

BIOTECH

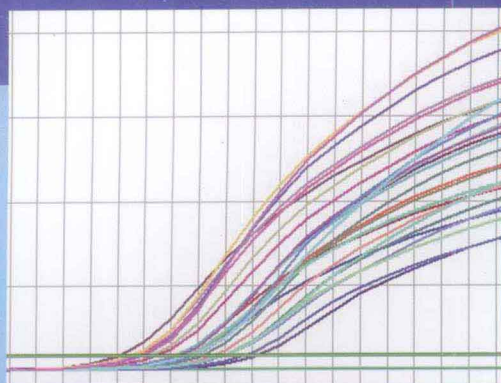
21世纪生物技术系列

PCR 理论与技术

PCR
Lilun Yu Jishu

第3版

NOLOGY



主编
王廷华
刘 佳
夏庆杰



科学出版社

21 世纪生物技术系列

PCR 理论与技术

第 3 版

主 编 王廷华 刘 佳 夏庆杰

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书是《21 世纪生物技术系列》的一个分册,分上、下篇,共 13 章。上篇主要介绍 PCR 基础理论和技术操作知识,以及技术操作中可能遇到的各种问题的解决方法。下篇介绍 PCR 相关技术的应用,包括 PCR 技术在构建 cDNA 文库、测序及基因突变检测,性别鉴定,动植物、微生物 DNA 分型研究中的应用;PCR 技术分析 DNA 序列多态性、VNTR 和 STR;PCR 技术检测 CDK4 敲入转基因鼠的基因型;PCR 体系中模板 DNA 浓度与 PCR 扩增效率的关系。

本书可供生物医学专业研究生、本科生及从事分子生物学研究的科研人员阅读和实验时参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

PCR 理论与技术 / 王廷华, 刘佳, 夏庆杰主编. —3 版. —北京: 科学出版社, 2013. 6

(21 世纪生物技术系列)

ISBN 978-7-03-037934-4

I. P… II. ①王… ②刘… ③夏… III. 聚合酶-链式反应 IV. Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 134252 号

责任编辑: 刘丽英 沈红芬 / 责任校对: 宣 慧

责任印制: 肖 兴 / 封面设计: 范璧合

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>

双青印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2013 年 6 月第 三 版 印张: 11 3/4

2013 年 6 月第四次印刷 字数: 286 000

定价: 48.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

《21 世纪生物技术系列》第 3 版编审委员会

主 审 李云庆

委 员 (按姓氏笔画排序)

王廷华

四川大学

特聘教授,博导

昆明医科大学,云南师范大学,成都医学院

教授,博导

白 洁

昆明理工大学医学院

教授,博导

刘 进

四川大学华西医院

教授,博导

李云庆

第四军医大学

教授,博导

李成云

云南农业大学

教授,博导

李兵仓

第三军医大学

教授,博导

李官成

中南大学湘雅医学院

教授,博导

李建国

上海交通大学医学院

教授,博导

张连峰

北京协和医学院

教授,博导

陈向东

华中科技大学同济医学院

教授,博导

陆 地

昆明医科大学

教授,博导

项 鹏

中山大学中山医学院

教授,博导

胡幀明

重庆医科大学

教授,博导

顾晓松

南通大学医学院

教授,博导

曾园山

中山大学中山医学院

教授,博导

游 潮

四川大学华西医院

教授,博导

Jean Philippe Merlio

法国波尔多第二大学

教授,博导

John W. McDonald

美国霍普金斯大学医学院

教授,博导

Leong Seng Kee

新加坡国立大学

教授,博导

Xin-Fu Zhou

澳大利亚南澳大学

教授,博导

Zhi-Cheng Xiao

澳大利亚莫纳什大学

教授,博导

《PCR 理论与技术》第 3 版编写人员

主 编 王廷华 刘 佳 夏庆杰

副主编 景 强 刁杨彦彬

编 委 (按姓氏笔画排序)

刁杨彦彬 王廷华 邓兴力 刘 佳

刘德华 关宇光 张 晓 张金国

聂胜洁 黄志翔 夏庆杰 景 强

《21 世纪生物技术系列》前言

21 世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶,生命科学将成为主宰。我国加入 WTO 后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国 21 世纪生物技术的发展和需求,科学出版社于 2005 年组织编写了一套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21 世纪生物技术丛书》,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》和《干细胞理论与技术》共 8 个分册。本丛书自 2005 年 3 月问世以来,即受到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006 年 1 月进行了重印;2009 年出版了第 2 版。本丛书对满足我国日益扩大的科研人员及研究生实践需求,以及推动我国 21 世纪生物技术的普及和发展起到了积极的作用。

