

# 实时荧光PCR技术

---

SHISHI YINGGUANG  
PCR JISHU

李金明◎编 著

 人民军医出版社  
PEOPLE'S MILITARY MEDICAL PRESS

# 实时荧光 PCR 技术

SHISHI YINGGUANG PCR JISHU

李金明 编著



人民军医出版社  
People's Military Medical Press

北京

---

图书在版编目(CIP)数据

实时荧光 PCR 技术/李金明编著. —北京:人民军医出版社,2007. 11  
ISBN 978-7-5091-1303-5

I. 实… II. 李… III. 病毒—聚合酶—链式反应 IV. Q939.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2007)第 156832 号

---

策划编辑:杨磊石 文字编辑:黄栩兵 责任审读:余满松

出版人:齐学进

出版发行:人民军医出版社

经销:新华书店

通信地址:北京市 100036 信箱 188 分箱

邮编:100036

质量反馈电话:(010)51927270;(010)51927283

邮购电话:(010)51927252

策划编辑电话:(010)51927292

网址:[www. pmmp. com. cn](http://www.pmmp.com.cn)

---

印刷:北京国马印刷厂 装订:京兰装订有限公司

开本:787mm×1092mm 1/16

印张:25 字数:600 千字

版、印次:2007 年 11 月第 1 版第 1 次印刷

印数:0001~3500

定价:69.00 元

---

版权所有 侵权必究

购买本社图书,凡有缺、倒、脱页者,本社负责调换

## 内 容 提 要

本书系统阐述了实时荧光 PCR 技术的基础理论和临床检测方法,共 25 章。包括实时荧光 PCR 技术的基本原理和方法,PCR 实验室设计与质量管理,检验标本的采集、运送、保存及核酸提取,PCR 测定数据处理,PCR 检验仪器设备,检验质量保证,病毒核酸检测的标准物质,以及各型肝炎病毒、人免疫缺陷病毒-1、人乳头瘤病毒、巨细胞病毒、冠状病毒、EB 病毒、流感病毒、沙眼衣原体、结核杆菌、淋病奈瑟菌、幽门螺杆菌、肺炎支原体、刚地弓形虫、解脲支原体等实时荧光 PCR 检测的标本采集与处理、引物和探针设计及临床意义。本书资料翔实、新颖,实用性、指导性强,是从事临床疫病研究、诊治的重要参考书,适合临床检验专业技术人员、各级临床医师和医学院校师生阅读参考,也可作为推广应用此项技术的培训教材。

## 作者简介

**李金明**,男,1963年2月出生。医学博士,卫生部临床检验中心临床免疫室主任、研究员,中国协和医科大学博士研究生导师。负责全国医院和血站实验室感染性疾病临床免疫和PCR检验,以及自身抗体免疫检验室间质量评价工作。近年来,较为系统地提出了临床分子诊断实验室质量管理、检测质量保证及标准化的概念和方法,推动了全国临床基因扩增检验实验室及人员培训的规范化;率先在国内开展临床核酸检验的质量控制和标准化工作,于2005年和2006年分别获得我国第1个病毒核酸检验国家二级和一级标准物质。研究方向为:临床分子诊断及质量控制。以项目负责人承担国家自然科学基金课题两项,首都医学发展科研基金课题一项。以分课题负责人承担欧盟第六框架计划(FP6)国际合作研究项目一项,参与国家“十五”科技攻关课题三项。学术兼职:全国医学计量技术委员会委员,中国计量测试学会国家标准物质委员会委员,中国输血协会专家委员会成员,中华医学会检验分会传染病学组和免疫学组专家委员会委员,中国医疗设备协会专家库专家,《中华检验医学杂志》、《中国输血杂志》、《临床肝胆病杂志》和《中国医药导刊》等期刊编委,中南大学湘雅医学院兼职教授。在学术期刊上以第一作者和通讯作者发表论文80余篇。编著及主编《临床酶免疫测定技术》(人民军医出版社,2005)、《临床基因扩增检验技术》(人民卫生出版社,2002)和《全国临床检验操作规程》第3版(东南大学出版社,2006,临床基因和核酸检验篇),参与编写其他专著和教材十余部。所主持和主要参与的项目分获2001年和2003年北京市科技进步三等奖。2006年获国务院政府特殊津贴。

