以DNA变性、引物与互补链退火以及在DNA多聚酶的作用下退火的引物的延长而反复进行的。这些引物与靶序列的相反的链杂交并且使它们定向准确,以便在多聚酶作用时能在这两个引物之间的区域合成DNA。既然这些延长的产物本身就能与引物互补结合,因此在每一次循环中,连续的扩增循环使合成的靶序列的量比前一次增加了一倍。结果是特异的靶片段以指数形式积累起来,接近 2^n , n 是扩增操作的循环次数。

人 β -珠蛋白基因是最先用PCR技术扩增的DNA序列,并且来自于复杂的基因组样品的单拷贝序列的特异扩增继续成为这个技术最经常的应用之一。利用热稳定TaqDNA多聚酶的PCR高特异性及产量使得它成为分离特异性基因组片段的理想方法。原则上,人们可能会认为,扩增一个来自于高度复杂的DNA样品的单拷贝基因位点大体上比扩增一个来自质粒或噬菌体的片段要难得多。然而在实践中,基因组的扩增常常是非常简捷的,并不比那些简单系统的扩增更复杂。这种简捷应归功于引导步骤的高度特异性,以及用于PCR中的Taq多聚酶工作时温度的提高。

2.1 样品制备

PCR技术吸引人的一个特点就是对被扩增的DNA样品的质量和数量要求不高。一个单细胞或者放在水中加热制备的粗糙的裂