生物技术发展迅速,为了满足广大科技工作者的需求,本丛书于 2013 年推出第 3 版。在第 2 版的基础上,第 3 版主要对实验技术中的经验体会部分进行了全面增补,同时补充了新的理论技术,包括免疫荧光染色、诱导型干细胞理论与培养、基于病毒载体的转基因及 RNA 干扰技术、免疫共沉淀与蛋白质相互作用、蛋白芯片等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。重要的是,为了应对和满足前沿技术的发展需要,推出第 3 版的同时还增补了 4 个分册,即《基因沉默理论与技术》、《电生理理论与技术》、《生物信息学理论与技术》和《神经疾病动物模型制备理论与技术》,并将丛书名更改为《21 世纪生物技术系列》。至此,本丛书已达 12 个分册,从行为、形态、细胞、分子生物学、电生理和生物信息等多个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用,是我国 21 世纪生物技术著作中覆盖面最广、影响最大的一套著作。本丛书从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调对基本概念和理论进行简明扼要的阐述,注重基本技术实践,认真总结了编者的实验经验和体会,并提供了大量原版彩图,使丛书在兼顾理论的同时更具实用价值。

本丛书由王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。

由于编写时间有限,加之科学技术发展迅速,书中的错误和不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

值本丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,他们的杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础;感谢国内外一批知名专家教授对丛书的指导和审阅;感谢编者们所付出的辛勤劳动;感谢中国解剖学会长期以来对本丛书组织工作的支持;感谢各位同道给予的鼓励和关心!

《21 世纪生物技术系列》编审委员会

2013 年 4 月 8 日

前 言

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR)、DNA 测序 (DNA sequencing) 技术以及基因克隆 (gene cloning) 技术是分子生物学技术领域的三大支柱技术,尤其是 PCR 技术,由于其具有敏感、特异、快速、简便及易自动化等突出优点,诞生后不久,就广泛应用于生命科学研究的各个领域,成为生物医学领域中的一项革命性创举和技术发展的里程碑。

自 20 世纪 50 年代以来,分子生物学 (molecular biology) 成为整个生命科学研究的前沿与生长点,其发展和进步为人类深入认识生命现象带来了前所未有的机遇,也为人类利用和改造生物创造了极为广阔的前景。分子生物学技术取得了显著的发展,同时对分子生物学理论的完善和发展起到了积极的推动作用。

分子生物学是从分子水平研究生物大分子的结构与功能,从而阐明生命现象本质规律的科学。所谓在分子水平上研究生命的本质主要是指对遗传、生殖、生长和发育等生命基本特征以及生理病理变化等分子机制的阐明,从而为利用和改造生物以及为疾病的诊疗奠定理论基础和提供新的手段。

分子生物学的基本法则是中心法则 (central dogma),是 1958 年由克里克 (Crick) 提出的遗传信息传递的规律。包含在脱氧核糖核酸 (deoxyribonucleic acid, DNA) 或核糖核酸 (ribonucleic acid, RNA) 分子中具有功能意义的核苷酸顺序称为遗传信息。遗传信息的转移包括核酸分子间的转移、核酸和蛋白质分子间的转移,即由 DNA 到 DNA 的复制、由 DNA 到 RNA 的转录和由 RNA 到蛋白质的翻译等过程。中心法则表明,遗传信息存在于 DNA 的碱基排列顺序中, DNA 是遗传信息的中心,遗传信息在不同的大分子之间的转移是单向的、不可逆的,即遗传信息一旦从 DNA 中发出,就只能通过转录 (transcription) 从 DNA 传递到 RNA,通过翻译 (translation) 从 RNA 传递到蛋白质,而不再回到 DNA 这个遗传信息的中心。

分子生物学技术是研究生物大分子结构与功能的技术,是用于研究分子生物学理论的技术手段,它与分子生物学理论相互促进、不可分割,主要技术包括生物大分子提取纯化技术、分子杂交技术、DNA 体外扩增检测技术、凝胶电泳技术、DNA 测序技术、基因克隆技术、基因沉默技术等。PCR 技术就是分子生物学技术之 DNA 体外扩增检测技术中的主流技术,利用 PCR 技术,人们能在数小时内将特定的 DNA 片段扩增数百万倍,不仅能够快速、大量地获得目的 DNA 片段,用于检测、克隆、测序目标基因,而且可以用来进行基因表达分析、基因突变分析、基因进化研究等。编写本书的目的在于系统介绍 PCR 技术的理论基础、技术原理、技术方法和流程及其应用范围,为广大生命科学工作者提供有益的参考。

编 者

2013 年 5 月

目 录

上篇 PCR 的基本理论与技术

第一章 常规 PCR 技术的原理与方法	(1)
第一节 PCR 技术的发展简史	(1)
第二节 PCR 技术的基本原理	(2)
第三节 PCR 反应体系与反应条件	(5)
第四节 PCR 反应体系和反应条件的优化	(12)
第五节 PCR 反应的保真性	(19)
第六节 PCR 常见问题及对策	(20)
第二章 PCR 模板制备	(23)
第一节 基因组 DNA 提取技术	(23)
第二节 RNA 提取技术与 cDNA 模板的制备	(27)
第三章 PCR 扩增产物处理与 PCR 实验室	(32)
第一节 PCR 扩增产物分析与处理	(32)
第二节 PCR 产物的纯化	(38)
第三节 PCR 污染与对策	(38)
第四节 PCR 技术实验室	(40)
第四章 定量 PCR 技术	(42)
第一节 定量 PCR 的基本概念与基本原理	(42)
第二节 实时荧光定量 PCR	(46)
第五章 原位 PCR 相关技术	(59)
第一节 原位 PCR	(59)
第二节 原位 PCR 的分类	(66)
第三节 原位 PCR 技术流程	(68)
第六章 其他 PCR 相关技术进展	(94)
第一节 反向 PCR 技术	(94)
第二节 巢式 PCR	(95)
第三节 多重 PCR	(97)
第四节 串联重复序列的 PCR 扩增	(99)