# 前 言

聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)技术自 1983 年问世以来,因为其对基因或特定核酸序列在短时间内的极大的扩增效率,已在感染性疾病、肿瘤、遗传病、寄生虫病、法医学、动植物和考古等的诊断和研究中得到了广泛的应用,并在某些方面成为无可替代的检测技术。PCR 用于疾病的临床诊断,使人们拥有了从对蛋白分子的表型的认识进一步深入到了遗传物质——核酸分子的探索的有力工具,也使临床检验诊断学科中的临床分子诊断这一分支得到了飞速发展。尽管 PCR 有其无可比拟的优点,但也有一定的弱点,如果在临床实际应用中,不遵循一定的规则,也很容易造成并非 PCR 技术本身所致的错误结果。因为临床检验跟科研不一样,科研实验可以在 500 次实验中,即使是出现 499 次失败,只要第 500 次成功了,该项科研就是成功的,研究者就可以因此发表一篇极有影响的论文,提出一个崭新的假说,甚至获得诺贝尔奖。而临床检验,则是应用一种成熟的方法、成熟的技术,通常是一个商品试剂盒,去检测患者的临床标本,要求每一次临床检测,乃至对每一份标本的检测都应是准确和及时的。要做到这一点,就必须有严格的质量保证程序。临床 PCR 检验相对于其他临床检验技术,因其极高的检测灵敏度,影响因素很多。如标本或核酸纯化过程中出现的扩增反应抑制物、扩增仪孔间温度的差异以及核酸提取中的随机误差,均可造成假阴性结果。又如,以前扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染,也很容易出现假阳性结果。因此,PCR 临床应用必须围绕怎样防止假阳性和假阴性结果的出现而采取相应的质量保证措施。

PCR 方法在临床分子诊断中已展现了巨大的应用价值,但临床实验室必须在充分了解 PCR 测定的不确定性的基础上,采取相应质控措施,才能确保实验结果的准确性,而不致出现重大判断失误。因为 PCR 扩增,得到了极大的检测灵敏度,但同时其对检测中的错误也有极大的放大作用。因此,对于 PCR 检测结果的报告必须慎重,尤其是在该结果会产生重大后果的时候,如重大感染性疾病、遗传病、法医物证鉴定、亲子鉴定等,必须在有相应严格质控措施如内质控、阴性和阳性质控的情况下重复测定,才可以报告结果并做出实事求是的解释。

本书主要针对在国内外临床实验室最具使用前景及目前使用最广泛的实时荧光 PCR 技术,从 PCR 技术的历史、发展和趋势,实时荧光 PCR 技术的特点,临床 PCR 实验室的设计及质量管理体系的建立,用于 PCR 检验的临床标本的采集运送和保存,临床 PCR 实验室的仪器设备的使用、维护和校准,临床 PCR 检验的数据处理和质量保证以及主要临床 PCR 检验项目的特点、临床意义及注意细节等进行了论述,以期为从事临床 PCR 检验的实验室技术人员提供参考性建议。当然,从事科研的实验室技术人员也应可从本书得到相应的启发,因为一个成功

的科研与实验过程中的质控(科研中通常称为“对照”)是分不开的,尤其是科研中要用到 PCR 方法的。有大量的证据表明,如果没有严格的质量控制,科学研究人员就会将在实验室中所得到的“假阳性”或“假阴性”结果,当成一个重大发现去发表,从而造成难以挽回的后果。有些涉及仲裁、具有重大影响的检测的部门,则会因为“假阳性”或“假阴性”结果,对国家、部门和公民个人造成严重的损失,最严重的甚至会影响社会稳定。本书的部分内容是在《临床基因扩增检验技术》(人民卫生出版社,2002)基础上的进一步细化。

在本书编写过程中,全国在临床 PCR 检验第一线工作的同道,给了我很好的启发,也是大家的敬业精神和保证临床 PCR 检验质量的认真态度,促使我努力去完成本书的撰写。感谢本室同事王露楠、邓巍和张瑞的鼓励和支持,以及在一些资料收集上提供的帮助。感谢黄杰、杨昌梅、谢珊、魏玉香、魏葆珺、张括、王静、许瑞环、战思恩、汪维、刘敏、林贵高、孟双等研究生所做的资料收集和序列的查阅比对。

