

靶向新基因的分子克隆策略

——理论与方法

张学敏 王宜强 主编
沈倍奋 主审



军事医学科学出版社

靶向新基因的分子克隆策略

——理论与方法

New Gene-Targeted Strategy of Molecular Cloning
——Theory and Methodology

张学敏 王宜强 主编

沈倍奋 主审

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

内 容 提 要

本书介绍了有关寻找新基因的分子克隆主要策略和进展,包括理论和技术方法两部分,共七个章节:PCR 程序与条件优化;PCR 产物的克隆;突变、重组和体外选择;相邻未知 DNA 的克隆;文库构建与筛选;cDNA 分析、克隆在差异和减法技术中的应用;基因家族成员的克隆。理论部分清晰明了,针对性较强,涉及分子克隆的主要方面,帮助读者掌握针对不同基因的分子克隆策略;技术方法部分的内容系统详实,易于操作。本书最大特点是除每章节专门的理论论述之外,在每一个具体方法或步骤中都有理论解释,归纳和阐明了具体实验中可能遭遇的麻烦和困惑,对实验失败的原因给予了理论分析和对策指导。与国内一般的分子生物学实验指南和 PCR 有关书籍不同的是,本书是对 PCR 分子克隆策略的理论和方法的纵深论述,不但可以作为新手的入门向导,也可作为行家的工作手册,适用于从事生物、医学和其他与生命科学相关的基础和应用研究的科研或教学人员包括研究生(医、药、农、林、牧、理、工)。

图书在版编目(CIP)数据

靶向新基因的分子克隆策略:理论与方法 / 张学敏, 王宜强主编

—北京: 军事医学科学出版社, 1999. 8

ISBN 7-80121-170-7

I. 靶... II. ①张...②王... III. 遗传工程-无性系 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 17890 号

军事医学科学出版社出版

(北京市太平路 27 号 邮政编码: 100850)

新华书店总店北京发行所发行

潮河印刷厂印刷

开本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 18.875 字数: 470 千字

1999 年 7 月第 1 版 1999 年 7 月第 1 次印刷

印数: 1—3000 册 定价: 45.00 元

(购买本社图书, 凡有缺、损、倒、脱页者, 本社发行部负责调换)

序 言

唐佩弦

分子生物学是 20 世纪 80 年代才开始兴起的一门新学科。是探索生物大分子的结构与功能关系，生命科学中的奥秘，动植物品系的优化以及人类疾病的发生原理和防治的一门崭新的学科。这门学科的产生和当时蛋白质核酸化学的发展有密切关系，也是当时生物大分子实验手段更新换代大发展的必然结果。没有现代实验技术，不可能有现代生命科学。当然，科学的发展又会对技术手段提出进一步要求，促进技术方法的再革新。

任何一个曾有成就的科学家，一旦因脱离了科学实践而不精通与自己的专业发展有关的当前最新的技术方法，就不再可能有新创造、新思维和新成就。科学创新是智慧加实践的结果。重视技术方法，就是重视科学实践。当今世界上在包括分子生物学在内的生物医学领域里，落后的技术手段决不可能产生先进的科学成果，也决不可能产生出类拔萃的科学人才。

本书作者王宜强与张学敏二位博士，分别在国内外出色地完成了博士后研究，总结了多年分子生物学丰富实践经验，参考大量国内外文献，及时撰写了这一本对现代分子生物学的实验策略、设计和技术方法有高度指导性和参照性的专著，正是发展我国现代生命科学的需要，它将一定受到我国广大生物医学工作人员的热烈欢迎。

和目前已出版的一些有关分子生物学的书籍相比，本书很显然具有以下的特点：

第一，对各种 PCR 分子克隆的策略在理论上进行了深入浅出的介绍，即使新手也有可能做到融会贯通；

第二，理论和技术的贯穿帮助你在理论的高度上去理解、掌握并吃透技术，单纯技术操作手册对于新手是很难能循之入门的，更谈不上去进行策略性的方案设计；

第三，当一项实验虽百般努力但仍然失败时，你有可能在本书中找到答案。本书对各项实验可能出现的不正常现象做了大量的分析。当经历反反复复的实验终于找到了失败的原因时，枯燥实验过程所带来的快乐和兴奋便不言而喻，相信从事过科学研究的人都有过这种体验。

为此，我非常高兴地为本书写序，并为它的出版而庆贺。

1999 年 6 月于
军事医学科学院，北京

致 谢

此书能够完成，得益于我们周围太多同志的鼓励和鼎力相助，没有这些帮助，就不可能有该书的出版。在这些帮助我们的人当中，我们要特别感谢鲁静如和于鸣女士，她们在文字等方面的高效工作大大加速了本书的写作进程；军事医学科学院国家生物医学分析中心的何昆同志，为本书绘制了所有插图并几易其稿，几乎都是在业余时间完成的；军事医学科学院三所分子免疫室的胡美茹同志，为本书提供了技术性帮助，并对个别方案做了进一步的实验验证。

我们还要特别感谢军事医学科学院科技部的首长们，不仅是因为对本书的出版提供了经费的支持，更重要的是，我们个人的每一步成长过程和现在优越的工作环境条件的获得都离不开科技部首长的培养、教育和支持。

