

实时荧光PCR技术

· 第2版 ·

主 编 李金明



科学出版社

实时荧光 PCR 技术

(第 2 版)

主 编 李金明
编 者 (以姓氏笔画为序)

王 静	王国婧	李金明
李禹龙	李建英	汪 维
宋利琼	张 栋	张 括
张 瑞	张 蕾	林贵高
韩彦熙	霍 虹	



科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书在第1版基础上修订而成,分34章,系统阐述了实时荧光PCR技术的基础理论和临床检测方法,包括临床PCR技术的发展历史及趋势,实时荧光PCR技术的基本原理和方法,临床PCR实验室的设计及质量管理体系的建立,临床PCR检验标本的采集、运送、保存及核酸提取,实时荧光PCR测定的数据处理,实时荧光PCR仪及其发展,临床PCR检验仪器设备的使用、维护和校准,临床PCR检验的质量保证,病毒核酸检测的标准物质及其应用,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、严重急性呼吸综合征冠状病毒、EB病毒、流感病毒、风疹病毒、麻疹病毒、手足口病病原体、埃博拉病毒、中东呼吸综合征冠状病毒、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检测及临床意义、EGFR基因、KRAS基因、BRAF基因、PIK3CA基因等实时荧光PCR检测及临床意义。

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。

图书在版编目(CIP)数据

实时荧光PCR技术/李金明主编.—2版.—北京:科学出版社,2016.9

ISBN 978-7-03-049827-4

I. 实… II. 李… III. 聚合酶链式反应 IV. Q555

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第214922号

责任编辑:杨磊石 车宜平 / 责任校对:张怡君

责任印制:赵 博 / 封面设计:龙 岩

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>

中国科学院印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2007年11月第 一 版 由人民军医出版社出版

2016年 9月第 二 版 开本:787×1092 1/16

2016年 9月第十七次印刷 印张:32

字数:742 000

定价:118.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

主编简介

李金明,医学博士。国家卫生计生委(原卫生部)临床检验中心副主任,兼临床免疫室主任,研究员,中国医学科学院北京协和医学院和北京大学医学部博士研究生导师。2006年获国务院政府特殊津贴,获2009—2010年度国家卫生部“有突出贡献中青年专家”称号。自20世纪90年代中期以来,在国内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年分别获得了我国第一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标准化。以项目负责人先后承担国家自然科学基金课题5项,“863”课题1项,传染病重大专项课题1项,首都医学发展科研基金课题2项。以分课题负责人参与国家及国际合作研究课题10多项。在学术期刊上以第一作者和通讯作者发表论文160多篇,其中SCI论文90余篇。个人编著出版了《临床酶免疫测定技术》(人民军医出版社,2005),主编《临床基因扩增检验技术》(人民卫生出版社,2002,共同主编)、《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主编)、《个体化医疗中的临床分子诊断》(人民卫生出版社,2013)、《临床免疫学检验技术》(全国高等院校本科教材,人民卫生出版社,2015)、《全国临床检验操作规程》(第4版)(人民卫生出版社,2015,临床免疫检验共同主编),参编其他专著和教材十余部。所主持和主参的项目分获北京市科技进步二等奖1次,三等奖2次。

再版前言

《实时荧光 PCR 技术》自 2007 年由人民军医出版社出版以来,承蒙全国在临床一线从事基因扩增检验及试剂研发的同道的青睐,已 16 次印刷共 21 000 册。近 10 年来,实时荧光 PCR 技术因为其检测快速、灵敏,以及不易出现产物污染,作为准确的核酸定量检测方法自不必说,也是很好的核酸和基因突变定性检测方法,因此其临床应用越来越广,从病原体的核酸定量检测、基因分型,扩展到肿瘤基因突变、遗传病等人的基因检测,而且,基于荧光共振能量转移原理的实时荧光 PCR 技术,其有多种多样的探针及引物的设计模式来实现靶标的精准检测。为适应新的发展需要,第 2 版在第 1 版的基础上,对原有的一些章节内容进行了更新,同时增加了手足口、麻疹、风疹、登革热、埃博拉、MERS 等病毒核酸检测,以及 EGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA 基因突变检测等章。此外,更正了第 1 版中的一些印刷错误内容,但因为能力所限,缺点错误仍然难免,敬请同道们批评指正,以便第 3 版时更正。