由于本人水平有限,书中如有不足或错误之处,敬请全国同道批评指正,以便再版时更正。

李金明

2007年8月

# 目 录

第 1 章 临床 PCR 技术的发展历史及趋势 .....	(1)
第一节 PCR 的起源和耐热 DNA 聚合酶的应用 .....	(1)
一、PCR 的起源 .....	(1)
二、耐热 DNA 聚合酶的应用 .....	(2)
第二节 PCR 的基本原理 .....	(3)
第三节 PCR 的反应动力学 .....	(5)
第四节 PCR 扩增体系和扩增条件 .....	(5)
一、PCR 扩增体系 .....	(5)
二、PCR 扩增条件 .....	(8)
三、PCR 扩增结果分析 .....	(10)
第五节 PCR 的主要特点与发展情况 .....	(11)
一、主要特点 .....	(11)
二、发展情况 .....	(12)
第 2 章 实时荧光 PCR 技术的发展历程、基本原理和方法 .....	(14)
第一节 发展历程 .....	(14)
第二节 基本原理 .....	(15)
一、PCR 扩增的理论模式 .....	(15)
二、实时荧光 PCR 的理论基础 .....	(16)
三、TaqMan 实时荧光 PCR 的基本原理 .....	(17)
四、双链 DNA 交联荧光染料实时荧光 PCR 的基本原理 .....	(19)
五、双杂交探针实时荧光 PCR 的基本原理 .....	(20)
六、分子信标实时荧光 PCR 的基本原理 .....	(21)
七、蝎形探针实时荧光 PCR 的基本原理 .....	(22)
八、数字实时荧光 PCR 的基本原理 .....	(24)
第三节 引物和探针的特点 .....	(25)
一、引物特点 .....	(26)
二、探针特点 .....	(26)
第 3 章 临床 PCR 实验室的设计及质量管理体系的建立 .....	(30)
第一节 临床 PCR 实验室的标本接收及分区规划设计 .....	(30)
一、标本接收要求 .....	(30)
二、实验室分区设计原则及工作流程 .....	(31)
第二节 实验室质量管理体系的建立 .....	(38)
一、实验室质量管理概述 .....	(38)
二、实验室质量管理的特点 .....	(40)



三、质量体系文件的特性、作用与编写 .....	(40)
第三节 实验室记录管理 .....	(55)
一、记录的种类 .....	(55)
二、记录的标志 .....	(55)
三、记录填写要求 .....	(56)
四、记录的封面和目录 .....	(58)
五、记录保存与管理 .....	(58)
第四节 实验室认可与验收 .....	(60)
一、实验室认可 .....	(60)
二、实验室认可与认证的区别 .....	(60)
三、实验室认可与验收的关系 .....	(61)
第 4 章 PCR 检验标本的采集、运送、保存及核酸提取 .....	(63)
第一节 标本采集、运送与保存 .....	(63)
一、标本采集 .....	(63)
二、标本运送与保存 .....	(65)
第二节 常见标本的处理和保存 .....	(66)
一、血液标本 .....	(66)
二、痰标本 .....	(66)
三、其他标本 .....	(68)
第三节 标本中 PCR 抑制物 .....	(70)
一、抑制物的来源及其作用机制 .....	(70)
二、常见抑制物的作用机制及对策 .....	(71)
第四节 核酸提取方法 .....	(73)
一、DNA 提取的经典方法 .....	(73)
二、RNA 的提取 .....	(74)
三、核酸提取的改良方法 .....	(76)
第 5 章 实时荧光 PCR 测定的数据处理 .....	(85)
第一节 基本概念 .....	(85)
第二节 实时荧光 PCR 外标绝对定量的数学模型 .....	(87)
一、基本计算公式的推导 .....	(87)
二、纵坐标为起始拷贝数对数值横坐标为 $C_t$ 值时的数学模型 .....	(88)
三、纵坐标为 $C_t$ 值横坐标为起始拷贝数时的数学模型 .....	(88)
第三节 实时荧光 PCR 相对定量数学模型 .....	(90)
一、校正曲线法 .....	(90)
二、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法 .....	(90)
三、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的改良法 .....	(92)
四、多重 PCR 法 .....	(94)
第四节 用曲线拟合的方法进行数据处理 .....	(95)
一、Liu 与 Saint 的方法 .....	(95)

二、Ramakers 等的方法 .....	(96)
三、Tichopad A 等的方法 .....	(96)
<b>第 6 章 实时荧光 PCR 仪及其发展 .....</b>	<b>(98)</b>
<b>第一节 PCR 仪的发展历史及基本原理 .....</b>	<b>(98)</b>
一、空气驱动循环 PCR 仪 .....	(98)
二、变温金属块 PCR 仪 .....	(99)
<b>第二节 实时荧光 PCR 仪简介 .....</b>	<b>(99)</b>
一、美国 ABI 公司的实时荧光 PCR 仪 .....	(100)
二、美国 Cepheid 公司的 Smart Cycler 实时荧光 PCR 仪 .....	(103)
三、美国 Bio-Rad 公司的实时荧光 PCR 仪 .....	(103)
四、美国 Stratagene 公司的实时荧光 PCR 仪 .....	(105)
五、Roche 公司的 LightCycler 实时荧光 PCR 仪 .....	(106)
六、Corbert 的 RotorGene 实时荧光 PCR 仪 .....	(106)
<b>第三节 实时荧光 PCR 仪选择 .....</b>	<b>(108)</b>
<b>第四节 实时荧光 PCR 仪的使用与维护 .....</b>	<b>(109)</b>
一、使用 .....	(109)
二、维护 .....	(110)
<b>第 7 章 临床 PCR 检验仪器设备 .....</b>	<b>(111)</b>
<b>第一节 天平 .....</b>	<b>(111)</b>
一、电子分析天平 .....	(111)
二、影响称量重现性的因素 .....	(112)
三、天平的选择 .....	(113)
四、维护和校准 .....	(113)
<b>第二节 离心机 .....</b>	<b>(115)</b>
一、基本原理 .....	(115)
二、离心力和相对离心力 .....	(115)
三、离心时间 .....	(116)
四、离心转子的选择 .....	(116)
五、离心管 .....	(119)
六、分类依据 .....	(119)
七、使用和维护 .....	(120)
<b>第三节 微量加样器 .....</b>	<b>(122)</b>
一、基本原理 .....	(122)
二、加样器的选择依据 .....	(123)
三、使用原则 .....	(125)
四、操作原则 .....	(125)
五、操作步骤 .....	(126)
六、维护与校准 .....	(129)
七、加样器常见故障及其排除 .....	(133)

