

# 体外基因扩增(PCR)技术在医学上的应用

主 编/林学颜

副主编/张 玲

北京医科大学  
中国协和医科大学 联合出版社

# 体外基因扩增(PCR)技术 在医学上的应用

主 编 林学颜

副主编 张 玲

北京医科大学  
中国协和医科大学 联合出版社

1993  
[京] 新登字 147 号

2148/25 10

体外基因扩增 (PCR) 技术在医学上的应用

主编: 林学颜 副主编: 张玲

责任编辑: 陈永生

\*

北京医科大学 联合出版社出版  
中国协和医科大学

四方计算机照排中心排版

唐山市胶印厂印刷

新华书店北京发行所发行

\*

787×1092 毫米 1/32 8 印张 179 千字

1993 年 12 月第一版 1993 年 12 月北京第一次印刷

印数: 1—2000

ISBN 7-81034-258-4/R • 258

定价: 2.50 元

# 体外基因扩增(PCR)技术 在医学上的应用

主 编 林学颜

副主编 张 玲

编 者 (按姓氏笔画为序)

白 薇 龙 敏 刘国平

李崇涣 张 玲 汪东海

周明月 林学颜 倪东辉

袁 雪 钱益美 彭汉琴

## 编 者 的 话

在分子生物学短暂的历史中，由于新技术的相继出现（例如免疫印染、分子克隆、脉冲区带凝胶电泳等），使我们对探索基础生物学和应用生物学的思路有了新的突破。近年来发展起来的多聚酶链反应技术是继单克隆抗体之后，在医学分子生物学领域中又一重大贡献。

多聚酶链反应(PCR)技术又称体外基因扩增技术或无细胞分子克隆体系(Cell-Free Molecular Cloning)。该技术于本世纪 80 年代中期，由美国 Cetus 公司人类遗传系的 Kary Mullis 首先发明，并由该系 Randal Saiki 等人于 1985 年最早用于  $\beta$  珠蛋白 DNA 的扩增，作为胎儿镰刀状细胞贫血的诊断并发表了第一篇论文后，至今仅短短的数年时间，已有数千篇论文报道，这里值得一提的是，PCR 技术已荣获 1989 年自然科学奖“年分子”的桂冠(The Molecule of the year)。

多聚酶链反应的特点是将所要研究的一小片目的基因或某一 DNA 片段，在试管中进行反应，合成特异性基因或 DNA 片段，在数小时内即可扩增成百万倍乃至千百万倍，适用于临床诊断，基因遗传，病原微生物，肿瘤基因以及法医案例研究等等。由于本技术简便，敏感，因此是医学分子生物学技术中一项具有革命性的创举。

为了传播先进技术，推动我国医学科学的进展，我们综合了国内外有关的最新资料编写成本书，较全面地介绍了体外基因扩增技术的原理、方法及其在医学上的应用。希望本书对于正在从事此类工作的科技人员有所裨益。

本书的编写，虽然精心尽责，但错误之处在所难免，请

读者指正！

谨向广东省商业企业集团科技开发公司（广东省生物技术研究所以）、浙江省永嘉县通力实验检测仪器厂，对本书出版的支持以及石磊、彭习亮协助抄写，林必澄、孙乐经帮助联系出版事项，对此，我们表示衷心的感谢！

林学颜

于中山医科大学

1992.4.5

# 目 录

## 第一篇 基本方法学

|     |                             |     |          |
|-----|-----------------------------|-----|----------|
| 第一章 | PCR 技术的设计 .....             | 周明月 | 林学颜 (7)  |
| 第二章 | Taq DNA 多聚酶 .....           | 彭汉琴 | 林学颜 (15) |
| 第三章 | PCR 的自动化装置 .....            | 刘国平 | 张玲 (22)  |
| 第四章 | 快速、简便地制备 PCR 样品的方法<br>..... | 刘国平 | 张玲 (30)  |