李金明

2016 年 3 月 8 日

第 1 版前言

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,并在某些方面几乎是难以替代。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。但像任何一件自然界的事物一样,PCR 有其无可比拟的优点,但也有因其优点而来的一定的弱点,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 技术本身问题所致的错误的检验结果。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力的论文,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要是准确和及时的。要做到这一点,就必须要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,可造成假阴性结果的出现。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。

为防止假阳性结果,实验室首先要有严格的分区,可根据所采用的具体 PCR 技术而分为试剂准备区、标本制备区、扩增区和产物分析区等三至四个区,同时,各区的物品如工作服、试管架、加样器、记号笔乃至实验记录本等都不得混用。为监测实验过程中标本之间交叉污染的发现,除了在移液时使用带滤芯的吸头外,还应有一定数量的阴性质控样本,这些阴性质控样本应与临床标本一起同时处理,并适当散在分布于不同的标本之间,从而最大限度地监测出操作过程中污染的发生。

假阴性结果通常是由于临床标本核酸提取过程中靶核酸的丢失和提取试剂如有机溶剂等的残留、标本中抑制物的去除不彻底、扩增仪孔间温度的差异等所致。避免假阴性结果最有效的措施是设立“内标”(internal control, IC)。用于假阴性质控的内标一般为竞争性内标,即所用引物序列、扩增片段长短、片段的 G% + C% 等均与待扩增检测靶序列相同或尽可能相近,所不同的是,在片段内通过突变、缺失或插入等方式使内标与靶序列之间可使用电泳、层析或探针杂交的方法加以区分。如果一加有内标的反应管内,内标没有出现扩增,标本检测亦为阴性,则很可能为假阴性,此时,需要采取进一步的措施如重新进行核酸提取、重新校准仪器孔内温度或稀释标本等重新扩增检测标本。反之,则为真阴性。

由于 PCR 方法扩增检测的是核酸,在临床病原体检测中,还要注意“临床假阳性”问题。

“临床假阳性”就是患者临床症状已消失,但 PCR 检测仍为阳性的现象。如淋球菌感染患者用抗生素治疗后,尽管淋菌球已被杀死,患者症状消失,但由于泌尿生殖道分泌物仍有死的细菌存在,故 PCR 仍可为阳性,此为“临床假阳性”,即细菌已杀死,但 PCR 仍为阳性,与临床症状不符。因此,在采用 PCR 方法检测细菌感染时,为避免临床上的假阳性,应在应用抗生素治疗一个疗程结束 2 周后,才能使用 PCR 方法检测。

此外,在使用 PCR 方法定量检测病毒核酸监测患者抗病毒治疗效果时,不能以两三次检测结果为依据,要考虑到 PCR 方法得到的结果有一定的正常波动范围,目前国内应用最广的实时荧光 PCR 方法,结果的波动在一个数量级属于没有改变。正确的做法是,在一个较长时间的治疗周期,定期(每月或两个月一次)检测,动态观察其变化趋势,从较高浓度如 10^8 拷贝/毫升降至较低浓度 10^4 拷贝/毫升,并持续稳定在低水平,则说明治疗有效。

综上所述,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,其得到极大的检测灵敏度,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严重后果的时候,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,当作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。

在本书的完成过程中,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 检验工作的认真态度,促使我努力去完成本书的撰写。感谢本室同事们的鼓励和支持,感谢研究生们在一些资料的收集和序列的查阅比对。

