

PCR 技术



華美生物工程公司

SINO-AMERICAN BIOTECHNOLOGY COMPANY

PCR 技术



華美生物工程公司

SINO-AMERICAN BIOTECHNOLOGY COMPANY

编者的话

PCR 技术是 85 年美国 Cetus 公司开发的一项专利技术,是八十年代分子生物学领域的一项革命性突破,被誉为分子生物学发展史上的又一里程碑。一经问世在国际上引起了极大反响,同时,也迅速在我国推广开来。为了帮助中国分子生物学、医学、法医学等相关领域的科技工作者了解国际上 PCR 技术的发展动态,全面系统地掌握 PCR 技术;更好地为在国内开展 PCR 技术服务,华美生物工程公司市场部主持编译了《PCR 技术》一书。《PCR 技术》主要根据 Henry A. Erlich 主编的《PCR Technology》编译而成,另外简要介绍了华美生物工程公司几年来在促进 PCR 技术在国内开展所作的工作及相关产品介绍。全书正文分为三部分,一. 基础方法学;二. 科研应用;三. 医学应用。全书系统地介绍了 PCR 技术的原理方法及应用。每一部分均有简介,某些章节提供了详细的实验方法,列出了最佳“PCR 反应体系”,而有些章节只提供了特定领域的概况。文中还引用了美国各领域的最新报道。希望这本书能为我国从事 PCR 研究及应用的科技人员提供有益借鉴,能为赶超世界先进技术做出点滴贡献。《PCR 技术》一书能顺利与读者见面与广大科技人员的关怀鼓励、与公司各部门支持配合、与市场部全体人员的辛勤忘我的工作分不开。特别要提到的是,国际杰出的青年科学家——北京大学著名青年教授陈章良先生百忙中为本书作序,王璋瑜、李思经、李建良、刘宏迪、黄少华、刘力丽、何淳、谭洁参加了艰苦的翻译工作,付出了辛勤劳动和汗水,本公司刘力丽、高亚胜、杨国翠、宋之和、季敬民、戴克在审校中给予了大力支持与协作,在此表示衷心感谢。

华美生物工程公司市场部

序

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR), 利用 DNA 聚合酶依赖于 DNA 模板的特性, 模仿体内的复制过程, 在附加的一对引物之间诱发聚合酶反应。PCR 技术自 1985 年诞生以来, 在短短的数年时间内得到了迅速发展, 并日臻完善。该技术在分子生物学、医学、生物工程、法医学、考古学等领域中都有重要的实际应用价值, 并且对已建立的基因克隆、DNA 序列分析等现代分子生物学技术的发展也起了巨大的推动作用。

常规的方法分离目的基因, 需要先建立基因文库, 然后从文库中筛选, 一个熟练的研究人员往往需要数月时间, 费时费力、代价高。而利用 PCR 技术, 一个初学者只要稍加训练, 在一两周内便可完成。我们实验室利用 PCR 技术, 在不到一年时间内, 成功地克隆了 SMVcp、PVYcp、TMVcp、TMV 54KD 蛋白、PRVcp、RDV 基因组 10 号片段、天花粉蛋白、Btk 毒素蛋白、GA 合成酶、抗菌肽等十多种病毒、细菌、植物的基因。并且利用适当的合成引物, 对上述基因的两端进行了修饰, 使之有利于表达。如此大量的工作, 采用常规的方法是难以做到的。

PCR 技术除可作为上述基因分离、克隆的有效手段外, 还可直接用于 DNA 序列分析, 直接从基因组或克隆片段中制备测序模板, 比目前的细胞依赖性 DNA 扩增方法更为有效, 完全避免了细菌培养、模板提取这些重复性操作。

除常规 PCR 之外, 近来又发展出了诸如不对称 PCR、复合 PCR、反向 PCR 等适合不同目的要求的基因体外扩增方法。随着 PCR 技术的不断发展, PCR 技术会得到更广泛的应用。

华美生物工程公司是我国第一家生产、经销各类分子生物学试剂、器材的中外合资企业。该公司以产品质量可靠、服务优良深得我国分子生物学研究者的称道, 为我国分子生物学的发展、分子生物学技术的普及发挥了巨大的作用。更为难能可贵的是, 该公司还编辑出版了一系列分子生物学研究方法丛书, 这本系统介绍 PCR 技术原理、方法及其应用的译著便是其中之一。它的出版, 必将进一步促进 PCR 技术在我国的应用, 有助于我国分子生物学及其他相关学科研究工作的发展。