我们还不能忘记曾引导我们进入本专业知识大门的唐佩弦和王嘉玺二位资深教授，我们由衷地感谢他们！唐佩弦教授还欣然为本书作序，鼓励我们在通往科学的道路上要汲取不同学科之所长，勇于探索。

承蒙沈倍奋院士对本书进行了严格的审核，纠正了许多错误，对有疑问之处查对了文献出处，并对本书的改进提出了建设性的意见，我们对沈院士严谨的作风深表敬意，并对沈院士长期以来给予我们的指导和关心表示由衷的感谢！

张学敏 王宜强

目 录

第一章 PCR 程序与条件优化	1
第 1 节 PCR 的理论知识	1
第 2 节 用超长 PCR 法从基因组 DNA 中扩增长片段	11
第 3 节 用 <i>Tub</i> DNA 聚合酶自少量基因组 DNA 扩增 5kb 以下的 DNA 序列	18
第 4 节 触减 PCR 或步减 PCR 法: 一步优化	23
第 5 节 RT-PCR 一步法克隆 cDNA 大片段	27
第二章 PCR 产物的克隆	34
第 1 节 利用 <i>T4</i> DNA 聚合酶产生可直接克隆的 PCR 产物	34
第 2 节 不需连接酶的快速亚克隆法	38
第 3 节 利用突出的 T/A 克隆 PCR 产物	44
第 4 节 应用 <i>Xcm</i> I 酶切位点制备 T 载体	50
第 5 节 应用 T 连接子策略修饰和定向克隆 PCR 产物	55
第三章 突变、重组和体外选择	64
第 1 节 重组 PCR 介导的基因重组及定点突变	64
第 2 节 DNA 的体外重组与突变: 用重叠区扩增法进行基因拼接	69
第 3 节 应用 PCR 插入子对合成基因进行框架内克隆	74
第 4 节 用巨型引物 PCR 方法进行基因突变和基因融合	82
第 5 节 单个反应管内完成快速、有效的基因突变	86
第 6 节 用耐热连接酶制造突变	91
第 7 节 用三步 PCR 介导接头分区诱变	94
第 8 节 Flip-PCR 介导序列倒置	97
第 9 节 SELEX 组合分析——寻找高亲和力核酸配体的方法	99
第四章 相邻未知 DNA 的克隆	113
第 1 节 快速扩增 cDNA 末端: RACE 策略	113
第 2 节 单侧特异性 PCR 扩增基因调控区	116
第 3 节 用末端修饰法扩增 cDNA 相邻序列和基因组片段	120
第 4 节 向第一链 cDNA 3'端锚着固定序列: 在克隆稀有全长 mRNA 中的应用	129
第 5 节 用欢乐 PCR 法在 DNA 克隆内快速定向移行	138
第 6 节 反式 PCR: 克隆 cDNA 末端的有效方法	141

第 7 节	用锚着 PCR 从基因组文库中快速扩增基因末端	144
第 8 节	用外显子扩增法从酵母人工染色体 (YAC) 中分离外显子序列	147
第五章	文库构建与筛选	162
第 1 节	用磁珠和 PCR 方法自小量 RNA 构建 cDNA 文库	162
第 2 节	通过对 cDNA 群体的顺次细分法提高低丰余度 cDNA 的平均丰余度 ...	169
第 3 节	用少量细胞构建 cDNA 文库	178
第 4 节	应用非放射性方法对重组文库进行快速筛选	184
第 5 节	用 PCR 筛选 cDNA 文库	189
第 6 节	用亚文库法对稀有克隆进行富集和筛选	190
第六章	PCR 在差异显示和减法技术中的应用	201
第 1 节	用分子选择法对 cDNA 序列丰度进行正常化	201
第 2 节	用磁珠和 PCR 进行减法 cDNA 克隆	208
第 3 节	扣除 cDNA 的 PCR 更新法	218
第 4 节	应用 PCR 进行 cDNA 文库的差式筛选	228
第 5 节	用 DDRT-PCR 鉴定和克隆差异表达的基因	235
第 6 节	基因组扣除方案	243
第 7 节	DNA/RNA 指纹图: 任意引物 PCR 法 (AP-PCR)	249
第七章	基因家族成员的克隆	265
第 1 节	用简并寡核苷酸引物和 PCR 克隆基因家族成员	265
第 2 节	具最低序列相似性的基因扩增: 次黄核苷酸在简并引物中的应用	272
第 3 节	如何设计用于扩增基因家族中特定成员或亚群的 PCR 引物	276
第 4 节	根据统计学资料设计引物	282
附录 1	DNA 片段末端内切酶切割效率	290
附录 2	不同物种对密码子使用的偏向性比较	292