第五节 RAPD 技术	(101)
-------------	-------

下篇 PCR 相关技术的应用

第七章 PCR 技术在构建 cDNA 文库、测序及基因突变检测中的应用	(105)
第一节 PCR 在 cDNA 文库构建中的应用	(105)
第二节 PCR 在 DNA 测序中的应用	(112)
第三节 PCR 技术在基因突变检测中的应用	(114)
第八章 PCR 技术分析 DNA 序列多态性	(117)
第一节 DNA 的两种多态性和遗传标记分类	(117)
第二节 PCR 技术分析 DNA 序列多态性	(118)
第九章 PCR 技术分析 VNTR 和 STR	(125)
第一节 概述	(125)
第二节 扩增片段长度多态性分析分型技术基本原理	(126)
第三节 用 PCR 技术分析小卫星 VNTR 基因座分型的基本技术	(126)
第四节 用 PCR 技术分析微卫星 (STR) 基因座	(138)
第十章 PCR 技术在性别鉴定中的应用	(150)
第一节 概述	(150)
第二节 PCR 扩增的基本方法	(150)
第三节 讨论	(152)
第十一章 PCR 技术在动植物、微生物 DNA 分型研究中的应用	(153)
第一节 概述	(153)
第二节 实验方法与步骤	(156)
第三节 结果与讨论	(160)
第十二章 PCR 技术检测 CDK4 敲入转基因鼠的基因型	(162)
第一节 实验原理	(162)
第二节 实验方法	(162)
第三节 实验结果	(164)
第四节 结果分析及注意事项	(169)
第十三章 PCR 体系中模板 DNA 浓度与 PCR 扩增效率的关系	(171)
第一节 实验目的	(171)
第二节 实验方法	(171)
第三节 实验结果	(173)
第四节 结果分析	(176)

酸引物扩增位于两个已知序列之间的 DNA 片段。首先合成了两条引物,其序列分别与待扩增的模板基因的序列互补,可以分别结合在模板 DNA 对应的两条单链的目的基因的两端,并随着引物从 5'→3' 延伸合成新的 DNA。在过量的两种引物和四种脱氧核糖核苷三磷酸 dTTP、dATP、dCTP、dGTP 存在的情况下,模板 DNA 通过加热而变性,然后冷却到一定温度,与两个引物退火。加入 DNA 聚合酶 Klenow, DNA 聚合酶使退火后结合在模板上的引物开始延伸合成新的 DNA。随后,反复重复变性、退火、DNA 延伸等合成步骤。由于每一次扩增后的产物又可充当下一循环的模板,所以每一次循环基本上都能使靶 DNA 产物的量扩增一倍。Mullis 博士因此获得 1993 年诺贝尔化学奖。同年, Saiki 用这种方法检测时常发生于非洲黑种人中的镰刀红细胞贫血的致病基因的突变获得了成功, PCR 也因此进入医学实用阶段。由于 PCR 操作相对简单,应用前景广阔,因此短短几年已经广泛应用到生物医学的各个领域,发表相关论文和专著数以千计。

二、PCR 技术的改进与完善

Mullis 最初使用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段,该酶有很多缺点:①不耐高温,90℃ 就完全变性失活,每个循环低温时都要重新加酶。②该酶的最适温度为 37℃,因此引物链延伸反应在 37℃ 下进行,容易发生模板和引物之间以及引物与引物间的碱基错配,特异性较差,合成的 DNA 片段是复杂的 PCR 产物混合物。这些缺点给 PCR 技术操作增添了不少困难,致使 PCR 技术在初始阶段难以获得足够重视。

1988 年初, Keohanog 改用 T4 DNA 聚合酶代替 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段进行 PCR, 结果有了显著改善:扩增的 DNA 片段较一致,只检测到所预期的一种分子质量的 DNA 片段。但 T4 DNA 聚合酶也不耐热,高温时失活,因此每循环一次,仍需新添加酶,操作过程很是繁琐。如果有一种能耐受高温而不失活的 DNA 聚合酶代替上述不耐热的酶进行 PCR,将节省大量的人力。因此不少科学家致力于寻找这样的耐热酶。1988 年, Saiki 等从温泉中分离到的一株水生嗜热杆菌(*thermus aquaticus*) 中提取到一种耐热的 DNA 聚合酶,命名为 *Taq* DNA 多聚酶(*Taq* DNA polymerase)。 *Taq* DNA 多聚酶具有以下显著的优点:①耐高温,在 70℃ 反应 2h 后其残留活性仍在初始活性的 90% 以上;在 93℃ 下反应 2h 后其残留活性约为初始的 60%,在 95℃ 下反应 2h 后其残留活性约为初始的 40%。②短时间的热变性不会显著降低其活性,因此不必在每次高温变性后添加新酶,可以大量节省劳动量和试剂成本。③反应温度的提高大大提高了扩增的特异性效率,也增加了有效扩增长度(最长可达 2.0 kb)。由于提高了扩增的特异性和效率,因而其灵敏度也大为提高。此酶的发现和商品化,催生了全自动热循环仪(PCR 仪)的发明,PCR 反应得以自动化完成,使 PCR 技术趋于成熟,从而极大地推动了 PCR 技术的推广应用。