<b>第 8 章 PCR 检验的质量保证</b> .....	(135)
<b>第一节 概述</b> .....	(135)
一、基本概念 .....	(135)
二、质量保证、室内质控和室间质评的关系 .....	(137)
<b>第二节 测定前质量控制</b> .....	(138)
一、实验室环境及仪器设备管理 .....	(138)
二、理想的试剂 .....	(140)
三、标准化操作程序 .....	(142)
四、重视人员培训 .....	(143)
五、主要污染源与防污染措施 .....	(143)
<b>第三节 核酸样本分离纯化与质量控制</b> .....	(146)
一、分离纯化 .....	(146)
二、质量控制 .....	(147)
<b>第四节 统计学质量控制</b> .....	(148)
一、理想的质控样本 .....	(148)
二、质控样本的设置、数量及排列顺序 .....	(149)
三、统计学质控的特点 .....	(149)
四、阳性样本测定重复性统计质控方法 .....	(150)
五、假阳性的统计质控方法 .....	(156)
六、室内质控数据的评价 .....	(160)
七、室内质控的局限性 .....	(162)
<b>第五节 室间质量评价</b> .....	(162)
一、评价程序设计 .....	(163)
二、对测定技术的评价 .....	(166)
三、室间质量评价的局限性 .....	(167)
<b>第 9 章 病毒核酸检测的标准物质</b> .....	(170)
<b>第一节 概述</b> .....	(170)
一、基本概念 .....	(170)
二、标准物质种类和溯源的关系 .....	(172)
<b>第二节 检测用标准物质的制备</b> .....	(173)
一、原材料选择原则和分装 .....	(173)
二、均匀性和稳定性 .....	(174)
三、定值 .....	(176)
四、标准物质的保存 .....	(178)
五、临床意义 .....	(178)
六、应用前景 .....	(179)
<b>第 10 章 甲型肝炎病毒实时荧光 PCR 检测</b> .....	(185)
<b>第 11 章 乙型肝炎病毒实时荧光 PCR 检测</b> .....	(190)
<b>第一节 非变异乙型肝炎病毒检测</b> .....	(190)

---

第二节 变异乙型肝炎病毒检测	(199)
一、前 C1896 位及 BCP 变异检测	(200)
二、变异 YMDD 检测	(201)
第三节 HBV cccDNA 的检测	(203)
第四节 HBV 基因型的检测	(204)
第五节 HBV RNA 检测	(207)
第六节 HBV 全基因组测定	(208)
第 12 章 丙型肝炎病毒实时荧光 RT-PCR 检测	(213)
第一节 丙型肝炎病毒检测	(213)
第二节 丙型肝炎病毒基因分型检测	(223)
第 13 章 人免疫缺陷病毒-1 实时荧光 RT-PCR 检测	(229)
第 14 章 人乳头瘤病毒实时荧光 PCR 检测	(240)
第 15 章 巨细胞病毒实时荧光 PCR 检测	(256)
第 16 章 严重急性呼吸综合征冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测	(272)
第 17 章 EB 病毒实时荧光 PCR 检测	(291)
第 18 章 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测	(299)
第 19 章 沙眼衣原体实时荧光 PCR 检测	(313)
第 20 章 结核杆菌实时荧光 PCR 检测	(325)
第 21 章 淋病奈瑟菌实时荧光 PCR 检测	(338)
第 22 章 幽门螺杆菌实时荧光 PCR 检测	(351)
第 23 章 肺炎支原体实时荧光 PCR 检测	(363)
第 24 章 刚地弓形虫实时荧光 PCR 检测	(369)
第 25 章 解脲支原体实时荧光 PCR 检测	(377)