## 第二篇 PCR 在研究中的应用

|      |                                   |     |           |
|------|-----------------------------------|-----|-----------|
| 第五章  | 体外扩增 DNA 的直接序列分析<br>.....         | 袁雪  | 林学颜 (44)  |
| 第六章  | 应用 PCR 技术扩增 DNA 序列<br>.....       | 汪东海 | 林学颜 (60)  |
| 第七章  | 应用 GC 夹和变性梯度凝胶电泳法对<br>突变的检测 ..... | 龙敏  | 张玲 (68)   |
| 第八章  | 基因表达的检测 .....                     | 倪东辉 | 李崇溪 (85)  |
| 第九章  | cDNA 库中特异序列的 PCR 扩增<br>.....      | 周明月 | 林学颜 (96)  |
| 第十章  | 反向多聚酶链反应 .....                    | 钱益美 | 张玲 (100)  |
| 第十一章 | PCR 在进化分析中的应用<br>.....            | 倪东辉 | 林学颜 (108) |

- 第十二章 个体配子中 DNA 序列的 PCR 分析  
(基因图谱法) ..... 钱益美 林学颜 (119)
- 第十三章 Alu PCR 技术 ..... 白微 林学颜 (135)

### 第三篇 PCR 技术在医学诊断中的应用

- 第十四章 PCR 技术在人类传染病诊断中的  
应用 ..... 汪东海 张玲 (145)
- 第十五章 PCR 技术检测 ras 致癌基因  
..... 汪东海 林学颜 (159)
- 第十六章 应用 PCR 技术诊断新突变疾病  
..... 袁雪 林学颜 (170)
- 第十七章 PCR 在单基因疾病诊断中的应用  
..... 龙敏 张玲 (188)
- 第十八章 DNA 分型与疾病易感性的关系  
..... 张玲 林学颜 (205)
- 第十九章 PCR 技术在法医学证据分析中的  
应用 ..... 张玲 李崇澳 (215)
- 第二十章 PCR 检测人类 T 细胞淋巴瘤和白  
血病病毒 ..... 张玲 林学颜 (230)
- 第二十一章 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 的检测  
..... 张玲 林学颜 (239)

# 第一篇 基本方法学

在分子生物学短暂的历史中,新技术的出现(Southern blotting,分子克隆,脉冲凝胶电泳等)不断地改变着我们探索基础和应用生物学课题的思维方式。多聚酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)能使 DNA 分子中特定的片段得以扩增,从而开阔了我们的思路。PCR 技术是一种体外方法,它利用靶 DNA 上特定区域的片段杂交的寡核苷酸引物进行酶促反应合成特定的 DNA 序列。通过反复多次循环后(包括模板变性,引物退火及在 DNA 多聚酶作用下的引物延伸),被引物 5'端所限定的某一特定 DNA 片段的拷贝数则呈指数上升;由于一次循环的产物可以作为下次循环的模板,这样通过 20 次循环的扩增倍数约为一百万倍( $2^{20}$ )。这种方法最早由 Kary. Mullis 所发明,并被所属的人类遗传学系用于扩增人类  $\beta$  珠蛋白基因,进行了镰刀状红细胞贫血的产前诊断。

早期的 PCR 采用 *E. coli* DNA 多聚酶 I 的 Klenow 片段来进行引物延伸。由于 PCR 在每次循环的起始需使用较高的温度使模板 DNA 双链解开,但由于此酶不耐高温,因此,在每一次循环中均需加入新鲜的酶。自从引入 *Thermus aquaticus* (见第二章)中分离出来的耐热 DNA 多聚酶(Taq 多聚酶)后,PCR 的操作已被大大简化了。现已可用热循环仪自动完成(见第三章)。反应体系中的各种成份(模板、引物、Taq 多聚酶、三磷酸脱氧核糖核苷酸和缓冲液)均可组配在一起,仅通过周期性地改变反应管内的温度,即可以完成扩增