由于本人水平有限,书中肯定存在不足或错误,敬请全国同道提出批评指正,以便于本书再版时更正。

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)	荧光 PCR 的基本原理 (19)
第一节 PCR 的起源和耐热 DNA 聚合酶的应用..... (1)	五、双杂交探针实时荧光 PCR 的基本原理..... (20)
一、PCR 的起源 (1)	六、分子信标实时荧光 PCR 的基本原理..... (20)
二、耐热 DNA 聚合酶的应用 (2)	七、蝎形探针实时荧光 PCR 的基本原理..... (21)
第二节 PCR 的基本原理 (3)	八、数字实时荧光 PCR 的基本原理..... (24)
第三节 PCR 的反应动力学 (5)	第三节 引物、探针的特点及设计软件 (26)
第四节 PCR 的扩增体系和扩增条件..... (5)	一、引物的特点..... (26)
一、PCR 扩增体系的基本要素 (5)	二、探针的特点..... (26)
二、PCR 的标准扩增体系 (8)	三、引物和探针设计软件..... (27)
三、PCR 扩增的增强剂 (9)	第四节 多重实时荧光 PCR (28)
四、降落 PCR (9)	参考文献 (28)
五、热启动 PCR (10)	第 3 章 临床 PCR 实验室的设计及质量管理体系的建立 (30)
六、COLD-PCR (10)	第一节 实验室的分区规划设计 (30)
七、PCR 扩增结果分析 (11)	一、标本的接收..... (30)
第五节 PCR 的特点 (12)	二、实验室分区设计的一般原则及工作流程..... (31)
一、高特异性..... (12)	第二节 实验室质量管理体系的建立 (39)
二、高灵敏度..... (12)	一、实验室质量管理概述..... (39)
三、简便快速..... (12)	二、实验室质量管理的特点..... (41)
四、特定的低纯度标本也可使用..... (12)	三、质量体系文件的编写..... (42)
第六节 PCR 的发展 (12)	第三节 实验室的记录管理 (56)
参考文献 (13)	一、记录的种类..... (56)
第 2 章 实时荧光 PCR 技术的基本原理和方法 (14)	二、记录的标识..... (56)
第一节 发展历程 (14)	三、记录的填写..... (57)
第二节 基本原理 (15)	四、记录的封面和目录..... (59)
一、PCR 扩增的理论模式 (15)	五、记录的良好保存..... (59)
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	

六、记录的保存期限.....	(59)	第 5 章 实时荧光 PCR 测定的数据	
七、过期记录的处理.....	(59)	处理	(83)
八、记录表格样式的持续改进.....	(59)	第一节 基本概念	(83)
九、电子记录的管理.....	(60)	第二节 实时荧光 PCR 外标绝对	
第四节 实验室验收与实验室认		定量的数学模型	(85)
可	(60)	一、基本计算公式的推导.....	(85)
一、实验室认可的由来及目的.....	(60)	二、纵坐标为起始拷贝数对数值	
二、实验室认可与认证的区别.....	(61)	横坐标为 C_t 时的数学模型.....	(85)
三、实验室验收与实验室认可的		三、纵坐标为 C_t 横坐标为起始拷	
关系.....	(61)	贝数时的数学模型.....	(86)
参考文献	(62)	第三节 实时荧光 PCR 相对定量	
第 4 章 临床 PCR 检验标本的采集、		的数学模型	(87)
运送、保存及核酸提取.....	(63)	一、相对定量的标准曲线法.....	(87)
第一节 标本采集、运送、保存	(63)	二、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法	(89)
一、标本采集.....	(63)	三、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的改良方法	(89)
二、标本运送.....	(65)	四、多重 PCR 法	(91)
三、标本保存.....	(65)	第四节 用曲线拟合的方法进行数	
第二节 常见临床标本的处理和保		据处理	(92)
存	(66)	一、Liu 与 Saint 的方法	(92)
一、血清(浆)样本.....	(66)	二、Ramakers 等的方法	(92)
二、全血样本.....	(66)	三、Tichopad 等的方法	(92)
三、外周血单个核细胞.....	(66)	参考文献	(93)
四、痰.....	(66)	第 6 章 实时荧光 PCR 仪及其发展	
五、棉拭子.....	(67)	(94)
六、脓液.....	(67)	第一节 PCR 仪的发展历史及基本	
七、体液.....	(68)	原理	(94)
八、乳汁.....	(68)	一、空气驱动循环 PCR 仪	(94)
九、组织.....	(69)	二、变温金属块 PCR 仪	(95)
第三节 临床标本中 PCR 抑制物		第二节 实时荧光 PCR 仪简介.....	(95)
.....	(70)	一、美国 ABI 公司生产的实时荧光	
一、临床标本中 PCR 抑制物的来源		PCR 仪	(95)
及作用机制.....	(70)	二、美国 Cepheid 公司的 Smart	
二、几种常见抑制物的作用机制及		Cycler 实时荧光 PCR 仪	(98)
对策.....	(70)	三、美国 Bio-Rad 公司的实时荧光	
第四节 核酸的提取方法	(72)	PCR 仪	(99)
一、DNA 提取的经典方法	(72)	四、美国 Stratagene 公司的实时	
二、RNA 的提取	(73)	荧光 PCR 仪.....	(100)
三、核酸提取的改良方法.....	(74)	五、Roche 公司的 LightCycler 实时	
参考文献	(78)	荧光 PCR 仪.....	(101)