# 第 1 章 临床 PCR 技术的发展历史及趋势

PCR 是英文 polymerase chain reaction 的缩写,译称“聚合酶链反应”;最早也有人译为“多聚酶链反应”,但现已统一用前者。PCR 自 1983 年发明至今,虽只有短短的 20 多年,但它在生命科学研究中的作用以“支点”来形容却一点不为过。现在从事生命科学研究的人们一谈到 PCR 时,总喜欢用“革命”一词来形容,认为它对生命科学研究是一项革命性的技术;尽管发明人 Mullis 本人认为,PCR 只是一个简单的不起眼的玩艺。事实却是,如果没有 PCR,人类基因组计划不可能在如此短的时间得以初步完成;就是 2003 年的急性呼吸综合征(SARS)病原体的发现,也很难在那么短的时间内实现。涉及基因操作的几乎所有研究将比现在花费更多的时间和财力。那么,这项“革命”性的生物技术又是如何成为我们手中有力的基因研究工具的呢?也许,简单地回顾一下 PCR 的发明史,可以带给我们一些启示。

## 第一节 PCR 的起源和耐热 DNA 聚合酶的应用

### 一、PCR 的起源

应该说,最早关于核酸体外扩增的设想可以回溯到 20 世纪 70 年代初,发现 DNA 聚合酶的科学家 Khorana 及其同事于 1971 年提出:“经过 DNA 变性,与合适引物杂交,用 DNA 聚合酶延伸引物,并不断重复该过程便可克隆 tRNA 基因”。但由于当时很难进行测序和合成寡核苷酸引物,且 1970 年 Smith 等发现了 DNA 限制性内切酶,使体外克隆和扩增基因成为可能,于是有了相应的手段,人们寻找更好、但在当时很难做到的方法的热情就少了许多,所以, Khorana 等的早期设想被人们遗忘。

PCR 的出现可以说与 DNA 聚合酶的发现是分不开的。DNA 聚合酶 I 最早发现于 1955 年,但直到 20 世纪 70 年代 Klenow 等才发现较具有实验价值及易于得到的大肠杆菌的 Klenow 片段。随着后来 DNA 限制性内切酶的发现,人们找到了一种可以按自己的意愿,克隆表达某一特定基因(如编码干扰素的基因)的办法,因此在 20 世纪 70 年代初以表达特定功能蛋白为目标的基因工程技术在全世界风行开来,成立于 20 世纪 70 年代初的位于美国加利福尼亚的 Cetus 公司,就是这样一个生物技术公司。由于其在以基因工程技术进行生物药物开发中,需要大量的寡核苷酸探针,于是 1972 年毕业于加利福尼亚大学伯克利分校的 Mullis 博士于 1979 年应聘到该公司,担任寡核苷酸合成部门负责人。但到了 80 年代初,由于核酸合成仪的发明,寡核苷酸的人工合成逐步由机器所取代,此时, Mullis 博士及其部门的工作则主要为核酸测序,即证明所合成的寡核苷酸或克隆的序列的正确性。当时所用的核酸测序方法为后来曾获得过诺贝尔奖的 Sanger 发明的双脱氧测序法,亦即 Sanger 法。这种方法是在将待测序单链 DNA 模板与合成的寡核苷酸引物退火后,分成四管反应,每管中的 4 种核苷酸合成原料 dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 中分别有一种为放射性核素标记的双脱氧即 ddATP,或 ddTTP,或 ddCTP,或 ddGTP,在 DNA 聚合酶的存在下,引物延伸,如遇到相应的 ddNTP(N

代表 A、T、C、G 的任一种)结合上去,延伸反应即会立即终止,电泳后经放射自显影即可从相应的 ddNTP 推测模板 DNA 的序列。Mullis 博士是一个思维非常活跃的人,常有各种奇思异想,尽管后来的事实证明绝大多数是不现实的。Mullis 在应用双脱氧方法测序时,他就能不能有一个更简单的方法,他想如果在反应体系中只是加入一种 ddNTP,而不加入其他 3 种 dNTP,如在引物 3' 末端所对应的核苷酸正好是与所加入的 ddNTP 互补,则反应就会立即终止,可以减少反应时间。他又想如果再设计一条与 DNA 模板另一条链互补的引物,同时对 DNA 两条链进行测序,就可达到对测序结果相互验证的目的。但前一点很难做到,因为在核酸模板制备时,由于振荡混匀等操作,在所制备的模板溶液中,常有脱落的游离 dNTP 存在。于是, Mullis 又想如果在加入 ddNTP 之前,先加入引物和聚合酶进行聚合延伸,将游离的 dNTP 消耗掉,不就可以了吗? 但这时,他突然意识到,经过这样的一个聚合延伸后,原来的 DNA 不就增加了 1 倍吗,如果再来一次,又会增加 1 倍,循环往复,而有一种指数增加的过程。这就是 PCR 最原始的“概念”。这种意识是其在 1983 年春天的一个周末驾车在加利福尼亚山间公路上时,突然产生的。