第二节 PCR 技术的基本原理

一、PCR 技术的基本原理与过程

PCR 就是体外模仿体内进行的快速 DNA 复制的过程,其特点是每次 PCR 反应合成的

产物都能和其模板一起作为下一次 DNA 合成的模板,使靶 DNA 片段呈指数形式增加。

(一) PCR 技术的基本原理

PCR 中 DNA 的合成过程与细胞内 DNA 的天然复制过程类似,但前者更加快速和特异。PCR 扩增的特异性是由与靶序列两端区域互补的寡核苷酸引物决定的,即 PCR 中 DNA 的合成过程均以两个引物特异结合处为起点;一旦合成产生了以两个引物为端点的特异的 DNA 分子,则这种分子在以后的热循环中理论上将以 2 的指数(循环数)次方扩增,从而最终积累下的 PCR 产物绝大多数是以两个引物为端点的特异的 DNA 片段。PCR 就是体外模仿体内的 DNA 快速复制过程,只不过 DNA 的变性、引物退火以及新 DNA 链的合成均采用温度的升降来控制,同时,通过反复的加热、冷却使反应体系的温度反复进行高温—低温—中温的热循环,使 DNA 的复制过程不断重复进行;而且由于每次新合成的 DNA 片段都和其模板链一样可以作为下一次热循环过程中 DNA 复制的模板,因此可以实现对特定核苷酸片段的指数级扩增(图 1-2)。

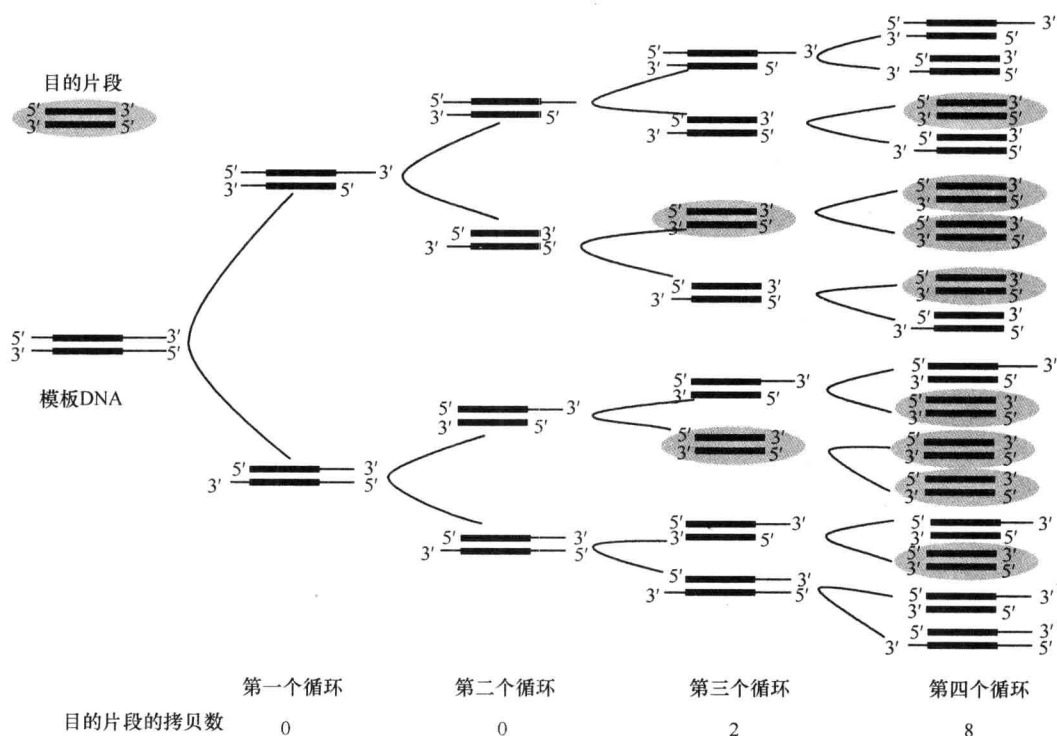


图 1-2 PCR 原理示意图
此为 PCR 反应的前四个循环示意图

(二) PCR 过程

PCR 进程由变性—退火—延伸三个基本反应步骤反复重复进行构成:①高温时模板 DNA 的热变性(denaturation),PCR 反应液中的模板 DNA 加热至 93~96℃ 一定时间(10~30s)后,模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 PCR 产物发生双螺旋的氢键断裂而变性