六、Corbert 的 RotorGene 实时 荧光 PCR 仪..... (103)	一、微量加样器的一般原理及分类 (122)
七、Eppendorf 公司的 Mastercycler ep realplex 实时荧光 PCR 仪 (104)	二、加样器的选择及使用 (123)
第三节 实时荧光 PCR 仪选择 ... (104)	三、加样器的维护和校准 (129)
一、仪器使用的广泛程度 (104)	参考文献..... (133)
二、工作量 (104)	第 8 章 临床 PCR 检验的质量保证 (134)
三、耗材的开放性 (105)	第一节 概述..... (134)
四、硬件设计特点 (105)	一、基本概念 (134)
五、检测通道和可检测的荧光染 料 (105)	二、质量保证、室内质量控制和室间 质量评价之间的关系 (136)
六、温度梯度功能 (105)	三、标本采集、运送、保存及其质量 控制 (136)
七、软件功能 (105)	第二节 室内质量控制..... (137)
第四节 数字 PCR 仪简介 (106)	一、测定前质量控制 (137)
一、微流控芯片数字 PCR (107)	二、核酸样本的制备、扩增检测及 其质量控制 (144)
二、液滴数字 PCR (107)	三、统计学质量控制 (146)
第五节 实时荧光 PCR 仪的使用、 维护和校准..... (108)	第三节 室间质量评价..... (160)
一、实时荧光 PCR 仪使用中的注 意事项 (108)	一、室间质量评价的程序设计 ... (161)
二、维护和校准 (108)	二、室间质量评价的局限性 (164)
参考文献..... (111)	参考文献..... (165)
第 7 章 临床 PCR 检验仪器设备的使用、 维护和校准 (112)	第 9 章 病毒核酸检测的标准物质及 其应用 (167)
第一节 天平..... (112)	第一节 概述..... (167)
一、电子分析天平及其分类 (112)	一、基本概念 (167)
二、天平的正确使用 (113)	二、病毒核酸检测用标准物质的 种类和溯源关系 (169)
三、天平的选择 (114)	第二节 病毒核酸检测用标准物质的 制备..... (170)
四、天平的维护和校准 (114)	一、原材料的选择和分装 (171)
第二节 离心机..... (115)	二、均匀性和稳定性 (172)
一、离心机离心的基本原理 (115)	三、定值 (174)
二、离心力和相对离心力 (116)	四、标准物质的保存 (175)
三、离心时间 (116)	五、核酸检测用标准物质的意义 (175)
四、离心转子的选择 (119)	六、核酸检测用标准物质的展望 (176)
五、离心管 (119)	参考文献..... (179)
六、离心机的分类 (119)	
七、离心机的使用和维护 (120)	
第三节 微量加样器..... (122)	