第一章 PCR 程序与条件优化

第 1 节 PCR 的理论知识

1 基本理论

1.1 PCR 的定义

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是指在引物指导下由酶催化的对特定的克隆或基因组 DNA 序列进行的扩增反应(Innis *et al*, 1990)。该方法最早由 Mullis 于 1987 年发明, 现已成为实验室常规的操作, 并已实现自动化。模板 DNA 中包含目的序列, 长短由几十到几千个碱基对不等。反应缓冲液中含有相对过量的寡核苷酸引物和 4 种脱氧核苷酸, 反应由一种对热稳定的 DNA 聚合酶如常用的 Taq DNA 聚合酶催化, 通过对目的序列的指数型扩增, 结果可获得数百万拷贝的目的序列。尽管 PCR 本身只能用于扩增 DNA, 但也可用 RNA 作最初材料反转录生成 DNA 后再进行 PCR(RT-PCR)(Mullis *et al*, 1987, Saiki *et al*, 1988, Saiki *et al*, 1985, Scharf *et al*, 1986)。

1.2 PCR 的执行

PCR 的主要内容是重复性的循环, 其中每一循环包括 3 个基本步骤: 高温下双链 DNA 变性解链; 低温下寡核苷酸引物与单链模板配对退火; 在酶催化下由引物延伸合成完整的目的片段拷贝, 该拷贝又可作为下一循环的模板。引物的 3' 端必须与目的片段精确互补, 而 5' 端可以是非互补性的尾巴, 通常是内切酶位点序列或启动子序列, 在 PCR 中同样被合成。随着循环的进行, 原来的模板和新合成的目的片段均作为底物参与变性、退火、延伸等反应。理论上讲(即假定扩增效率为 100%), 每循环结束, 目的片段的数量要增加一倍, 即呈几何级数增加。

如此计算, 1 个目的分子经过 25 个循环变成 33×10^6 个拷贝。每增加 10 个循环, 目的片段的数量增加至 1024 倍。但通常情况下, 反应进行一定程度后即变成自限性, 扩增倍数在 $10^5 \sim 10^9$ 之间。过量的引物和 dNTPs 有助于反应的进行。反应体系中还要在常用的 10mmol/L Tris-HCl 缓冲液中(常温, pH8.3)加入 50mmol/L KCl 以提供适当的离子强度, Mg^{2+} 作为酶辅助因子对反应也至关重要(Wang *et al*, 1989)。

实际上, 即使在最佳条件下, 扩增效率也未必能达到 100%, 假定 X 为最初的目的片段拷贝数, 实际扩增效率为 p, 那么 n 个循环之后目的片段的数量 Y 与扩增效率的关系应是:

$$Y = X(1+p)^n$$

在 94~96℃ 时变性发生得很快。引物的退火温度取决于引物与模板杂交分子溶解温度 (T_m)。可以以引物的序列、浓度和体系中的盐浓度为依据,用分析软件辅助计算 T_m 值,通过优化组合决定最适宜的退火温度。对多数模板来说,延伸可以在 72℃ 下进行。PCR 也可在两温度循环中有效进行,即退火、延伸同时完成。

1.3 防止污染

由于 PCR 可以有效地扩增单个分子,所以必须采取切实有效的措施以防 PCR 反应系统被污染或 PCR 产物污染其他反应体系。PCR 相关的污染主要有 3 种来源:同时操作多个样品时样品间交叉污染;环境中的污染,比如克隆有靶序列的质粒在工作台面上的污染;遗留污染,是指将一次 PCR 反应产物带入下一次 PCR 反应,比如使用一对引物扩增出某基因片段,然后经过适当处理在片段中部制造了定点突变,此时若用同一对引物对突变产物进行扩增或 PCR 鉴定,如果防备不当,原来野生型的片段则有可能成为对突变体的遗留污染。PCR 是典型的在“小反应管内发生的反应”,而且在微小的气雾滴中也会含有上千拷贝的残留片段,可能使本来阴性的结果变成假阳性。所以所用的反应管、移液器滴头都应一次性使用,所有操作(包括有关试剂的配制和反应体系的建立)均应在隔离的工作区(如层流柜或超净台)使用专用的微量移液器进行。实际上目前在我国许多实验室难以做到这一点,甚至所用的反应管、移液器滴头尚不能达到一次性使用,需反复利用,而酸、碱、酒精洗涤和高压灭菌等均不足以彻底破坏吸附于这类器材上的 DNA,所以反复利用的实验器材可能成为 PCR 中(以及其他一些反应中)污染的重要来源。

解决污染问题主要应依靠物理隔离。Longo *et al.*, (1990) 发明一种利用尿嘧啶 N-糖苷酶(uracil DNA glycosylase, UDG) 解决遗留污染的方法。UDG 广泛存在于所有细胞内,负责清除由胞苷脱氨而成的尿苷。UDG 切断尿苷碱基与磷酸-核糖骨架之间的 N-糖苷键,产生的核苷空缺由其他的 DNA 修复酶进行修复。Longo 正是利用 UDG 的这种活性,主要有两种做法:一种被称作 dUTP 方案,是在所有的 PCR 反应中均用 dUTP 代替 dTTP,这样产生的 PCR 产物中除引物位置外,dTTP 处被 dUTP 代替,这并不影响对其进行克隆等操作。在每次 PCR 之前,均将设置好的 PCR 反应体系用 UDG 处理,那么其中的遗留污染 DNA(假如有的话)将被破坏,不能作为下面 PCR 反应的底物,由于在后续的热变性过程中 UDG 将被灭活,所以事先加入的 UDG 不会对本反应的产物造成任何影响。