今天回过头去看,PCR 确实是一个非常简单的“概念”,所发生的奇迹是,其变成了一个成熟的可操作的实验系统,后者又上升为新的“概念”——基因扩增。其实,在 PCR 发明前的十多年时间里,发明 PCR 的条件即均已具备,但由于人们对于基因扩增已有分子克隆的方法,因而在 Mullis 之前就没有人去想过要寻找更为迅捷的途径。有哲人说过,机遇偏爱有准备的头脑。如果 Mullis 博士不是在从事 DNA 测序方面的工作,如果他不是一个总爱动脑想问题的人,如果他不是对迭代计算及计算机有浓厚的兴趣,也许 PCR 的发明不知会等到哪一天。Mullis 在思考更简便的双脱氧核酸测序方法中,PCR 这个概念突然在其脑海里迸发了出来,从而使后来从事生命科学研究的科研人员得到了一个最有力的工具。可以说,PCR 不是为解决某一个难题而生的,很有意思的是,在 PCR 发明后,各种各样需要用 PCR 来解决的难题才一个接一个的出现在人们面前。

## 二、耐热 DNA 聚合酶的应用

在 PCR 的发展史上,另外值得一提的是,耐热 DNA 聚合酶的纯化。PCR 在 1983 年发明后,由于 PCR 的操作过程中,需要反复加热变性与降温复性的步骤,而前一次扩增循环所使用的大肠杆菌 DNA 聚合酶在下一个扩增循环的高温下就变性了,因此在每一次冷热循环之后,都要加入新鲜的 DNA 聚合酶——大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段。其缺点是:① Klenow 酶不耐高温,90℃ 会变性失活;② 引物链在模板上的延伸反应是在 37℃ 下进行的,模板和引物之间容易发生碱基错配,因而特异性较差,合成的 DNA 片段不均一。因此,原始的 PCR 不但繁琐,而且价格昂贵。也正因为上述原因,那时 PCR 并没有显示出太大的商业应用价值,也没有引起生物医学界的足够重视。

1985 年春, Mullis 首次提出应该使用能够耐受 PCR 过程中 DNA 变性时的高温而不会导致 DNA 酶活性丧失的热稳定的聚合酶的想法,当时在全球主要有两个实验室从事嗜热菌的研究,一个在美国,一个在俄罗斯。后来他们在美国的那个研究所得分离自黄石国家公园温泉的嗜热菌 (*Thermus aquaticus*) 株。Mullis 虽然提出将 Taq DNA 聚合酶应用到 PCR 的建议,但并没有现成的商品制剂可用,必须自己分离纯化。但当时 Cetus 公司蛋白质化学研究人员都在忙于自己的工作,没有人帮他纯化,他自己又不愿意干。后来,公司不得不让其他人进

行该项工作,他们按照先前研究人员发表于1976年的《细菌学杂志》(Journal of Bacteriology)的步骤,3个星期就分离出纯化的 Taq DNA 聚合酶。1986年6月,Saiki 首次将其应用于 PCR,效果就好得惊人,可说是一战成功。Taq DNA 聚合酶具有以下特点:①耐高温。70℃下2h后,其仍会保留大于原来的90%的酶活性。93℃下2h后,残留活性是原来的60%。95℃下2h后,残留活性是原来的40%。因此,在通常的 PCR 中,不必每次扩增循环后加入新的酶。②由于延伸温度较高(通常为72℃),因而大大提高了扩增特异性、灵敏度和扩增效率,增加了扩增长度(2.0kb)。Taq DNA 聚合酶不但大大简化了 PCR 工作,同时专一性及活性都比之前使用的酶更强,至此,有关 PCR 应用的最大的“瓶颈”问题迎刃而解。再加上 PCR 仪的成功研制,此时的 PCR 展现了巨大的商业应用价值。