解链变成单链 DNA,成为合成 DNA 的活性模板。②低温时模板 DNA 与引物的退火(annealing),在反应体系温度降至特定的温度,即引物的半解链温度(T_m 值)左右或以下(一般为 50~55℃)时,经加热变性成单链的模板 DNA 与引物以碱基互补配对的方式特异性结合,形成引物-模板复合物。由于引物浓度远大于模板浓度,该过程是由引物驱动的。③中温时引物的延伸(elongation),在将反应体系升温到 60~75℃ 时单链 DNA 模板-引物结合物可被 DNA 聚合酶识别,并在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下,以四种脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)为反应原料,单链 DNA 为模板,按碱基互补配对方式,从 5'向 3'方向合成一条新的与模板 DNA 链互补的 DNA 链,使单链 DNA 模板重新成为双链,从而完成 DNA 的靶序列的半保留复制。每完成这样一个循环需 2~4min。PCR 的变性—退火—延伸三个反应步骤反复进行,使特异 DNA 片段拷贝数呈指数上升。这样经过 2~3h 可完成 30~40 个热循环,PCR 产物量最高可达起始模板量的 2^{30} 倍以上(见图 1-2)。

二、PCR 反应的动力学与 PCR 终产物

(一) PCR 反应的动力学

理论上,最终的 PCR 产物量可用 $P=N(1+E)^n$ 计算。 P 代表 PCR 产物的拷贝数, E 代表平均每个热循环的 PCR 扩增效率, N 代表起始模板拷贝数, n 代表热循环次数。平均扩增效率的理论值为 100%,但在实际反应中平均效率达不到理论值。反应初期,因为 DNA 聚合酶的活力足、dNTP 底物充足,模板浓度低而自身复性少,PCR 扩增效率非常接近 100%,产物的增加几乎呈指数形式;随着 PCR 热循环数的增加,DNA 聚合酶的活力开始降低,dNTP 底物浓度也开始减少,同时由于 PCR 产物的逐渐积累,模板浓度升高,自身复性增加,PCR 扩增效率会逐渐降低,最终会非常接近 0,PCR 产物的增加会逐渐放缓,进入线性增长期,并最终停止扩增而进入平台期。绝大多数情况下,经过 35 个循环,PCR 扩增都将进入到平台期。

(二) 平台效应

在 PCR 反应的后期扩增产物的增加因趋于停止而变成平坦的曲线,同时出现大量的非特异性扩增,这种现象称为平台效应。平台效应可能与下列因素有关:

- (1) 随着反应的进行,dNTP 和引物的浓度不断地降低。
 - (2) 随着产物的增加,酶对模板的比率降低。
 - (3) 由于变性温度较高,多次循环后酶的活力和 dNTP 的稳定性逐渐降低。
 - (4) 反应体系中产生的非特异性产物或引物二聚体与反应底物竞争聚合酶。
 - (5) 反应产物在高浓度时变性不完全,影响引物的延伸。
 - (6) 当产物浓度高于 10^{-8} mol/L 时,可能降低 *Taq* 聚合酶的延伸加工能力或引起产物链的分支迁移和引物转换。
 - (7) 酶与 PCR 的产物结合,使酶分子减少。
- 因此我们应当控制 PCR 的循环次数在合理的范围,使反应在指数扩增期内完成。

(三) PCR 终产物

以靶序列为模板通过 PCR 扩增获得的特异性 PCR 产物可分为复杂产物和长度特异产物两部分。双链特异产物的长度严格地限定在两个引物链的 5'端之间,是特异的目标片段。复杂产物片段是指以包含有目标序列的初始 DNA 片段为模板所合成的 PCR 产物,其 5'端为引物序列,而其 3'端则远超出另一引物的结合区,以及以这样的 DNA 链为模板,另一引物结合并延伸形成的一端为双链特异产物部分,另一端为单链的复杂 PCR 产物。以一个原始模板为例来说明:在第一个次热循环时,高温热变性时,两条引物 3'端相向地分别结合到目标序列上,并以两条互补的 DNA 单链为模板,从引物 3'端沿模板链的 3'→5'的方向开始链延伸合成 DNA,新合成的两条 DNA 链 5'端分别是两引物的 5'端,是固定不变的,而 3'端则没有固定的止点,长短不一,这就是“复杂产物片段”。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“复杂产物片段”)结合,由于新链模板的 5'端序列是固定的,因此以其为模板合成的 DNA 的 5'端是该引物的 5'端,而且 3'端也就有了固定的止点,为另一引物 5'端对应的互补碱基,从而确保 PCR 产物新片段的起点和止点都限定于两引物之间,形成长短一致的“长度特异产物”(见图 1-2)。由于长度特异产物作为模板只产生长度和其一致的扩增产物,因此“长度特异产物”是按指数倍数增加,是 PCR 产物的主要成分;而“复杂产物片段”总量仅以算术倍数增加,且长度高度不一致,导致每个特定分子质量的复杂产物片段的拷贝数很少,因此这类产物在 PCR 总产物中几乎可以忽略不计,这也使得 PCR 的反应产物不需要再纯化,就能保证 PCR 产物足够的纯度用于随后的分析与检测。