第二种方案是 dU 引物方案,即在引物合成过程中用 dUTP 代替 dTTP,用这类引物引导合成的 PCR 产物在两条链的 5' 端引物部位含有 dU,用 UDG 处理后,该区段被破坏,剩余的部分在后续的 PCR 循环中不能作为有效模板被扩增。由于 UDG 对长于 4 核苷酸的 DNA(单链或双链)所含的 dU 都能进行清除,所以在 dU 引物方案中需先将 UDG 灭活后再加入下一轮 PCR 的引物。

1.4 热启动

在 PCR 反应各步骤中，引物与目的序列的结合是全反应中决定反应特异性的步骤，所以引物退火的温度即显得十分重要。一般准备 PCR 反应体系时均在冰上或室温下操作，但反应成分加入齐全时引物可能与任何单链 DNA 产生非特异性的结合，加之 Taq 酶在较低温度下仍有一些活性，就可能对错配的引物进行延伸，使得在后续 PCR 中发生错误。为此在反应体系达到一合适温度前，先空缺一种主要反应成分如 Taq 酶，可以有效避免这类错配反应的发生。可以在第一轮循环中向变性温度(94℃)升温过程中达到 65~70℃时再加入 Taq 酶，这种方法仅适于对少数几个样本进行操作。第二种方法是在反应体系中使用 Ampli Taq Gold 酶，该酶在低温时处于灭活状态，在开始 PCR 循环前先在 92~95℃恒温 9~12min，该酶即可以被激活，达到热启动效果，但该酶比普通 Taq 酶更昂贵(Chou *et al*, 1992)。还有一种方法是将反应成分用蜡层分隔为上下两部分，在反应管向变性温度升温过程中，当温度到达蜡层的熔点，蜡层融化，两部分的反应成分混合，组成完整的反应体系（详见本节举例）。

1.5 PCR 的应用范围

PCR 的最大特点在于可以对感兴趣的特定序列进行大规模扩增，使得目的分子由“不可见”变为“可见”，由无法操作变得可以操作。PCR 可广泛应用于分子生物学研究的各个方面，这也正是会对本书感兴趣的读者们所熟知的。在遗传病研究中可用于寻找新的基因，在医学临床上可用于许多疾病的诊断和鉴别诊断，比如可以鉴别 HIV-1 和 HCV 病毒分子等并进行定量。活跃基因的产物也可用 RT-PCR 法精确定量。在人类学及进化化学领域，可用 PCR 方法追踪古老 DNA 的降解痕迹。由于极度的灵敏性和选择性，PCR 可通过对痕量残留物的分析鉴定身分，对在法医学中进行亲子鉴定、疑犯排查等工作提供有力帮助。在动物杂交工作中，可以对单个生殖细胞进行检测。在胚胎 4 细胞阶段即可进行分类。PCR 的应用加速了发现新基因的进程，因为 PCR 使得大海捞针变得现实。PCR 技术便利了 DNA 测序的进行，并为利用 Sanger 法进行循环测序奠定了基础(Innis *et al*, 1988)。

2 PCR 酶

PCR 的本质实际上是 DNA 聚合酶催化的 DNA 合成反应。在 PCR 的早期版本中，使用普通的 DNA 聚合酶，不耐高温，每次变性之后，都需向反应管中添加聚合酶。只是在使用了耐热 DNA 聚合酶后，PCR 才成为今天的样子。耐热 DNA 聚合酶既可以耐受高温（变性温度，通常为 93~96℃）而不丧失活性，而且发挥活性也需较高的温度。

现在最常用的 PCR 聚合酶是从嗜热真菌类的水生栖热菌（*Eubacterium thermus aquaticus*）YT1 株分离而来的 Taq 酶或其重组产品。近年来又出现其他一些种类，比如从嗜热栖热菌（*Thermus thermophilus*）来的 Tth，从海栖热孢菌（*Thermotoga maritima*）

分离的 Tma, 从里氏热球菌 (*Thermococcus litoralia*) 分离的 Tli, 以及从烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) 来的 Pfu, 等等。这些酶的相关特性如表 1-1 所示, 在后面相关章节中也会介绍。

表 1-1 常用商售耐热 DNA 聚合酶的特性比较

酶	最佳条件				分子 量 kD	比活 ^a KU/mg	外切活性		伸展力 (碱基)	延 伸 速 率	热稳定 (min)
	MgCl ₂ (mM)	pH	KCl (mM)	温度 (°C)			5'→3'	3'→5'			
Taq	2.0~3.0	9.4	10~55	75~80	94.0	292	+	-	50~60	75	9 ^e
Stoffel 片段	3.5~4.0	8.3	0~10	75~80	61.3	369	-	-	5~10	50	21 ^c
Tth	1.5~2.5	9.4	35~100	75~80	94.0	148	+	-	20~30	60	2 ^c
Met284-Tma	1.5~2.0	8.3	10~35	75~80	70.0	115	-	+	ND	ND	40~50 ^c
Tli	ND ^f	ND	ND	75~80	90~93	23	-	+	7	67	120 ^d
Pfu	ND	ND	ND	ND	90.0	ND	-	+	ND	ND	60 ^e

a: 比活性 (千单位/毫克)。每单位定义为在 30min 内将 10nmol dNTP 掺入到产物中所需的酶活性; b: 延
伸速率 (核苷酸/s) 为在 70°C 测定值; c: 在 97.5°C 下测定的半活期; d: 在 100°C 下测定的半活期; e: 在 95°C
下的活性; f: ND, 未测定