反应，改变反应的参数（如酶、引物、 $Mg^{2+}$  浓度和温度曲线）对扩增反应的特异性和产量的影响将在第一章中讨论。虽然对于任何一对寡核苷酸引物均能建立一套最佳条件，但并非单一的反应条件就能适合所有的 PCR 反应。

分析 PCR 特异性的典型方式是采用凝胶电泳方法，评价特异性产物的另一个影响 PCR 产物的均一性因素是基因组中模板序列的“浓度”。这种效应可以通过正常基因组 DNA（含两个  $\beta$  珠蛋白基因拷贝细胞）和  $\beta$  珠蛋白基因缺失的纯合子基因组相比较，用  $\beta$  珠蛋白基因引物扩增后的结果来证实，采用正常基因组模板时，反应产生单一的  $\beta$  珠蛋白基因片段，未检测到非特异性产物；而采用  $\beta$  珠蛋白基因缺失的 DNA 模板，则不能合成  $\beta$  珠蛋白基因片段，却产生一些非特异性产物，因而在缺乏“正确”的模板时， $\beta$  珠蛋白基因的引物合成了错误的序列。这种效应可以解释某些沿着稀有模板合成的 PCR 产物在凝胶电泳图谱中不均一的原因，如 HIV 序列仅占细胞样本很小的一部分。正如第一章所述，调整 PCR 各种参数，改善扩增的特异性后，即使在稀有的模板中也可以产生均一的产物。

最初的 PCR 方法是以  $37^{\circ}C$  时，在 Klenow 酶的作用下以 DNA 合成为基础的，这种方法的特异性差，虽然某一特定靶 DNA 片段的拷贝数可扩增一百万倍，但事实上，大部分合成的产物并不是特异的。通过克隆  $\beta$  珠蛋白基因扩增产物，用  $\beta$  珠蛋白基因探针筛选单克隆；用引物之一探测扩增的序列，PCR 特异性为 1%。其他引物对特异性或高或低，但总的来说，Klenow 酶催化的 PCR 不是十分特异的反应，须用特异性的杂交探针或在某些情况下用固有的“雀巢”引物（Nested primer）来检测扩增靶序列的特性。

Taq 多聚酶的运用不仅简化了 PCR 操作程序,而且显著地提高了反应的特异性和产量。Taq 多聚酶所具有的较高最适温度 ( $\sim 75^{\circ}\text{C}$ ) 使得在较高的温度下,引物的变性和引物的延伸成为可能,因而增加了全反应过程中的严格性并减少了模板错配的引物延伸。在  $37^{\circ}\text{C}$  时,许多错配的引物十分稳定,在 Klenow 酶作用下被延伸了,结果产生了非特异性的扩增产物。Taq 多聚酶 PCR 特异性的增加是由于减少了非靶产物对酶和引物的竞争,从而改善了被扩增靶片段的得率。在 PCR 反应的后期,由于酶量不足以延伸每一个循环中变性的引物,使模板复合物扩增反应效率下降,以至扩增反应出现“平台”。在 Taq PCR 反应中,由于增加了反应特异性,其反应平台的出现较 Klenow 酶促 PCR 晚 (开始于  $1\mu\text{g}$  基因 DNA, 大约在 30 次循环而不是在第 20 次循环)。其它因素如产物浓度很高时,模板 DNA 双链发生再结合,也可能有助于平台效应,这将在第一章中讨论。采用 Taq 多聚酶不仅使 PCR 的特异性和产率大大提高,而且可扩增的片段长度也比 Klenow 酶相应增高 (前者可达 10kb, 尽管效率有所下降,而后者仅  $<400\text{bp}$ )。