北京大学 陈章良

1991 年 10 月

目 录

第一部分 基础方法学	1
第一章 聚合酶链反应的设计和优化	5
第二章 Taq DNA 聚合酶	13
第三章 PCR 自动化	18
第四章 聚合酶链反应样品的简捷制备	23
第二部份 科研应用	29
第五章 体外扩增 DNA 的直接序列分析	33
第六章 PCR 技术在 DNA 工程中的应用	46
第七章 用 PCR、GC-发夹及变性梯度 凝胶电泳检测突变	54
第八章 基因表达的检测	67
第九章 用 PCR 扩增 cDNA 库中的特异序列	74
第十章 反向聚合酶链反应	79
第十一章 Alu PCR: 用重复序列引物扩增 来源复杂的人 DNA	84
第十二章 构建遗传图谱的新方法: 个体配子 DNA 序列的 PCR 分析	88
第十三章 PCR 用于进化分析	101
第三部分 PCR 技术在医学中的应用	109
第十四章 应用 PCR 技术诊断单基因疾病	111
第十五章 应用 PCR 技术诊断新突变疾病	125
第十六章 HLA II 型基因多态性: DNA 分型、进化、与疾病易患性的关系	142
第十七章 应用 PCR 技术进行生物学证据的鉴定	156
第十八章 用 PCR 法检测 ras 癌基因	168
第十九章 用 PCR 检测人类传染性疾	175
附录 1	183
附录 2	184
附录 3	185
附录 4	191
附录 5	193

第一部分 基础方法学

在分子生物学发展的短暂历史中,新技术的出现(如 Southern 印迹、分子克隆、脉冲场凝胶电泳)不断改变着我们解决基础生物学和应用生物学问题的方式。聚合酶链反应(PCR)使扩增 DNA 特异性片段成为可能,就代表了这样一种变化。PCR 是一种利用两种与相反链杂交并附着于靶 DNA 两侧的寡核苷酸引物经酶促合成特异的 DNA 片段的体外方法。包括模板变性、引物退火、及用 DNA 聚合酶延伸退火引物在内的重复循环系列,使末端被引物 5' 端限定的特异性片段成指数形式累积。由于在每一循环中合成的引物延伸产物可作为下一循环中的模板,因而每次循环中靶 DNA 的拷贝数几乎呈几何级数增长。因此,20 次 PCR 循环将产生约一百万倍(2^{20})的扩增产物。这种由 Kary Mullis^[1,2]发现的方法最早被 Cetus 的人类遗传学部(Human Genetics Department)的一个小组采用,他们将这一方法应用于人 β -珠蛋白 DNA 的扩增及镰刀形红细胞贫血病的产前诊断^[3,4,5]。

最初的 PCR 是用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段延伸退火引物的。该酶耐热性差,在每次 PCR 循环开始时被分开两条 DNA 链所需的高温失活,因而必须在每次 PCR 循环中加入新鲜酶。采用从 *Thermus aquaticus* 中提取的热稳定 DNA 聚合酶 (Taq 聚合酶)(见第 2 章),使 PCR 变为一种简便、快速的反应,现已可用热循环设备自动进行(见第 3 章)。反应时将全部反应成份(模板、引物、Taq 聚合酶、dNTP 及缓冲液等)一并放在反应管中,经简单的温度循环即可完成扩增反应^[6]。在第一章中将要讨论改变反应参数(如酶、引物和 Mg^{++} 浓度、及温度循环方式)对扩增专一性及产量的影响。虽然对任何给定的寡核苷酸引物对都可以建立确定的最适反应条件,但不存在能适合于所有反应的某一组单一条件。