对于聚合酶的选择, 取决于欲进行的反应的要求。比如在用 PCR 进行含插入子片段的阳性克隆的粗筛时, 普通的 Taq 酶便足够。如果模板具有稳定的二级结构, 可选用 Stoffel 片段, 因为普通的 Taq 酶的 5'→3' 外切活性将切断发夹结构, 产生的 DNA 片段不能再作为后续反应的模板, 而 Stoffel 片段无此活性。在希望得到大量扩增产物的 PCR 反应中, 也可使用 Stoffel 片段。PCR 反应平台期的到来主要是由于浓度太高导致在延伸时相内产物链之间的再复性, 形成的双链正好是 5'→3' 外切活性的底物, 因此形成“边合成边降解”的局面, 最终的产物总量并不上升。Stoffel 片段则可以一边解开再复性的双链, 一边合成新链, 只是合成的速度有所降低。

在扩增 G、C 含量特别高的目的片段时, 需要更高的变性温度, 此时可以选用热稳定性更强的 Stoffel 片段、Met284-Tma 聚合酶、Tli、Pfu 聚合酶。由于 Stoffel 片段适用的 Mg²⁺ 范围更宽, 所以适用于样本中同时含多种模板的情况。而在随机突变 PCR 中, 需用 Mn²⁺ 作为辅助因子, 则全长 Taq 酶更优越。在扩增长片段时, Taq 或 Tth 由于较高的持续合成能力 (processivity) 而被作为首选, 而 Stoffel 片段的较低持续合成能力则有助于扩增稀有的突变点等位基因。除此之外, Stoffel 片段还被用于任意引物-PCR (详见第六章第 7 节)。

如果希望扩增反应具有较高的忠实性 (详见本节 6.6), 则宜选用具有纠错功能的聚合酶, 比如下面几种情况下: ①扩增拷贝数较低 (<1000) 且每一拷贝之间都可能略有差异的长片段 (>1kb) 时; ②扩增产物将用于表达目的时; ③想将 PCR 产物直接进行克隆时等等, 均需要反应具有尽量高的忠实性。但聚合酶的纠错功能有时会降解引物, 导致产量降低或生成非特异性产物, 解决途径之一是在引物的 3' 端使用硫代磷酸酯键 (phosphorothioate), 从而抵抗聚合酶的 3'→5' 外切活性。目前见诸报道的 Taq、Tli 和 Pfu 酶的碱基掺入错误率分别为 3×10⁻⁴~3×10⁻⁶、(3~5)×10⁻⁵ 和 2×10⁻⁶。

DNA 聚合酶需要 Mg^{2+} 作为辅助因子, 在适当的温度下催化对引物的延伸反应。4 种 dNTP (包含 dATP, dCTP, dGTP 和 dTTP 或 dUTP) 是组成新链的必需成分。为了一些特殊目的, 可以将修饰的核苷酸如 ddNTPs、生物素(biotin)-11-dNTP、dUTP、脱氮-2-脱氧鸟苷三磷酸(deaza-dGTP)、荧光素标记的 dNTP 等“掺入”到 PCR 产物中。

3 PCR 引物

3.1 设计原则

PCR 引物是短的寡聚脱氧核苷酸, 与目的片段两端的序列互补。这些合成的 DNA 片段通常长 15~25 碱基, 基中 G+C 约占 50%。因为两条引物分别与目的片段(双链)的两条链的末端互补, 因此两引物之间无任何关系。在设计时必须特别注意引物之间不能互配形成双链结构, 引物内部也不能形成发夹结构。引物的 3' 端必须与目的片段完全相配。位点特异的 PCR 策略正是利用了这一点: 在筛选突变子时, 应用与该突变序列匹配的引物, 可以扩增出阳性片段, 由于该引物不能与野生型片段匹配, 则不能扩增出相应片段。引物的 5' 端可以不与目的片段互补, 可以包含内切酶位点或启动子序列, 但在下一轮反应中, 这些序列会被同样合成。有时为扩增仅知其表达产物对应的氨基酸序列的目的片段时, 可以在引物中设计成简并密码子。此时较早几个的 PCR 循环应使用较低的退火温度, 后部分循环中再使用较高的退火温度以保证复制的严格性。

PCR 引物也可以是同聚体, 如 oligo-dT, 通常被用于对用 oligo-dT 反转录而来的 cDNA 的 PCR 扩增反应。而 DNA 多态性分析实验中, 使用的引物则为随机序列, 可同时与两条链结合, 最后可以产生一分散的 PCR 产物, 称为基因组的指形图 (Sobral *et al*, 1993, 详见第 6 章第 7 节)。

3.2 引物 T_m

DNA 双链(比如引物与模板形成的复合体)的稳定性依赖于 DNA 序列、两条链各自的浓度及缓冲液中盐的浓度。加热可以打开双链结构。在一半分子为单链另一半分子结合成双链的温度称为该复合体的熔解温度 T_m 。由于 G+C 碱基对间的氢键数较 A+T 间多, G+C 含量高的 DNA 的 T_m 值也高。人们经常只用 G+C 含量来预测 DNA 双链体的 T_m , 但 G+C 含量相同的 DNA 双体可以具有不同的 T_m 值。可以根据序列数据用计算机程序辅助估计 T_m 以保证最佳的引物设计方案。