第 10 章 甲型肝炎病毒实时荧光 PCR	
检测及临床意义	(182)
一、HAV 的特点	(182)
二、HAV RNA 实时荧光 RT-PCR	
检测	(182)
三、HAV RNA 检测的临床意义	
.....	(185)
参考文献	(186)
第 11 章 乙型肝炎病毒实时荧光 PCR	
检测及临床意义	(187)
一、HBV 的特点.....	(187)
二、HBV DNA 实时荧光 PCR 测定	
.....	(190)
三、HBV 变异的检测及其临床意义	
.....	(196)
四、HBV cccDNA 的检测及其临床	
意义	(200)
五、HBV 基因型的检测及其临床	
意义	(201)
六、HBV RNA 的检测及其临床	
意义	(204)
七、HBV 全基因组测定及其临床	
意义	(205)
参考文献	(206)
第 12 章 丙型肝炎病毒实时荧光 RT-PCR 检测及临床意义	(210)
一、HCV 的形态和基因组结构特点	
.....	(210)
二、HCV 的复制特点	(211)
三、HCV 的变异特点及基因型	
.....	(211)
四、HCV RNA 实时荧光 RT-PCR	
测定	(212)
五、HCV 基因分型检测及其临床	
意义	(220)
参考文献	(223)
第 13 章 人免疫缺陷病毒-1 实时荧光 RT-PCR 检测及临床意义	
.....	(226)
一、HIV-1 的特点	(226)
二、HIV-1 RNA 的实时荧光 RT-PCR 测定	(227)
三、HIV-1 RNA 测定的临床意义	
.....	(234)
参考文献	(235)
第 14 章 人乳头瘤病毒实时荧光 PCR 检测及临床意义	(237)
一、HPV 的形态和基因结构特点	
.....	(237)
二、HPV 的体内复制特点.....	(239)
三、病毒的变异特点	(239)
四、HPV 基因型.....	(240)
五、HPV DNA 的实时荧光 PCR	
测定	(240)
六、HPV DNA 检测的临床意义	
.....	(248)
参考文献	(250)
第 15 章 巨细胞病毒实时荧光 PCR 检测及临床意义	(253)
一、人类巨细胞病毒的特点	(253)
二、人类巨细胞病毒实时荧光 PCR	
测定	(254)
三、巨细胞病毒 PCR 检测的临床	
意义	(267)
参考文献	(268)
第 16 章 严重急性呼吸综合征冠状病毒实时荧光 RT-PCR 检测及临床意义	(269)
一、SARS-CoV 的特点	(269)
二、SARS-CoV RNA 实时荧光	
RT-PCR 检测	(270)
三、SARS-CoV PCR 检测的临床	
意义	(286)
参考文献	(286)
第 17 章 EB 病毒实时荧光 PCR 检测及临床意义	(288)
一、EB 病毒的特点	(288)
二、EB 病毒实时荧光 PCR 测定	(289)

三、EB 病毒 PCR 检测的临床意义 (294)	四、手足口病病原体检测及其临床 意义 (349)
参考文献..... (295)	参考文献..... (349)
第 18 章 流感病毒实时荧光 RT-PCR 检测及临床意义 (296)	第 22 章 埃博拉病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测及临床意义 (351)
一、流感病毒的特点 (296)	一、EBOV 的形态和基因组结构特点 (351)
二、流感病毒的实时荧光 RT-PCR 测定 (298)	二、EBOV 的基因分型 (352)
三、流感病毒 RT-PCR 检测的临床 意义 (320)	三、EBOV RNA 实时荧光 RT-PCR 测定及其临床意义 (352)
参考文献..... (320)	参考文献..... (360)
第 19 章 风疹病毒实时荧光 RT-PCR 检测及临床意义 (321)	第 23 章 中东呼吸综合征冠状病毒 实时荧光 RT-PCR 检测及 临床意义 (361)
一、风疹病毒的形态和基因组结构 及功能特点 (321)	一、MERS-CoV 的形态和基因组 结构特点 (361)
二、风疹病毒的复制特点 (322)	二、MERS-CoV 的感染过程 (362)
三、风疹病毒的变异特点及基因 型 (323)	三、MERS-CoV RNA 实时荧光 RT-PCR 测定及其临床意义 (363)
四、风疹病毒实时荧光 RT-PCR 测定及其临床意义 (323)	参考文献..... (379)
参考文献..... (330)	
第 20 章 麻疹病毒实时荧光 RT-PCR 检测及临床意义 (332)	第 24 章 沙眼衣原体实时荧光 PCR 检测及临床意义 (381)
一、麻疹病毒的形态和基因组结 构及功能特点 (332)	一、沙眼衣原体的形态和基因组结 构特点 (381)
二、麻疹病毒的复制特点 (334)	二、沙眼衣原体的实时荧光 PCR 测定 (381)
三、麻疹病毒的变异特点及基因 型 (335)	三、沙眼衣原体 PCR 检测的临床 意义 (391)
四、麻疹病毒实时荧光 RT-PCR 测定及其临床意义 (335)	参考文献..... (391)
参考文献..... (339)	
第 21 章 手足口病病原体实时荧光 RT-PCR 检测及临床意义 (341)	第 25 章 结核杆菌实时荧光 PCR 检测 及临床意义 (394)
一、手足口病病原体的形态和基因 组结构特点 (341)	一、结核杆菌的特点 (394)
二、手足口病病原体复制特点 ... (341)	二、结核杆菌实时荧光 PCR 检测 (395)
三、手足口病病原体实时荧光 RT- PCR 测定及其临床意义 (342)	三、结核杆菌 PCR 检测的临床意义 (405)
	参考文献..... (406)