用凝胶电泳来判断靶片段相对于其它产物的产量,是对 PCR 专一性进行分析的常用方法。另一影响 PCR 产物匀一性的因素是基因组模板中靶序列的浓度^[6]。在用 β -珠蛋白引物扩增正常基因组 DNA (带有两个 β -珠蛋白基因/细胞)及 β -珠蛋白纯合缺失的基因组 DNA 的实验中揭示了上述影响效果^[6]。利用正常基因组模板时,该反应生成单一的 β -珠蛋白片段,且检测不到非专一性产物。而用 β -珠蛋白缺失的 DNA 样品,如所期望的那样没有合成 β -珠蛋白片段;却产生了一些非靶片段。这样,在缺少“正确”模板的情况下, β -珠蛋白引物扩增了“错误”序列,这证明了一句古谚“懒汉的手就是魔鬼的玩物”。这种效应部分导致了从很少量的模板序列合成的 PCR 产物的异质凝胶图谱,如在细胞样品中只占极小部分的 HIV 序列。如第一章所述,修正不同的 PCR 参量使之最适于扩增的专一性,甚至可使反应在极少模板的情况下产生更加均一的产物。

以 Klenow 酶在 37°C 下合成 DNA 为基础的原始 PCR 法其专一性较差。尽管反应可使特异性靶片段扩增至百万倍,但大多数在 PCR 中合成的产物实际上并非靶片段。经克隆 β -珠蛋白扩增反应产物和用 β -珠蛋白探针筛选单独克隆检测靶序列,并用引物之一检测扩增产物,测得 PCR 的专一性为 1%^[7]。用其它引物时反应的专一性也差不多,总之,Klenow 酶 PCR 不是一种专一性很强的反应,需用探针特异性杂交进行进一步分析^[3,4],或者在一些情况下,用内源“嵌套引物(nested Primers)”^[1]检测和鉴定扩增的靶序列。

使用 Taq 聚合酶不仅简化了 PCR 程序(如前所述),也极大地增加了反应的特异性及总

产量。Taq 聚合酶的最适温度很高(约 75°C),使引物能在高温下进行退火和延伸,这样增加了反应的总强度并减少了与模板错配引物的延伸。而在 37°C 下,多数这类错配的引物都足以稳定到被 Klenow 酶延伸,产生非特异性扩增产物。Taq PCR 专一性的增强降低了非目的产物对酶和引物的竞争作用,使扩增靶片段的产量得到改善。在最后的几个循环中,当单循环周期内的酶量不再足以延长所有退火引物/模板复合物时,导致有效扩增的下降及平台效应。平台效应在 Taq PCR 中比在 Klenow 酶 PCR 中来得迟些(如用 1 μ g 基因组 DNA 开始 Taq PCR,约经 30 个循环到达平台,而 Klenow 酶 PCR 则为 20 个循环),因为前者反应的专一性较高。诸如在高产物浓度下模板链的重新结合等其它因素也会影响平台效应,这将在第一章中讨论。Taq 聚合酶除了提高 PCR 的专一性和产量,使用 Taq 聚合酶可以扩增的靶片段长度^[8](高达 10kb,虽然效率降低了)比用 Klenow 酶扩增的靶片段长度(<400bp)更长。

尽管 PCR 主要用于产生特异性序列拷贝,除此之外,它还是改变特殊模板序列的一条十分有效和精确的途径。由于寡核苷酸引物与扩增产物结合为一体,并容纳了在引物 5'端和最初模板⁺间的错配,使得通过该引物紧接在靶序列上引入新的信息序列成为可能。因此,对于克隆指定序列^[7],人们可不再受天然限制性位点的局限,而向引物 5'端加入任何限制性内切酶识别序列,进而在双链扩增产物中形成新的限制性位点。同样,也可加入象 T7 启动子^[1]这样的调控成份,用 T7 RNA 聚合酶从 PCR 产物合成 RNA 拷贝。此外,还可以利用适当引物将特殊的核苷酸置换、插入、及缺失导入扩增产物。

不同于直接突变作用,因核苷酸错误掺入使 PCR 产物序列发生的改变会造成潜在的问题。通过用克隆某一扩增反应产物产生的 M13 多克隆进行序列分析进而可对 PCR 过程中 Taq 聚合酶的忠实性进行评价。在这项初步研究^[6]中,其错误率约为 1/400,经计算每次循环的错误率约为 2×10^{-4} nt。最近在用一般的最适方法(降低 Mg⁺⁺和 dNDP 浓度)对不同基因进行的研究中,得到了更低的错误率^[9]。最初的测定结果与所报道的用 Taq 聚合酶体外复制 β 一半乳糖苷酶模板测定的结果,即 10^{-4} nt 的错误率相一致^[10]。尽管使用不同的模板会有一些不同的“变异”,且不同的反应条件可能影响到 Taq 聚合酶的忠实性,最初预测的 Taq 聚合酶 PCR 的“高”错误率($\sim 10^{-4}$)对大多数的 PCR 应用并不形成问题。在对扩增产物群的分析中,如在寡核苷酸探针杂交或直接序列分析中,单一产物的个别错误是测不出的。但是,在从 PCR 衍生的单个克隆的序列分析中,一定要从多个克隆中确定出 PCR 产物序列,以便将与模板序列相比有错误掺入的核苷酸拷贝及正确的拷贝区分开。其它具有“校正”功能的 DNA 聚合酶,如 T4 DNA 聚合酶,也可进行 PCR^[11],并在需很低错误率的研究中起作用。如在第二章中讨论的那样,Taq 聚合酶不含有可测的 3'至 5'核酸外切酶的“校正”活性。