由于 PCR 的特异性取决于两条引物与各自匹配末端的结合, 反应中的退火温度应根据两个 T_m 值(一般相差 2~4℃)折衷选择。反应的具体方案可有多种, 但一般先用较低的退火温度来检查扩增目的片段的可能性, 然后用较高的退火温度来检测达到最佳特异性所需的严格程度。有关退火温度的计算, 也有不同的方法, 将在后面有关章节中分别介绍。

4 PCR 样本

4.1 种 类

PCR 样本可以是来自任何生物——动物、细菌、植物或病毒的单链或双链 DNA，也可以是用化学方法合成的。细胞总 RNA、带多聚 A 的 mRNA、病毒 RNA、tRNA 或 rRNA 等多种 RNA 分子，在用反转录酶处理转换成互补 DNA (cDNA) 后同样可以作为 PCR 反应的模板。

4.2 数 量

与常规克隆或分子生物学分析相比，PCR 所需的起始材料可以是单个分子。一般而言，PCR 检测可以用纳克(ng)级的 DNA 克隆模板或微克(μg)级的基因组 DNA，或者是 10^5 的目的 DNA 片段。

4.3 纯 度

总起来说，用作 PCR 模板的 DNA 样本不需很纯。单个细胞、细胞粗制裂解物，或者裂解的 DNA 样本，甚至以原位状态存在于细胞核内的基因组 DNA，都可以成功地用于扩增。对样本纯度的最基本要求一是要含有至少一个包含有待扩增片段的完整的分子，二是其他的不纯物的浓度不会抑制酶的活性。但是在一些特殊情况下，比如欲扩增长片段 DNA，仍需考虑 DNA 样本的质量与数量(Cheng *et al*, 1994, 1995)，这是因为：① 含有更多的模板分子时，由多个样本间的交叉污染或从其他 PCR 反应的遗留污染造成的假阳性的发生率将下降；② 当 PCR 扩增特异性或效率不高或目的序列较少时，PCR 的产量不尽如人意。当用于 PCR 的起始材料成分不确定，而难以确定目的 DNA 的含量时，应先尽量使用较多的样本，摸索条件。

5 热循环中应考虑的因素

5.1 PCR 仪和 PCR 反应管

PCR 仪，也可泛称为热循环仪，型号有多种，加热、降温的方式也有所差别。在新开展 PCR 工作的实验室，可根据自己的经济能力选购适合自己工作目的的仪器。进行 PCR 的容器必须具有良好的导热性能并适于操作微量的酶和核酸样本，一般用聚乙烯做成，普通的厚壁微量离心管可适于许多热循环仪。最常用的反应规模是 $10\sim 100\ \mu\text{l}$ 体积，并应用一层矿物油或蜡胶加于反应液之上，以防止管内的蒸发及冷凝发生。有些仪器如 Perkin-Elmer(PE)公司的 9600 型 PCR 仪可自反应管上部的盖板加热，从而避免了水分蒸发，省却了加用油脂带来的麻烦，与特制的 0.2ml 薄壁反应管配套使用，使循环参数的设置更加随意、精确。

5.2 温度及时间设置

要获得良好的扩增效果，必须保证在每一循环中反应物都在变性、退火、延伸温度上有适当的时间停留。如果任何一个温度上的时间不充分，反应体系与加热槽将不能达到热平衡。应根据所用的 PCR 仪和反应管设置循环参数，比如常规应用厚壁微量离心管在 PE480 热循环仪上进行 PCR 需设置 60s 时间以供温度转换，在 PE9600 热循环仪上，只需 15s 即可自变性温度降至退火温度，达到热平衡。

6 PCR 成功的条件

6.1 金属离子作为辅酶

Mg^{2+} 是 PCR 中 DNA 聚合酶的活性所必需的辅助因子，因此其浓度在每一引物/模板配对中均应做到最适。反应体系中许多成分都结合 Mg^{2+} ，包括引物、模板、PCR 产物和 dNTP。其中以 1:1 比例结合 Mg^{2+} 的主要成分是高浓度的 dNTP。因为需有自由 Mg^{2+} 作为辅酶， Mg^{2+} 的总浓度必须超过 dNTP 的总浓度。在摸索反应的最优条件时，最初可用 1.5mmol/L 的 $MgCl_2$ 浓度及 0.8mmol/L 的总 dNTP，留有 0.7mmol/L 的 Mg^{2+} 作为 DNA 聚合酶的辅酶，然后在 1.5~4mmol/L 浓度范围内依次递加 0.5mmol/L (Erlich, 1989)。

6.2 底物及底物类似物

Taq 酶除了可将 dNTP 高效地掺入到新合成的链中外，也可将修饰的底物掺入到 PCR 产物中。地高辛-dUTP、生物素-11-dUTP、C7deaza-dGTP 以及荧光素标记的 dNTP 均可作为 Taq 酶的合适底物，所得的 PCR 产物可用作检测探针。常规 PCR 中，dNTP 各成分的浓度是平等的，而在进行突变反应时，dNTP 的浓度会有所偏重。