虽然,PCR 原本被看成是合成特定序列拷贝的方法,同时也是改变特定模板序列的有效而精确的手段。由于寡核苷酸引物物理性地参入到扩增的产物中,引物 5' 端和起始模板的错配是可以接受的,因而有可能通过引物在靶序列中引入新的序列。对于克隆已知的序列来说人们不再受到天然存在的限制性位点的约束,可向任何引物的 5' 端加入任何限制性酶的识别位点,从而在双股扩增的产物中形成新的限制性位点。与此相同,像 T7 启动于这样的调节序列亦可加入,使得 PCR 扩增产物可以用 T7RNA 多聚酶合成 RNA 拷贝;此外,

采用适当的引物还可以在扩增产物中引入特定的核苷酸替代物。

与此定向突变不同的是,PCR 产物由于核苷酸错误的组合而引起的序列变化可能导致一些潜在的问题,有人用克隆特别扩增反应的产物而产生的多个 M13 克隆进行序列分析的方法,来评估 Taq 多聚酶的精确性。这项初步的研究表明错配率为 1/400,错误的发生率计算结果为  $2 \times 10^{-4}$  nt/循环。最近的研究,采用最优方法(降低  $Mg^{++}$  和 dNTP 的浓度)扩增不同的基因,发现错配率低一些。当初计算的错误率与文献报道用 Taq 多聚酶在体外复制  $\beta$  半乳糖核苷酶基因模板时所测出的错配率( $10^{-4}$  nt)一致。虽然不同的模板序列有不同的变异性,不同的反应条件可能影响 Taq 多聚酶的精确性,但原先估计的 Taq 多聚酶的高错配率,对大多数的应用来说再不构成问题。在用寡聚核苷酸探针杂交或用序列分析法分析扩增产物群体时,单个产物中罕见的错误尚未检出。然而,当分析来自 PCR 产物的单个克隆序列时,对多个克隆则要进行序列分析,以辨别错配的核苷酸和模板序列可靠的拷贝。其他具有“校对”功能活性的 DNA 多聚酶,如 T4 多聚酶,也能完成 PCR,这在那些要求错配率较低的研究中极为有用。如在第二章所述,Taq 多聚酶不含有可测的 3' 至 5'“校对”活性。

PCR 另一重要特性是它不仅可以扩增降解的模板,也可以扩增粗制的 DNA 样品靶序列,这一特性在诊断应用方面有特别重要的意义。用作模板的 DNA 不需要达到某种化学纯度,只要不含有 Taq 多聚酶抑制剂即可。几种快速制备样品的方法,对 PCR 的影响将在第四章中讨论。PCR 技术经粗制 DNA 样品中扩增特定 DNA 序列的能力,在研究应用,医

疗诊断及法医学（如个体的头发，见 19 章）等领域有重要的意义。

在扩增反应过程中，污染的可能性对于研究和诊断应用都具有广泛的影响。由于 PCR 具有成百万倍地合成 DNA 拷贝的能力，无论是前一反应的产物或是外源材料的污染都可能成为难题，特别是那些起始于几个模板的反应。扩增单个精子（见第 12 章），头发（见第 19 章）以及 HIV 基因序列（见第 14 章）等均需采取严格的措施，减少并监测可能的污染。一般而言，认真遵循实验程序，一次性使用试剂，及时更换吸液管，将反应制备过程和反应产物的分析过程分开都是减少污染的预防措施。减少 PCR 所需的循环次数，也能减少污染模板的扩增机会。为了检测潜在的染污需要，还必需用无模板 DNA 的空白反应。在遗传分型中，一份污染的样品可用两个以上等位基因分型的结果来鉴定（见第 18、19 章）。

PCR 技术由于能够从少量复杂的模板中产生大量特定的 DNA 片段，因而同 DNA 重组技术一样对分子生物学的基础理论和医学诊断方面产生重大影响。DNA 重组技术通过将一段特定的序列插入载体，并将载体引入宿主细胞内，使这段序列获得复制的能力，从而创造了分子克隆。PCR 属于一种“体外克隆”，它通过简单的自动化反应产生和修饰特定长度和序列的 DNA 片段。