PCR 的另一个重要特性,是其从 DNA 粗制品和降解的 DNA 模板中扩增靶序列的能力,这一点,在临床诊断应用中尤为重要^[12]。样品中的 DNA 不需经化学提纯就可作为 PCR 的模板,这证明在样品中不含有 Taq 聚合酶抑制因子。在第四章中将讨论不同的快速样品制备法对 PCR 的影响。PCR 从 DNA 粗制样品中扩增专一性序列的能力在科研(如精子溶胞产物,见第 12 章)、医学诊断(如漱口剂^[14]或档案中石蜡包埋的组织样品^[15])及法医(如单根的毛发研究^[16],见第 17 章)等方面的应用具有重要意义。

+在头几次循环之后,实际上几乎全部模板都是在前面的循环中合成的,并因此含有引物序列。

扩增反应中的污染可能性是一个在科研和诊断应用中广泛存在的问题。由于 PCR 具有合成百万 DNA 拷贝的能力,因而无论是因前一反应产物(残存产物)造成的污染,还是外源原料引起的污染,都是潜在的问题,这类问题尤其在以极少量模板起始反应的情况下更应当注意。单精子(见第 12 章)、单毛发(见第 17 章)、及 HIV 基因组序列(见第 19 章)等微量模板的扩增作用都需进行精确测定以减少和监测可能的污染。一般来讲,预先做到仔细设计实验步骤、准确按比例配制试剂、使用洁净的移液器,将反应制备同反应产物的分析全部分开,就会减小污染的危险。根据分析对扩增产物数量的要求,进行最少次数的 PCR 循环也使少量污染模板的扩增机会降低。一组不含模板 DNA 的“空白”反应对检测可能的污染是必要的。在基因分型方面,已被污染的样品一般可用 2 个以上等位基因的基因分型结果予以鉴定(见第 16 及 17 章)。

与重组 DNA 技术一样,PCR 因其可从少量复杂模板中大量产生特异性 DNA 片段,对分子生物学的基础及诊断应用方面都产生了巨大影响。重组 DNA 技术通过把有复制能力的专一性 DNA 序列插入载体,并将此载体导入宿主细胞中创造了分子克隆。PCR 代表了一种“体外克隆”的形式,可在简单的自动反应过程中产生并修饰长度和序列特定的 DNA 片段。

在分子生物学发展的初期,Erwin Chargaff 曾轻率地把分子生物学描述为“没有许可证的生化实验”。近 30 年来分子生物学惊人的成就表明,即使缺少现成理论基础,也可取得长足进步。分子生物学飞速发展的一个因素是其把新技术和利用新技术积极解决新问题有效地结合起来。PCR 在生物学研究的许多不同领域中简化了分析工作;由于 PCR 扩增的简便性,应允许进行无许可证的分子生物学实践。今后专家们将继续寻找应用和改进这种有效技术的新途径。

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 Arnheim, 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., Arnheim, 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*, in press.
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.
12. Bugawan, T.L., Saiki, R.K., Levenson, C.H., Watson, R.M., and Erlich, H.A. (1988) *Bio / Technology* 6:943.
13. Li, H., Gyllensten, U.B., Cui, X., Saiki, R.K., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1988) *Nature* 335:414.
14. Lench, N., Stanier, P., and Williamson, R. (1987) *Lancet* ii:1356~1358.
15. Shibata, D.K., Martin, J.W., and Arnheim, N. (1988) *Cancer Res.* 48:4564~4566.
16. Higuchi, R., von Beroldingen, C.H., Sensabaugh, C.F., and Erlich, H.A. (1988) *Nature* 332:543.