第 26 章 淋病奈瑟菌实时荧光 PCR	
检测及临床意义	(407)
一、淋病奈瑟菌的特点	(407)
二、淋病奈瑟菌实时荧光 PCR 测定	(408)
三、淋病奈瑟菌 PCR 检测的临床意义	(418)
参考文献	(419)
第 27 章 幽门螺杆菌实时荧光 PCR	
检测及临床意义	(420)
一、幽门螺杆菌的特点	(420)
二、幽门螺杆菌实时荧光 PCR 测定	(421)
三、幽门螺杆菌 PCR 检测的临床意义	(430)
参考文献	(430)
第 28 章 肺炎支原体实时荧光 PCR	
检测及临床意义	(432)
一、肺炎支原体的结构特点	(432)
二、肺炎支原体的实时荧光 PCR 检测	(432)
三、肺炎支原体 PCR 检测的临床意义	(437)
参考文献	(437)
第 29 章 刚地弓形虫实时荧光 PCR	
检测及临床意义	(438)
一、刚地弓形虫的特点	(438)
二、刚地弓形虫的实时荧光 PCR 检测	(439)
三、刚地弓形虫 PCR 检测的临床意义	(444)
参考文献	(444)
第 30 章 解脲支原体实时荧光 PCR	
检测及临床意义	(446)
一、解脲支原体的特点	(446)
二、解脲支原体实时荧光 PCR 检测	(446)
三、解脲支原体 PCR 检测的临床意义	(451)
参考文献	(452)
第 31 章 EGFR 基因实时荧光 PCR 检测及临床意义	(453)
一、EGFR 基因特点及常见突变类型	(453)
二、相关靶向治疗药物	(454)
三、EGFR 基因突变实时荧光 PCR 测定及其临床意义	(455)
参考文献	(463)
第 32 章 KRAS 基因实时荧光 PCR 检测及临床意义	(466)
一、KRAS 基因特点及常见突变类型	(466)
二、KRAS 基因突变实时荧光 PCR 测定及其临床意义	(466)
参考文献	(477)
第 33 章 BRAF 基因突变的实时荧光 PCR 检测及临床意义	(479)
一、BRAF 的基因组结构特点	(479)
二、BRAF 基因突变实时荧光 PCR 测定及其临床意义	(480)
参考文献	(484)
第 34 章 PIK3CA 基因突变实时荧光 PCR 检测及临床意义	(486)
一、PIK3CA 的基因结构特点	(486)
二、PIK3CA 基因突变实时荧光 PCR 测定及其临床意义	(487)
参考文献	(497)

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,翻译过来,称为聚合酶链反应。最早也有人将其翻译为多聚酶链反应,但现已统一起来。PCR 自 1983 年发明至今,虽只短短的 30 多年,但其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,认为其对生命科学研究来说,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

眼玩意。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已初步完成,就是 2003 年的严重急性呼吸综合征(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,最早的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埃希菌的 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质为目标的基因工程技术在全世界风行开来,成立于 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,每管中的四种核苷酸合成原料 dATP、dTTP、dCTP 和 dGTP 中分别有一种为放射性核素标记的双脱氧核苷酸即 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,常有各种奇思妙想,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,他就想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,而不加入其他三种 dNTP,如在引物 3' 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、离心等操作,在所制备的模板溶液中,常有脱落的游离 dNTP 存在。于是, Mullis 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 不就增加了一倍了吗,如果再来一次,又会增加一倍,循环往复,而有一种指数增加过程。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 确实是非常简单的一个“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诞生的,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地出现在人们面前。

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 聚合酶的纯化获得。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埃希菌 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——大肠埃希菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段。其缺点是:①Klenow 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 不但烦琐,而且价格昂贵。因此,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,他们按着先前研究人员发表于1976年的《细菌学杂志》(*Journal of Bacteriology*)的步骤,三周就分离出纯化的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℃以下2h后,其仍会保留大于原来的90%的酶活性。93℃以下2h后,残留活性是原来的60%。95℃以下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TaqDNA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聚合酶命名为第一个“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—延伸三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:在TaqDNA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。从图中可知,在PCR的第一和第二个循环,并没有短的目的片段,只是在第三个循环后才有,并且部分双链的长片段将始终伴随整个扩增过程(图1-1)。