在分子生物学令人兴奋的早期阶段，Erwin Chargaff 曾把这门学科描绘成没有执照的生物化学的实践。分子生物学迅速发展的一个主要因素是它独特地运用新技术，并通过新技术的应用使探索新问题成为可能。PCR 技术已促进了生物学研究中许多独立领域的分子分析。有了这种简单易行的 PCR 扩增技术，可以说分子生物学的实践不再有什么障碍

了。将来的实践者有可能继续寻找这种强有力技术的新用途并加以改善。

## 参 考 文 献

1. Mullis, K. B. , and Faloona, F. (1987) *Meth. Enzymol.* 155: 335.
2. Mullis, K. B. , Faloona, F. , Scharf, S. J. , Saiki, R. K. , Horn, G. T. , and Erlich, H. A. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273.
3. Saiki, R. , Scharf, S. , Faloona, F. , Mullis, K. , Horn, G. , Erlich, H. A. , and Amheim, N. (1985) *Science* 230: 1350.
4. Saiki, R. K. , Bugawan, T. L. , Horn, G. T. , Mullis, K. B. , and Erlich, H. A. (1986) *Nature* 324: 163.
5. Embury, S. H. , Scharf, S. J. , Saiki, R. K. , Gholson, M. A. , Golbus, M. , Amheim, N. , and Erlich, H. A. (1987) *New Engl. J. Med.* 316: 656.
6. Saiki, R. K. , Gelfand, D. H. , Stoffel, S. , Scharf, S. , Higuchi, R. H. , Horn, G. T. , Mullis, K. B. , and Erlich, H. A. (1988) *Science* 239: 487.
7. Scharf, S. J. , Horn, G. T. , and Erlich, H. A. (1986) *Science* 223: 1076.
8. Jeffreys, A. J. , Wilson, V. , Neumann, R. , and Keyte, J. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 10953-10971.
9. Goodenow, M. , Huet, T. , Saurin, W. , Kwok, S. , Sninsky, J. , and Wain-Hobson, S. (1989) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes.*
10. Tindall, K. R. , and Kunkel, T. A. (1988) *Biochem.* 27: 6008-6013.
11. Keoharong, P. , Kat, A. , Cariello, N. F. , and Thilly, W. G. (1988) *DNA* 7: 63-70.

# 第一章 PCR 技术的设计

## 【引言】

采用多聚酶链反应 (PCR) 技术只有短短的几年时间,但它已成为一种广泛应用的研究技术。就如多聚酶链反应本身一样,应用这一技术的人数已呈指数上升,在不久的将来随着它在非分子生物学领域更广泛的应用,应用者的数目可能继续猛增。PCR 技术受到广泛欢迎的主要原因是由于其方法简单,成功率高,概括地说,PCR 技术是将一种 DNA 样本与寡核苷酸引物,三磷酸脱氧核苷和耐热 Taq DNA 多聚酶在一种适当的缓冲液中混合,然后将混合物重复加热和冷却数小时,直到获得满意的扩增倍数为止。

事实上,PCR 是一项比较复杂的技术,到目前为止尚未被人们所完全认识。其反应体系内几种成份之间不断发生的动力学反应决定了产品的质量,尽管在大多数情况下其结果尚为满意,但若想得到更佳的效果,或当实验失败时,有许多指标就得进一步探索。本章将仔细考察一些技术性指标,归纳几条设计和实施 PCR 的原则。

## 【“标准反应”】

由于 PCR 的应用极为广泛,因此不能制定一套在任何条件下都能保证成功的反应条件,但是,以下所述的反应,对于大多数扩增都是较合适的;即使不合适,至少指出一些可作改进的共同点。