6.3 缓冲液/盐

一般 Taq 酶应用的 PCR 缓冲液包括 50mmol/L KCl 和 10mmol/L Tris-HCl，室温下的 pH 值为 8.3，可以提供反应所需的合适离子强度和缓冲能力。同时应注意盐浓度会影响引物/模板双体的 T_m 值，并因此影响退火温度。当目的片段需要很高的变性温度时，可在缓冲液中加入二甲基亚砜 (DMSO)、甲酰胺和甘油等助溶剂 (Landre *et al*, 1995)，其主要作用机理是降低 DNA 的 T_m 值及破坏 DNA 间的二级结构等。

6.4 循环

PCR 循环数应根据最初加入的目的片段的量而定。在一个典型的 PCR 反应中，自单一拷贝开始，经过 40 个循环后，在 10^{12} 拷贝时达到平台期即最大产量 ($10^{12} \approx 240$)。PCR 的效率一般在 80%~95% 之内， n 个循环后目的片段的扩增倍数为 1.9^n 。只要在分析结果时能看到特异性的目的片段，进行的循环次数应越少越好，因为过多的循环次数可导致一些非特异性的产物干扰，发生错误的比例也上升 (Innis *et al*, 1990, Erlich, 1989)。

6.5 酶/目的片段之比

每一 PCR 样本都应预先估计所含目的片段的拷贝数，比如 1ng λ DNA 含 1.8×10^7 拷贝。而在一标准的 100 μ l PCR 反应中，所用的 Taq 酶约有 1010 分子。在加入的目的片段较少时，在反应早期酶分子处于过剩状态。随着反应进行，复制子积聚，反应后期酶变成了限速成分，此时有必要将延伸时间延长，以达到最大的 PCR 产率。

6.6 PCR 反应的忠实性

DNA 复制的忠实性是生命活动中必须遵守的原则。为了反映 DNA 的“真实面目”，同样要求 PCR 反应具有最大程度的忠实性。如前所述，具有 3' $\rightarrow$ 5' 外切活性的 DNA 聚合酶可以将错配碱基从链内清除，换以正确碱基。据估计，聚合酶的纠错功能可以使反应的忠实性提高 10 倍。假定聚合酶引入错配的概率为 10^{-5} ，20 个循环后，总错误频率为 1/10000，对于 500bp 长的片段，有 95% 的产物是正确的，而 40 个循环后，错误频率升至 1/5000，仅有 90% 的产物是正确的。

除了 DNA 聚合酶外，还有多种因素影响 PCR 反应的忠实性。① dNTP 浓度：高浓度下，延伸反应中 DNA 合成速度加快，识别并去除错配碱基的机会下降，导致错误率升高；② dNTP 平衡：各成分间的不平衡会导致错误率升高；③ Mg^{2+} 浓度： Mg^{2+} 浓度较低时，错误率上升；④ pH 值：依酶的不同，对 pH 的反应性不同，有人证明低 pH 值增加 Taq 酶的忠实性，而高 pH 值增加 Tma 酶的忠实性；⑤ 循环温度：延伸温度上升，导致错误率增加，变性温度上升，亦可导致 DNA 损伤增加，最后使错误率增加；⑥ 循环时间：较短的延伸时间使得错配碱基继续延伸的机会下降，反应忠实性上升，较短的变性时间亦使 DNA 损伤下降，产物的忠实性上升；⑦ 酶的伸展区：伸展区较短的酶，对错配碱基延伸的效率下降，反应忠实性上升；⑧ 循环次数：越少越好。

7 PCR 程序举例

7.1 试剂及用品

下面以 Perkin-Elmer 公司生产的 Gene Amplimer® 引物对 (SK145 和 SK431) 和该公司的 GeneAmp® PCR 试剂盒成分以及 PCR Carry-Over Prevention Kit 为例，扩增 HIV-1 的 gag 区内一保守的 142bp 的 DNA 片段。

程序使用热启动方法，首先在一部分 PCR 反应物（称下层试剂混合物，见表 1-2）上形成一固相蜡层。其余成分（上层试剂混合物）加到固相蜡层之上。在第一个热循环中向变性温度升温时，蜡层融化并浮起至密度较高的上层试剂混合物之上，盖住全部反应体系，加热引起的涡流则可以将两部分试剂均匀混合。

(1) 如表 1-2 所示准备下层试剂混合物各组分，在同批反应中可一次准备较大体积，然后分入各反应管。

- (2) 对 100 μ l 反应体系，向反应管中加入 40 μ l 下层试剂混合物。加入时应避免液体溅在管壁上。如有液滴残留于管壁，需用离心法甩至管底。
- (3) 小心向每管内加入一粒 AmpliWax PCR Gem 100 蜡粒，在 75~80℃ 间加热 3~5min 使蜡粒融化，回至室温使蜡凝固。
- (4) 如表 1-3 混合上层试剂混合物各组分。
- (5) 取 60 μ l 上层试剂混合物加至蜡层上。如果有液滴溅至管壁，轻弹试管使液滴流入液层。不要离心，因为离心会破坏蜡层。