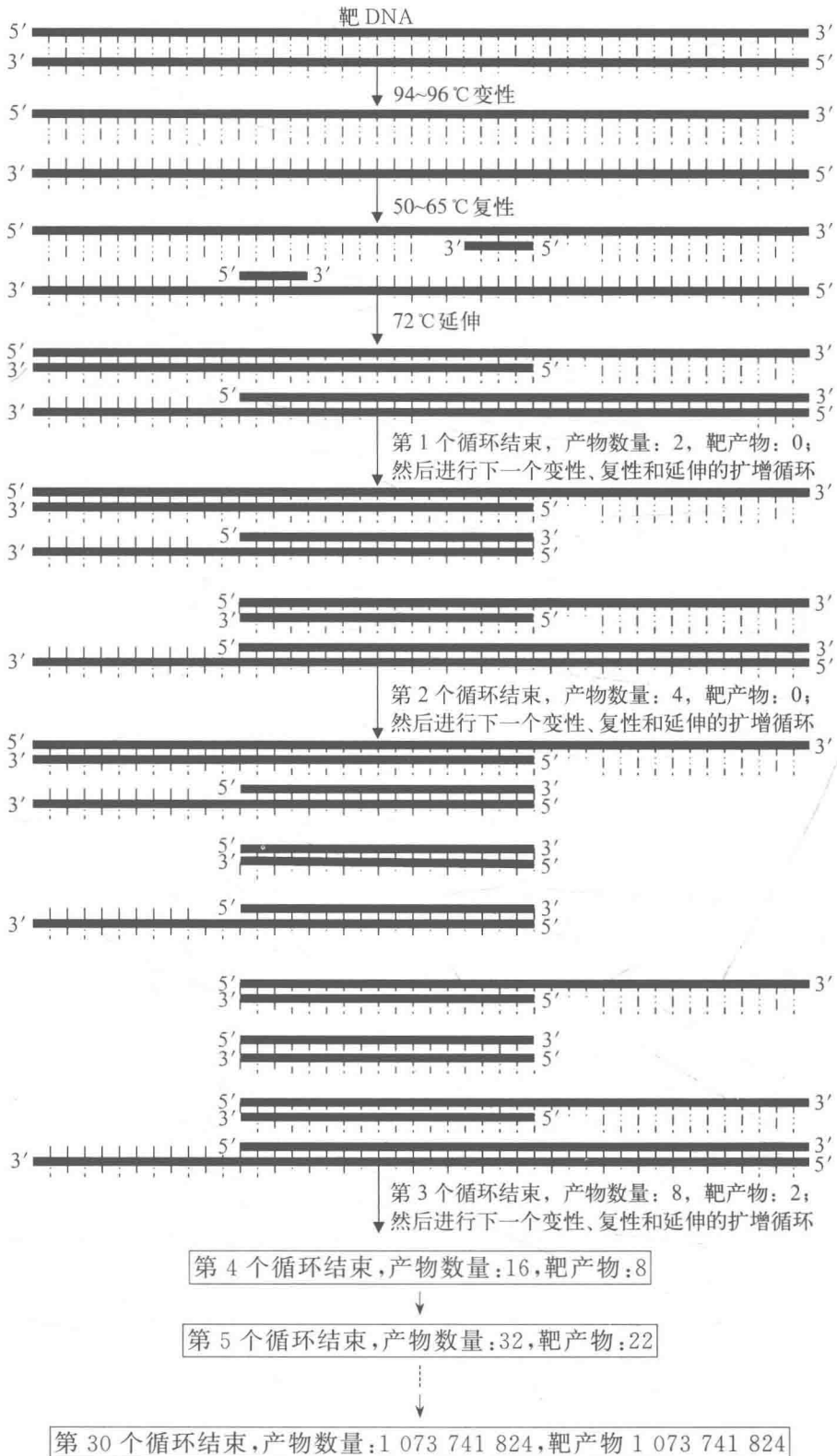


图 1-1 PCR 的基本原理