在有关 Taq DNA 聚合酶的论文1988年在《Science》上发表后,1989年12月《Science》杂志将 PCR 所使用的耐热的 DNA 聚合酶命名为第1个“年度分子”,该刊编辑 Koshland Jr. 和 Guyer 对 PCR 作了一个简明扼要的解释:PCR 的起始材料“靶序列”是 DNA 上的一个基因或片段。在几个小时内,该目标序列能被扩增超过100万倍。双链 DNA 分子的互补链经加热后解开。所谓引物就是两条很短的合成 DNA,它们分别与目标序列两端的特定序列互补。每个引物都与它的互补序列相结合,于是,聚合酶就能从引物处开始复制它的互补链,在非常短的时间内产生与靶序列完全相同的复制品。在后续的循环中,无论是起始 DNA 还是其复本的双链分子都被分开成单链,引物再次与其互补序列结合,聚合酶也再度复制模板 DNA。多次循环以后,样品中靶 DNA 序列的含量大大增加,经扩增后的遗传物质就能被用于进一步的分析研究。在完全用分子生物学技术术语描述了 PCR 以后,他们断言:“第一批有关 PCR 技术的论文发表于1985年。自那以后,PCR 已经发展成为日益强大和用途广泛的技术。1989年的 PCR“爆炸”,可以看作是方法论上的改良与优化,在 PCR 基本要素基础上的技术革新不断出现,越来越多科学家掌握了 PCR 技术。有了 PCR,极少量嵌入的或者遮蔽的遗传物质也能被扩增产生大量一般实验室都能得到的、可用于鉴定和分析的材料。”

## 第二节 PCR 的基本原理

下面我们来简单叙述一下 PCR 的基本原理:PCR 的基本过程类似于 DNA 的天然复制,特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。整个过程由变性—退火—延伸3个基本反应步骤构成:①模板 DNA 变性。模板或经 PCR 扩增形成的 DNA 经加热至94℃左右一定时间后,双链之间氢键断裂,双股螺旋解链,变成两条单链,以便它与引物结合,为下一轮反应做准备。②模板 DNA 与引物的退火(复性)。DNA 加热变性成单链后,当温度降至一定程度(55℃左右)时,引物即与模板 DNA 单链的互补序列配对结合。③引物的延伸(72℃)。在 Taq DNA 聚合酶的作用下,DNA 模板上的引物以 dNTP 为原料,按 A-T、C-G 碱基配对与半保留复制原则,合成一条新的与模板 DNA 链互补的链。重复上述变性—退火—延伸的循环过程,每一循环获得的“半保留复制链”都可成为下次循环的模板。通常,每完成一个循环需时2~4min,2~3h 就能将靶核酸扩增放大几百万倍。从图 1-1 中可知,在 PCR 的第1和第2个循环,并没有短的目的片段,只是在第3个循环后才有,并且部分双链的长片段将始终伴随整个扩增过程。