表 1-2 下层试剂混合物的成分

试 剂	体积(μ l)	在 100 μ l 反应体系内的终浓度
蒸馏水	13.5	
10 $\times$ PCR 缓冲液 II ^a	4.0	1 $\times$
25 μ mol/L MgCl ₂	10.0	2.5 μ mol/L
10mmol/L dATP	2.0	200 μ mol/L
10mmol/L dCTP	2.0	200 μ mol/L
10mmol/L dTTP	2.0	200 μ mol/L
10mmol/L dGTP	2.0	200 μ mol/L
25mmol/L 引物 1 (SK145) ^b	2.0	0.5 μ mol/L
25mmol/L 引物 2 (SK431)	2.0	0.5 μ mol/L
1U/ μ l AmpErase™ UNG ^c	0.5	1U/反应
总体积	40.0	

表 1-3 上层试剂混合物

试 剂	体积(μ l)	在 100 μ l 反应体系内的终浓度
蒸馏水	43.0~52.9	
10 $\times$ PCR 缓冲液 II ^a	6.0	1 $\times$
5U/ μ l AmpliTaq DNA 聚合酶	0.5	2.5U/反应
1U/ μ l AmpErase™ UNG	0.5	1U/反应
对照 DNA ^b 103 拷贝/ μ l	0.1~10.0	102~104 拷贝/反应
总体积	60.0	

注(表 1-2、1-3): a. 10 $\times$ PCR 缓冲液 II: 500mmol/L KCl, 100mmol/L Tris-HCl, pH8.3; b. 此处所用对照 DNA 为 HIV-1 DNA。引物 SK145 序列为 5'-AGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAT-3', 引物 SK431 序列为 5'-TGCTATGTCAGTTCCTTGGTTCTCT-3'; c. UNG 即前文所说 UDG

- (6) 在 PE DNA Thermal Cyclor 480 上, 设置下列程序:
- ① 设置循环文件 1: 95℃ 1min, 60℃ 2min, 2 个循环, 后接文件 2。
 - ② 设置循环文件 2: 94℃ 1min, 60℃ 1min, 38 个循环, 后接文件 3。
 - ③ 时间维持文件 3: 60℃ 10min, 一个循环, 后接文件 4。
 - ④ 保温文件 4: 10℃, 永远。
- (7) 反应结束后, 用一移液器滴头在蜡层上扎一小孔, 换一新的滴头, 吸出样品。

8 PCR 产物的分析

普通实验室最常用的分析 DNA 的方法是琼脂糖凝胶电泳分析法。用适当浓度的琼脂糖凝胶可以方便、迅速地对 PCR 产物的有无及分布进行初步检测, 采用适当的分子量标准即可估计产物的大小。除琼脂糖凝胶电泳外, 尚有多种方法可用于 PCR 产物的分析。比如聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), Southern 或狭缝杂交, HPLC 分析, 或采用亚克隆和直接测序等方法进行进一步验证。反式点/狭缝杂交可将 PCR 扩增与非同位素检测结合起来 (Saiki *et al*, 1989), 还可利用 Taq 酶的 5' → 3' 外切活性采用放射自显影或荧光法对扩增产物进行更为精确的定量和分析 (Holland *et al*, 1991), 但在实验室使用很少, 可分别参阅有关文献。

9 PCR 疑难解析

至今为止, 经历 10 余年的发展和完善, PCR 作为一种方法, 本身已十分成熟, 而且仍在试图向其他领域渗透, 或与其他技术联合应用。但是, 有时即使仅仅执行一次从已知含有目的片段的质粒中扩增也会遇到一些问题, 比如, 出现与预期分子量不符的非特异性条带, 或出现拖尾模糊带, 这都是由于引物与一些非特异性部位发生了退火结合。有时可看到引物二聚体, 通常为 40~60 碱基长, 是两个引物之和。这种二聚体的出现会降低 PCR 产物的产量, 当反应体系中忘记加模板或循环次数过多或引物 3' 端有互补能力时, 均会发生这种现象。由于 Taq 聚合酶缺乏 3' → 5' 的外切酶活性, 偶尔也会发生将错配碱基掺入到产物中, 尽管这种错配通常影响不大, 但在每一次 PCR 反应中都必须考虑。

当所需的条带没有出现, 或条带过多, 或条带拖尾不清时, 均可认为 PCR 反应失败。分析失败原因, 调整反应参数如酶、盐浓度, 变性、退火、复性时间和温度, 重新设计引物, 以及实行热启动等, 有时可以“反败为胜”。

当没有预期条带出现时, 首先应验证是否加过 Taq 酶, 或酶的浓度是否合适。其次, 由于 Mg²⁺ 的重要性, 应注意加入的反应成分不应降低自由 Mg²⁺ 的浓度, 如缓冲液中的 EDTA 会螯合 Mg²⁺。变性、退火、延伸温度可能太高或太低, 加以调整可能会增加反应的灵敏度。最后应考虑模板的完整性。当 PCR 产物出现多条带时, 可把退火温度提高 2℃ 或重新考证引物的设计及组成。

如果在琼脂糖凝胶中出现拖尾不清条带, 首先应综合或单独考虑以下几点: 减少酶用