典型的标准 PCR 是在 50 或 100 $\mu$ l 体积内完成的,除 DNA 样本外,尚含有 50mmol/L KCl, 10mmol/L Tris-HCl (pH8.4, 室温), 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 $\mu$ g/ml 明胶,

0.25 $\mu$ mol/L 的各种引物, 200 $\mu$ l 各种三磷酸脱氧核苷 (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP), 2.5 单位的 Taq 多聚酶, 虽然 DNA 样本的类型是可变的, 但一般含有  $10^2 \sim 10^5$  拷贝的模板 (即 0.1 $\mu$ g 人类基因组 DNA), 通常应加入几滴矿物油封闭反应, 防止缩合。

扩增反应可以在 DNA 热循环 (Perkin-Elmer Cetus Instruments) 仪中方便地完成。采用“一步——循环”程序, 以 94°C 20 秒变性, 55°C 20 秒退火, 72°C 30 秒延伸, 如此进行 30 个循环即完成了扩增反应。“一步——循环”程序使器械尽快加热和冷却到所需的温度, 就目前通用的仪器而言, 加热速度大约 0.3°C/秒, 冷却速度约 1°C/秒, 完成一个单循环大约需要 3.75 分钟。

以上条件可用来扩增大范围的靶序列, 具有较高的特异性, 如果采用上述条件不能获得满意的结果, 可按下述方法改良 PCR 技术。

### 【引物选择】

遗憾的是, 选择高效与特异性引物的方法仍靠经验行事。目前, 尚无一套规则能确保合成出有效的引物对。然而, 正是引物而不是其它的因素决定着扩增反应的成功和失败。庆幸的是, 绝大多数引物均能发挥其作用, 下述规则有助于它的设计。

1. 选择尽可能呈随机分布, 以及 GC 含量与被扩增片段相似; 避免选择那些多聚嘌呤, 多聚嘧啶或其它非正规序列的引物。

2. 避免序列上有明显的二级结构, 尤其避免在引物 3' 末端具有二级结构。某些计算机程序, 如以 Wisconsin 大学获得的 squiggles 或 circle 程序, 对于显示这些结构十分有用。

3. 检查引物之间的互补性，特别值得注意的是，避免 3' 端重叠引物，以减少“引物二聚体”的发生（见下）。

制定这些规则仅是为了增加机会以使得任何已知的寡核苷酸能发挥其正常的功能作用。

绝大多数引物的长度为 20~30 个碱基，在扩增反应中的最佳用量各不相同。引物有可能合成得较长，但很少有此必要；与模板非互补的序列可加于引物的 5' 末端，这些外源性序列可参合到双链 PCR 产物中，提供了被扩增的靶序列末端引入限制性位点或调节成分（如启动子）。如果需要的话，可采用更短甚至变性的引物，最后将确定的序列置于引物的末端，这样即使作多次合成，各种取代 3' 末端的序列仍保持恒定，一般而言，采用寡核苷酸浓度以 0.05~0.5  $\mu\text{mol/L}$  之间为宜。

“引物二聚体”是扩增反应的人为产品，在 PCR 反应中经常可见，尤其是用含有极少起始模板拷贝的样本进行多次扩增循环时更是如此。它是双股片段，其长度接近于引物长度的两倍，看来是由多聚酶将一个引物延伸到另一个引物上面而产生的，如此产生的联接物是一种特别高效的 PCR 模板，如果它发生在扩增循环的早期，很容易控制反应使之成为主要的产品。

引物二聚体形成的确切机制尚未完全弄清。人们发现具有互补 3' 末端的引物容易形成二聚体，这提示引物末端靠近的瞬间反应是其起始步骤。许多多聚酶，包括 Taq 多聚酶，已显示出有较弱的非模板指导的聚合活性，它可将多余的碱基结合成钝性二聚体。如果这种活性对单股寡核苷酸也有作用的话，极有可能在延长过程中形成短的 3' 端重叠片断，而其它的引物足以促进二聚体形成作用。无论在何种情况下，如