第一章 聚合酶链反应的设计和优化

前 言

聚合酶链反应(PCR)自从被采用以来^[1,2,3], 几年内就成了一项广为流传的研究技术。研究人员数量就象聚合酶链反应一样正在呈指数上升, 而且在不久的将来随着这种方法在分子生物学以外领域的广泛应用, 这种递增趋势将继续存在。PCR之所以得到普及主要是因为它简单, 而且成功的可能性大。按照最基本的定义, PCR只不过是在适宜的缓冲液中将样本DNA与寡核苷酸引物、脱氧核苷三磷酸及热稳定的Taq DNA聚合酶结合起来, 然后反复加热和冷却若干小时, 直到获得所需的扩增量。

事实上, PCR是一个比较复杂的、迄今尚未明了的生物化学反应。在反应中各种反应成分之间的动态的相互作用决定着产物的质量。虽然在多数情况下, 反应的最终结果比较好, 但如果要获得更好的结果或者此反应完全失败, 就有很多参数需要进一步探讨。本章探讨其中的一些参数, 并为PCR的设计和执行制定一些指标。

标准反应

由于PCR的应用很广泛, 因此, 不可能有这样一套条件, 它在任何情况下都能保证反应成功地进行。然而, 下面将要阐述的反应适应于大多数的DNA扩增反应, 即使不能适应, 它至少也确定了一个共同的起点, 在此基础上可以作多种变化。

标准PCR的体积通常为50 μ l或100 μ l, 除样品DNA外, 还包括50mM KCl, 10mM Tris·HCl(pH8.4, 室温)、1.5 mM MgCl₂、100 μ g/ml 白明胶、0.25 μ M的各种引物、200 μ M的各种脱氧核苷三磷酸(dATP、dCTP、dGTP和dTTP), 以及2.5个单位的Taq聚合酶。当然, 样品DNA的类型是可变的, 但通常都要具有10²~10⁵拷贝的模板(例如, 0.1 μ g人基因组DNA)。通常还要加几滴矿物油, 以密封反应, 并防止反应体积的减小。

在DNA热循环器(Perkin-Elmer Cetus 仪器公司)中可以很方便地进行DNA的扩增。所采用的分步一循环程序为: 94 $^{\circ}$ C变性20秒, 55 $^{\circ}$ C退火20秒, 然后在72 $^{\circ}$ C延伸30秒, 共循环30次。(分步一循环程序使仪器要尽快地加热和冷却到所需要的温度。因此, 现代采用的仪器, 其升温速率约为0.3 $^{\circ}$ C/秒, 降温速率约为1 $^{\circ}$ C/秒, 一次循环的时间大约3.75分钟)

利用这些条件可扩增DNA靶序列的范围很大, 专一性也很强(图1)。但是, 在有些反应中, 上述条件不能产生理想的结果, 因此, 下面将阐述用以改进PCR的一些途径。

引物的选择

现在对高效而专一性强的引物的选择仍然是凭经验。没有一套规则能确保高效引物对的合成。但是, 对于扩增反应的成败, 引物比其它任何因素都更重要。所幸的是, 大多数引物都能起作用, 而且下面的一些规则将有利于引物的设计。