第三节 PCR 反应体系与反应条件

一、PCR 反应体系

参加 PCR 反应的物质主要有以下几种:一对待扩增基因特异的寡核苷酸引物、耐热 DNA 聚合酶、4 种三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTP)底物、二价金属阳离子 Mg^{2+} 、待扩增的模板 DNA 以及 PCR 促进剂等。另外,PCR 反应还需要在特定的缓冲系统中才能顺利进行。

(一) 引物

引物(primer)是指人工合成的用于特异性结合待扩增靶 DNA 序列,引发新 DNA 合成的短的单链 DNA 片段,通常是分别取自靶 DNA 序列两条链的 3'端相向的长度在 16~25nt 的单链 DNA 片段。PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 特异性识别与结合的程度,因此引物是 PCR 反应特异性的关键。理论上,只要依据任何一段已知的 DNA 序列,都能按照碱基互补配对的原则设计出其引物,再利用 PCR 对其进行大量扩增。但实际上,DNA 上的有些区域是不能用来设计特异性引物的。

按照以下原则设计出的引物一般都能工作,获得满意的 PCR 扩增结果:①引物长度为 15~30nt,常用为 20nt 左右。②两引物之间的碱基对长度,普通 PCR 的有效扩增长度一般

小于 1000bp,以 200~500bp 为宜,但如果采用高保真的 DNA 聚合酶和长 PCR 反应缓冲体系,则可扩增出长至 10kb 的片段。③引物碱基,G+C 含量以 40%~60% 为宜,G+C 含量过低则复性温度降低,常导致扩增效率下降,扩增效果不佳;G+C 含量过高则容易引发引物的非特异性结合,导致非特异扩增。ATGC 四种核苷酸残基最好分布较均匀,尽量避开 5 个以上的相同核苷酸成串排列的区域。④避免同一引物内部出现过长的二级结构和两条引物间形成较长的互补配对情况,特别是引物间 3'端的反向互补,会增加引物二聚体形成的概率,降低引物引发目标 DNA 区段特异性扩增的效率。⑤引物 3'端的碱基,特别是最末及倒数第二个碱基,应与靶序列完全配对,末端碱基错配常会导致 PCR 扩增的失败。⑥引物 3'端的碱基最好是 T 或 G 而不是 C 或 A,因为 *Taq* DNA 聚合酶由 T 或 G 引发新链合成的效率要比由 C 或 A 引发的高。⑦引物中包含或加上合适的酶切位点,而使被扩增的靶序列带上适宜的酶切位点,对后续的酶切分析或克隆到载体中很有好处。⑧引物的特异性,引物应与同一基因组中其他核酸序列无明显同源性,即只与目标 DNA 区段有较高的同源性。

引物量在 PCR 反应体系中有重要意义,引物的浓度一般要求在 0.1~0.5 $\mu\text{mol/L}$,这一引物浓度足以使 1kb 的 DNA 片段在 PCR 反应体系中循环扩增 30 次。引物浓度过低,则产物量低;引物浓度过高则会促进引物二聚体和非特异性产物的形成。非特异性产物和引物二聚体都可以作为 PCR 反应的底物,与靶序列竞争 DNA 聚合酶和 dNTP 底物,从而抑制靶序列的扩增。

引物浓度的计算可按下面的方法进行:

$$EM = a(16000) + b(12000) + c(7000) + d(9600)$$

式中, EM 为摩尔吸光系数,是 1cm 光程比色杯中测定 1mol/L 寡核苷酸溶液在 UV260nm 下的光密度(A)值; a 、 b 、 c 和 d 分别代表寡核苷酸引物中的 A、G、C 和 T 的个数。

例如:一纯化的 24bp 寡核苷酸溶于 0.1ml 水中,取 10 μl 稀释至 1ml,测其 $A = 0.76$,原液 A 为 $0.76 \times 100 = 76$,若此寡核苷酸的碱基组成为 $A = G = C = T = 6$,其 $EM = 6 \times 16\,000 + 6 \times 12\,000 + 6 \times 7000 + 6 \times 9600 = 267\,600$,故原液中的寡核苷酸浓度为 $76 \div 267\,600 = 2.8 \times 10^{-4} \text{ mol/L} = 280 \mu\text{mol/L}$ 。

(二) 耐热 DNA 聚合酶

目前主要有两类耐热 DNA 聚合酶,一种是从栖热水生杆菌中提纯的天然酶,另一类为大肠菌合成的基因工程酶。催化一典型的 PCR 反应约需酶量 2.5U(指总反应体积为 100 μl 时),酶量过高可引起非特异性扩增,酶量过低则合成产物量减少。