# 实时荧光 PCR 技术

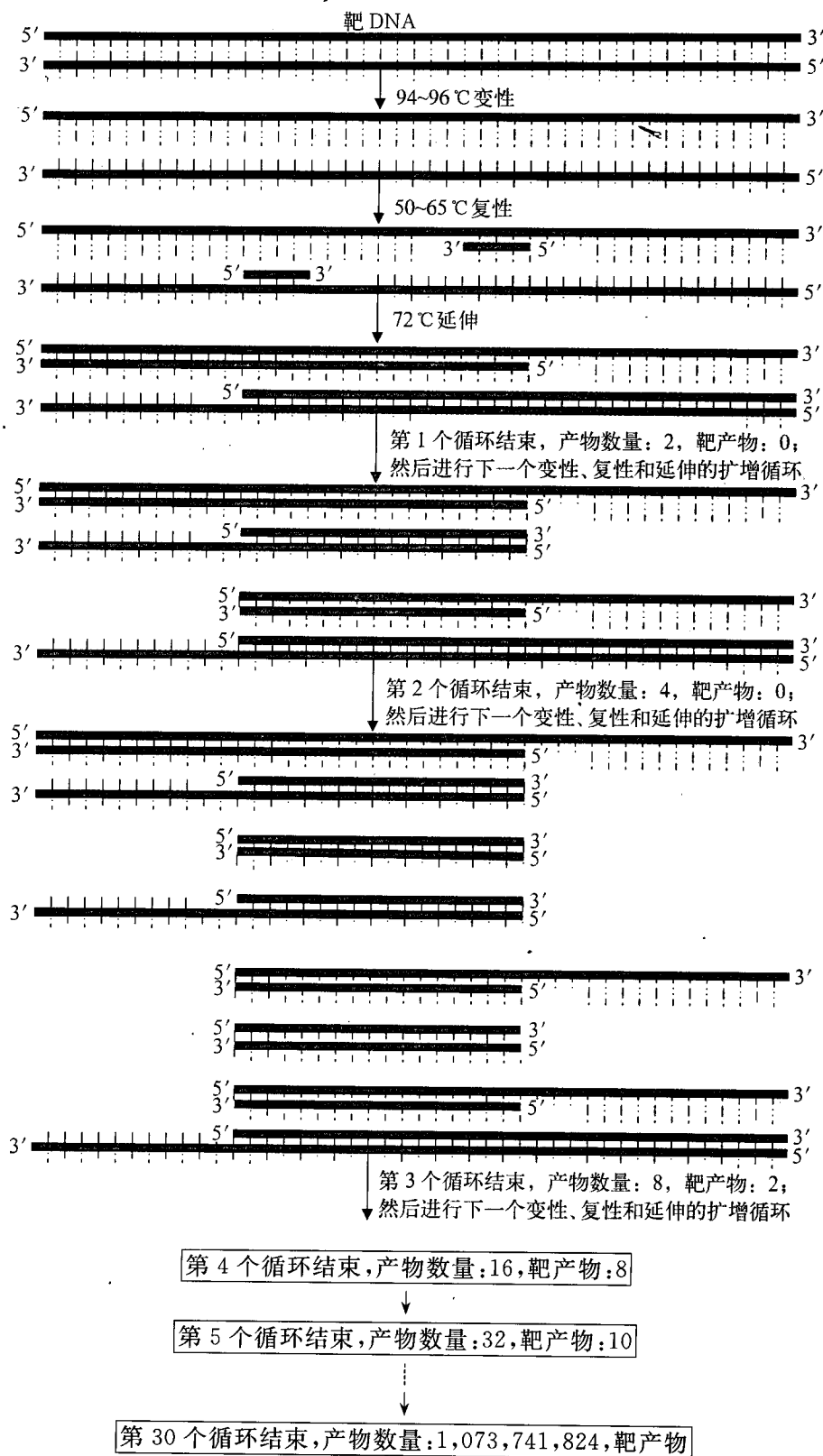


图 1-1 PCR 的基本原理



### 第三节 PCR 的反应动力学

上述 PCR 的 3 个反应步骤循环往复,使得特定长度的靶 DNA 数量呈指数上升。在理论上,终产物 DNA 的量可用  $Y_n = X \cdot 2^n$  计算。其中  $X$  为原始模板的数量, $Y_n$  为  $n$  循环后 DNA 片段终产物的拷贝数, $n$  为扩增循环数。但在实际扩增过程中,不可能达到理想状况下的 100% 扩增效率,因此,公式  $Y_n = X \cdot 2^n$  中 2 可以  $(1+E)$  来代替,而得到  $Y_n = X \cdot (1+E)^n$ ,  $E$  为平均扩增效率,理论值为 100%,亦即为 1,但在实际反应中平均效率达不到理论值。

扩增起始期,靶序列 DNA 片段的增加呈指数形式,但随着扩增产物的逐渐累积,其对扩增过程出现负作用,再加上酶的消耗疲劳,整个扩增将进入线性增长长期或平台期,此时,扩增产物不再呈指数增加,出现“停滞”(图 1-2)。

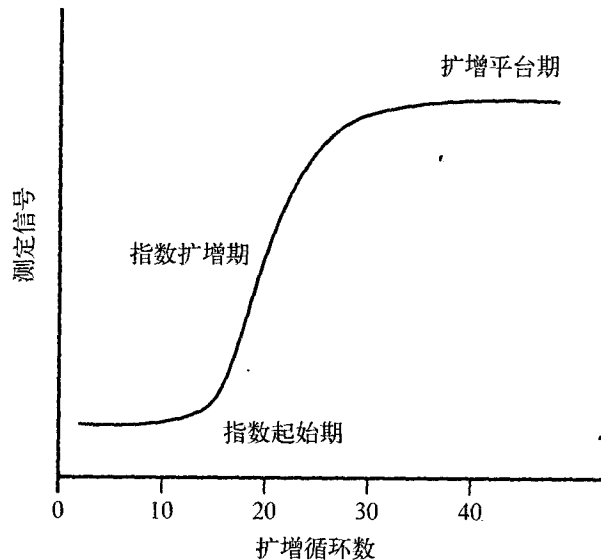


图 1-2 PCR 的反应动力学

### 第四节 PCR 扩增体系和扩增条件

#### 一、PCR 扩增体系

##### (一) 引物设计原则

一个完整的 PCR 扩增体系主要由引物、酶、dNTP、模板和  $Mg^{2+}$  等基本要素所组成。

引物不但决定了 PCR 扩增片段的长短,而且也是 PCR 扩增特异性的关键,要保证 PCR 扩增的特异性,引物一定要与模板 DNA 具有完全的互补性。理论上,任何模板 DNA,只要其核苷酸序列是已知的,就能按其序列设计合成一定长度的互补寡核苷酸链做引物,从而将特定长短的靶 DNA 在体外大量扩增。