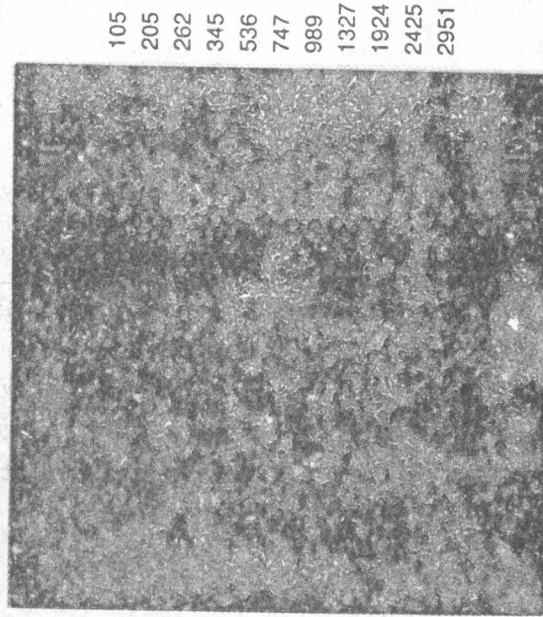


图 1. β -珠蛋白基因片段(150-2951bp)的扩增。100 μ l 反应样品中含有标准缓冲液, 每种 dNTP 200 μ M, 每种引物 250nM, 100ng 人基因组 DNA 和 2.5 单位 Taq 聚合酶 (Perkin Elmer / Cetus) 公司。扩增循环 30 次。每个样品取 2 μ l 在 1.6% 琼脂糖凝胶上分离, 并用溴化乙啶荧光显色。在每列胶的顶部标有产物的长度。采用的标记物是 BstEII 消化的 λ 噬菌体 (500ng) 及 HaeIII 消化的 ϕ 174-RF (250ng)。

1. 尽可能选择碱基随机分布、GC 含量类似于被扩增片段的引物。尽量避免具有多聚嘌呤、多聚嘧啶或其它异常序列的引物。
2. 避免具有明显二级结构 (尤其是在引物的 3'-末端) 的序列。计算机程序, 诸如威斯康星大学的 Squiggle 和 Circle 程序, 对于揭示这些结构是非常有用的。
3. 防止引物间的互补。尤其要避免具有 3'-端重叠的引物, 这样将降低“引物二聚体”的形成。

有时, 关于引物的位置也有限制。例如, 只能得到少量的序列信息。在这种情况下就应该首先试一试引物。上述规则有助于提高任何一对寡核苷酸正常行使其功能的机会, 但不是绝对必要的。

引物的长度大多为 20~30 个碱基, 最适用量则因扩增反应而异。较长的引物虽然能够合成, 但通常没有必要采用。与模板不互补的序列可以加到引物 5' 末端。因此, 这些外源序列便被结合到 PCR 的双链产物中。这为在扩增后的靶序列^[5]的末端引入限制性位点^[4]或调控因子 (如启动子) 提供了一种方法。如有必要, 可以采用更短的引物或简并的引物, 只要

反应的热程序适宜于原始模板的低稳定性。(对于高度简并的引物,最好是将最清楚的序列置于引物的 3'末端,甚至可达到合成多重序列的程度。在此多重序列中,3'序列的各种排列保持稳定。)每个寡核苷酸的浓度通常为 $0.05\sim 0.5\mu\text{M}$ 。

“引物二聚体”是在 PCR 产物中常见的一种扩增体,特别是在含初始拷贝模板很少的 DNA 样品上进行了多次扩增循环后更易出现这种扩增体。它是一个双链片段,长度接近于两个引物长度之和,似乎是由聚合酶在一个引物上再延伸另一个引物而形成的。所产生的这种连接物是极其高效的 PCR 模板,它如果出现在早期的循环中,即可很容易地控制整个反应而成为主要产物。

对于引物二聚体的形成机制,目前尚未完全明了。有人发现,具有互补的 3'末端的两个引物易形成引物二聚体。这说明使引物末端靠近的瞬间作用是最初的反应^[6]。已经证明,有几种聚合酶,包括 Taq, 具有较弱的无模板指导的聚合活性,能将额外的碱基附加到钝末端的双链分子上^[7,8]。那么就很有可能在一个单链寡核苷酸上延伸与另一个引物分子形成较短的 3'重叠的片段,从而形成二聚体。无论如何,如果二聚体具有阻碍作用,可以通过尽量降低引物和聚合酶的浓度,以减少二聚体的产生。

最后要提到的是,虽然大多数引物都能不同程度地扩增靶 DNA,但偶尔也会合成完全不起作用的引物。其原因尚不清楚,但当出现这种现象时,大多数情况下只要将引物向任何一边移动几个碱基,便能解决这个问题。

PCR 缓冲液

PCR 缓冲液的变化通常会影响到扩增结果。特别是 MgCl_2 , 其浓度对扩增作用的专一性和扩增量有重大影响。通常最适浓度为 1.5mM 左右(每种 dNTP 的浓度为 $200\mu\text{M}$ 时),但有时需采用不同的 Mg^{2+} 浓度(图 2)。 Mg^{2+} 浓度过高,通常会导致非特异性扩增产物的累积,而浓度过低时通常会降低扩增量。最近证明少用或不用 KCl 和白明胶将是有益的^[9,10]。有些反应程序中采用了 10%二甲亚砜(DMSO),表面上是为了减少靶 DNA 二级结构的发生,但我们的实验经验表明 DMSO 对 Taq 聚合酶有轻微的抑制作用,而且会降低扩增产物的总产量。