最初的 PCR 使用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段,其延伸温度为 37 $^{\circ}\text{C}$,然而由于 Klenow 片段在 95 $^{\circ}\text{C}$ 的 DNA 变性温度下完全失活,因此在每轮循环步骤之后都需要再添新酶,操作十分繁琐,并导致反应体系中形成快速沉积变性的酶蛋白。此外,由于 Klenow 片段聚合反应温度偏低,引物与模板的非特异性结合增加,导致非特异性产物增多;同时,由于受到某些 DNA 二级结构的影响,聚合反应不完全,得不到完整的 PCR 扩增产物。直到 1987 年,发现了热稳定的 *Taq* DNA 聚合酶(*Taq pol*)等耐热的 DNA 聚合酶后,才使 PCR 技术有了重大的发展并逐步实现了自动化。

耐热 DNA 聚合酶能耐受 95 $^{\circ}\text{C}$ 以上的高温而不失活,因而无需在每轮循环中添加新酶;

同时它催化的聚合反应的最适温度为 70~80℃,此时引物与模板结合的特异性好,故产物的纯度高。现在已发现多种耐热 DNA 聚合酶,其共同特点是在高温下仍保持一定的酶活性,但各耐热 DNA 聚合酶的性能尚有一定的差别。目前在 PCR 反应中应用最多的是 *Taq pol*。天然的 *Taq pol* 是从嗜热水生菌 *thermus aquatics* YT-1 菌株中分离获得的。该菌株为 1969 年从美国黄石国家公园的温泉中分离获得,能在 70~75℃ 生长。现已克隆出该酶的基因,全长 2499 个碱基,编码分子质量为 94kDa、长度为 832 个氨基酸的蛋白质。现将 *Taq pol* 的特点叙述如下:

1. 高热稳定性 *Taq pol* 在 92.5℃、95℃、97.5℃ 的半衰期分别为 130min、40min 和 5~6min。在 PCR 反应中 DNA 变性时间通常为 30~60s,若总共进行 30 轮循环累计热变性时间为 15~30min,此时该酶仍然保持相当高的活性,完全可以满足 PCR 反应的需要。

2. 高催化活性 在已发现的耐热 DNA 聚合酶中,*Taq pol* 的活性最高,达 200 000U/mg。实验证明 *Taq pol* 的活性有明显的温度依赖性,*Taq pol* 催化 DNA 合成的最适温度为 75~80℃,此时延伸速率达 150~300 个核苷酸/(秒·酶分子);70℃ 时为 60 个核苷酸/(秒·酶分子);55℃ 时为 22 个核苷酸/(秒·酶分子);37℃ 和 22℃ 时分别为 1.5 个和 0.25 个核苷酸/(秒·酶分子)。当温度超过 80℃ 时,几乎不能催化 DNA 的合成,可能与高温下引物和模板结合的稳定性遭到破坏有关。

3. 反应的保真性 序列分析表明 *Taq pol* 与 *E. coli pol I* N 端区域(此区域与该酶具有 5'→3'外切酶活性有关)高度同源,因此 *Taq pol* 亦有 5'→3'端的外切酶活性。然而由于 *Taq pol* 没有 *E. coli pol I* 的 3'→5'外切酶活性区的同源序列,故 *Taq pol* 无 3'→5'外切酶活性。因此,*Taq pol* 不具有 Klenow 酶的校对功能,在其催化的 PCR 扩增过程中引起碱基错配的概率大大增加。通常,*Taq pol* 在 PCR 反应出现碱基错配的概率为 1/300~1/18 000,在经过 25 轮扩增后,扩增产物的序列中平均每 400 个碱基就有一个与原始序列不同。

4. 逆转录活性 Mg^{2+} 在 2~3mmol/L 的浓度下,68℃ 时该酶出现类似逆转录酶的活性。若有 Mn^{2+} 存在时,其逆转录活性更佳。有报道,若反应体系中没有 Mn^{2+} ,则不能进行 150~250 个核苷酸以上核酸的逆转录反应。利用这一特性,可以直接用于 RT-PCR,尤其是短片段的扩增。

5. 非模板依赖的聚合活性 *Taq pol* 具有类似脱氧核糖核酸末端转移酶(TdT)的活性,可在新合成的双链产物的 3'端加上一个非模板依赖的碱基。在四种 dNTP 中,该酶对 dATP 的聚合能力最高。所以,在标准 PCR 反应条件下,PCR 产物的 3'端的非模板依赖的碱基几乎总是 A。利用这一特性,我们可以构建 dT-载体来克隆带 dA 尾的产物。用 Klenow 酶可以将 3'端的非模板依赖的聚合碱基去掉,即在 PCR 反应后,先加热至 99℃ 10min 灭活 *Taq pol*,然后调整 Mg^{2+} 浓度至 5~10mmol/L,加入 1~2U 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段,室温下作用 15~20min,即可使 PCR 产物变为平端。

除了 *Taq pol* 外,人们还陆续发现和获得了其他几种耐热 DNA 聚合酶,主要有从嗜热栖热菌(*T. thermophilus*)中分离的 *Th* DNA 聚合酶、从 *litoralis* 栖热球菌(*T. litoralis*)中分离的 *Vent* DNA 聚合酶、从嗜热硫化裂片菌中分离出的 *Sac* DNA 聚合酶以及修饰 *Taq* DNA 聚合酶等。现将其特点分述如下:

1. 修饰 *Taq* DNA 聚合酶 常见的有重组 *Taq pol*(r*Taq pol*)和 Stoffel 片段。重组 *Taq*

pol 为 Letus 公司利用基因工程在大肠杆菌中表达的 *Taq* pol, 其热稳定性比天然 *Taq* pol 要好, 97.5℃ 时的半衰期达 10min, 此外 *Taq* pol 的热稳定性还与 KCl 的浓度有关, KCl 的浓度分别为 50mmol/L、25mmol/L 和 10mmol/L 时, 97.5℃ 保温 10min 后, *Taq* pol 的活性分别下降 50%、70% 和 80%。Stoffel 等人首先通过除去 *Taq* pol N 端的 289 个核苷酸得到一种无 5'→3' 外切酶活性的 61 000Da 的酶蛋白, 故将其称为 Stoffel 片段。Stoffel 片段的热稳定性极佳, 97.5℃ 的半衰期达到了 20min, 比 *Taq* pol 延长了两倍多, 利用此酶可以提高 PCR 反应中的变性温度, 这对于扩增 GC 丰富的模板及具有二级结构的模板极为有利。同时由于 Stoffel 片段的 Mg^{2+} 浓度作用范围增大为 2~10mmol/L, 故运用 Stoffel 片段可以改善复合 PCR 的反应结果。

2. *Th* DNA 聚合酶 该酶从嗜热栖热菌中分离得到, 在高温和 $MnCl_2$ 存在的条件下, 能有效逆转录 RNA。当螯合了 Mn^{2+} 后再加入 Mg^{2+} , 则可以使该酶的聚合活性增加, 因此 cDNA 的合成与扩增可以用同一种酶催化。

3. *Vent* DNA 聚合酶 New England Biolabs 公司从海底火山口 98℃ 水中生长的 *litoralis* 栖热球菌中分离提纯得到 *Vent* DNA 聚合酶, 并在大肠杆菌中成功的表达了该酶。此酶的热稳定性极好, 97.5℃ 下的半衰期长达 130min。此外 *Vent* DNA 聚合酶还具有 3'→5' 外切酶的活性, 因此在催化 DNA 合成时具有校正功能, 从而能有效降低碱基错误掺入率, 提高扩增的保真性。其碱基错误掺入率为 1/31 000, 扩增产物的保真性比 *Taq* pol 提高 5~10 倍。

4. *Sac* DNA 聚合酶 该酶是从酶热硫化裂片菌中分离纯化得到的, 其 Mg^{2+} 的浓度作用范围较大, 为 2~8mmol/L, 故有利于复合 PCR 反应的进行。此外, *Sac* DNA 聚合酶也可用于 DNA 测序, 但测序中 ddNTP/dNTP 的比率要高。此外, 该酶还可以用于基因的定点融合等。

5. *Pfu* DNA 聚合酶 *Pfu* DNA 聚合酶是从 *Pyrococcus furiosus* 菌体中提纯的, 该酶具有 5'→3' 聚合酶活性及 3'→5' 外切酶活性, 故此酶具有校正功能, 其催化 DNA 合成的保真性要比 *Taq* pol 高 12 倍。此外, *Pfu* DNA 聚合酶的耐热性极好, 97.5℃ 的半衰期大于 3h。由于在无 dNTP 存在时 *Pfu* DNA 聚合酶会降解模板 DNA, 故在反应时此酶一定要最后加到反应体系中。然而, 由于该酶采用低盐缓冲溶液 [20mmol/L Tris-HCl, pH 8.2, 10 mmol/L KCl, 6mmol/L $(NH_4)_2SO_4$, 1.5mmol/L $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 10ng/μl BSA], 故退火温度较低, 在 37~45℃。

我国的 PCR 技术发展和应用十分迅速, 现在复旦大学、中国医科院、华美公司均能生产耐热 DNA 聚合酶, 耐热 DNA 聚合酶的国产化对推动我国 PCR 技术的发展、普及起着积极的推动作用。

(三) 反应底物 dNTP

它们分别是 dATP (腺嘌呤脱氧核糖核苷三磷酸)、dGTP (鸟嘌呤脱氧核糖核苷三磷酸)、dCTP (胞嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸) 和 dTTP (胸腺嘧啶脱氧核糖核苷三磷酸), PCR 扩增效率和 dNTP 的质量与浓度有密切关系, dNTP 干粉呈颗粒状, 如保存不当易变性失去生物学活性。dNTP 溶液呈酸性, 使用时应配成高浓度, 以 1mol/L NaOH 或 1mol/L Tris-HCl 的缓冲液将其 pH 调节到 7.0~7.5, 小量分装, -20℃ 冰冻保存。多次冻融会使 dNTP 降解。在 PCR 反应中, dNTP 应为 50~200μmol/L, 尤其是注意 4 种 dNTP 的浓度要相等 (等摩尔配