四种脱氧核苷三磷酸(dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP)的浓度通常每种都是 $50\sim 200\mu\text{M}$ 。过高的浓度会导致聚合酶将其错误掺入(即所谓的“热力背信”),因此应当避免^[11]。浓度为 $50\mu\text{M}$ 和 $200\mu\text{M}$ 时,前体的量足以合成分别约 $6.5\mu\text{g}$ 和 $25\mu\text{g}$ 的 DNA。

中性的 dNTP 溶液可以从 USB, Sigma 和 Pharmacia 等公司购得。如果购买冷冻干燥的粉剂,然后自配溶液,则可节省很多开支,但自配的溶液必须用 NaOH 中和,而且在使用前必须用紫外光吸收法准确地测定其浓度。

由于脱氧核苷三磷酸定量地与 Mg^{2+} 结合,因此反应中的 dNTP 的含量将决定游离 Mg^{2+} 的含量。在标准反应中,4 种脱氧核苷三磷酸的最终浓度为 0.8mM ,因此在原来的 1.5mM MgCl_2 中剩下 0.7mM 未与 dNTP 结合。所以,如果 dNTP 的浓度有很大改变, MgCl_2 的浓度也必须改变。

Taq 聚合酶可从 Perkin-Elmer Cetus 仪器公司、新英格兰 Biolabs 公司、Stratagene 公司、中美合资华美生物工程公司等处购得。此酶的常用浓度为 2.5 单位 / $100\mu\text{l}$ 反应液。对

于含有序列非常复杂的 DNA 样品(如染色体组 DNA)的扩增反应, Taq 聚合酶的最适浓度通常为 1~4 单位 / 100 μ l。浓度高于此水平时, 将导致非特异性 PCR 产物增加, 而所需的靶片段减少(图 3)。

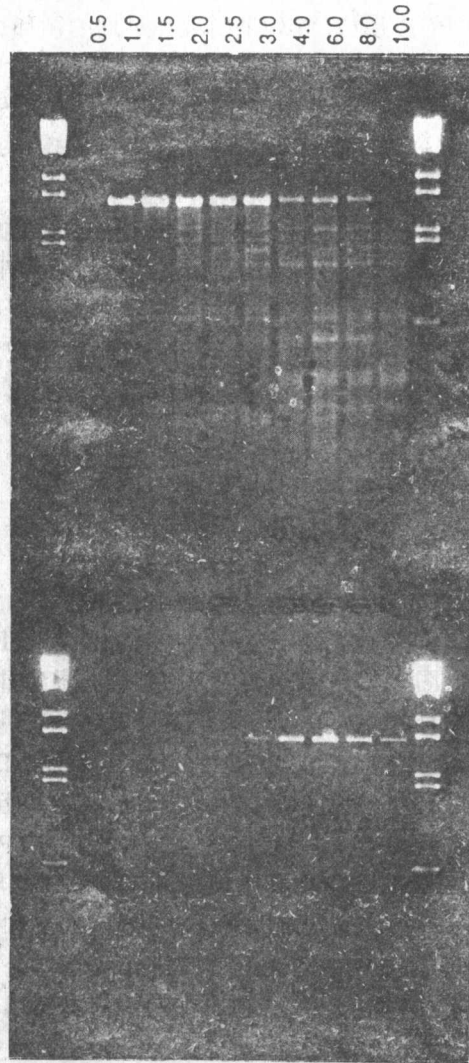


图 2. Mg^{2+} 浓度对 PCR 专一性和产量的影响。用不同浓度的 $MgCl_2$ 滴定扩增人 β -珠蛋白基因 1.8Kb 片段的两个重叠引物对。扩增条件见图 1, 只是 $MgCl_2$ 浓度在 0.5-10mM 之间变化(浓度已标在每列胶的顶部)。这两个引物对尽管大小相似, 并来自 β -珠蛋白的相同区域, 但是其最适 Mg^{2+} 浓度迥然不同。



图3. Taq 聚合酶浓度对 PCR 专一性和产量的影响。按图 1.所述条件扩增 110bp 的人 β -珠蛋白基因片段,但 Taq DNA 聚合酶浓度在 0.25—8 单位 / 100 μ l 反应液之间变化。该酶的最适浓度在 1—2 单位左右。

循环参数

PCR 的进行是在三种温度下保温样品。这三种温度对应于一次循环中的三个步骤: 扩增—变性、退火和延伸。这种循环过程可以用预先准备好的水浴锅人工地或用 DNA 热循环仪自动地完成。

在标准反应中, 将样品快速加热至 90~95 $^{\circ}$ C, 使双链 DNA 变性, 再快速冷却至 40~60 $^{\circ}$ C, 使引物退火并结合到互补序列上, 然后加热至 70~75 $^{\circ}$ C 用 Taq 聚合酶延伸退火引物。在 70~75 $^{\circ}$ C 下的保温时间因被扩增的靶 DNA 长度而异; 每 1000 个碱基的序列加热 1 分钟便足够了。一旦确定了其它的扩增条件, 就可以试用较短的加热时间。(如果靶序列含约 150 个碱基或更短, 就可以取消整个延伸步骤。聚合酶在较低温度时仍保持很强的活性^[9], 延伸过程在由退火转变为变性时即可完成。)

过渡时间, 即从一种温度转变到另一种温度所需要的时间, 取决于所用设备的类型。除

了有某些例外,这种变温速率不重要,因而应尽量加快过渡转换,以缩短循环时间。但是,为了确保样品达到所需的温度,应该在扩增过程中测定样品的温度,以确定特定反应中的实际过渡时间。用一根微探针温差电偶(Cole-Parmer 公司)和一台数字式万用表即可达到这个目的。

变性时温度不够是导致 PCR 反应失败的一个常见原因。使反应达到使链完全分离时的温度是很重要的。多数情况下 94℃ 左右就足够了。温度一达到 94℃ 就应冷却至退火温度。过度变性可能是不必要的,而快速高温处理则有助于保持聚合酶的活性在整个反应过程中都达到最高水平。

退火时的温度取决于引物的长度和 GC 含量。对 GC 含量约 50% 长 20 个碱基的典型的寡核苷酸引物来说,55℃ 是个很好的起点温度,尽管较高的温度对提高引物的特异性是必要的。由于在反应的混合物中存在着极其过量的引物,杂交可以在瞬间内完成,因此,不需长时间退火。(热循环仪上分步一循环程序采用的变性和退火时间都是 20 秒,是为了使 0.5ml 微型离心管中的 100μl 反应液的温度与载台的温度达到平衡。)

有时,引物只有 12~15 个碱基,退火温度需达 40~45℃。然而,这样短的引物在 72℃ 的延伸温度下不可能仍然保持退火状态。利用聚合酶在较低温度时的部分活性将引物延伸几个碱基,使之稳定,就可以解决这个问题。这可以通过在 50~60℃ 时进行保温或将温度从 40℃ 逐渐升高到 72℃ 来实现。简并的引物与靶序列常常会发生多处错误配对,这可以采用类似方法解决。

在同一温度下使引物退火和延伸常常是有可能的^[12]。在 55℃ 以上的温度同时退火和延伸,除了可将反应程序简化为两温度循环外,还可进一步提高反应的专一性。

扩增平台期

扩增反应并不是无限的。经过一定次数的循环后,所需的扩增片段逐渐地停止呈指数状累积,而进入线性或静止阶段。这个时期叫做平台期。PCR 反应达到平台期的时间主要取决于反应开始时样品中靶 DNA 的拷贝数和 DNA 合成总量。(因此,仅用扩增度来指示反应的性能,而不同时说明模板的初始浓度,是不全面的。)

除了存在着引物或 dNTP 被耗尽、聚合酶或 dNTP 失活的可能性(在标准反应中这种可能性很小)以外,还有 3 个外界原因可导致平台期的到来,即:底物过量、非专一性产物的竞争和产物重新结合。

底物过量是因为已合成的 DNA 量多于反应中存在的 Taq 聚合酶在给定的延伸时间内所能复制的量。对于含 2.5 单位 Taq 聚合酶的 100μl 标准反应, DNA 达 1μg(3mol 脱氧核苷一磷酸)左右时,底物开始过量。这个问题可以通过增加延伸时间和(或)聚合酶浓度来解决。但是,这样做往往是不切实际的,因为每一次循环都要将延伸时间和(或)聚合酶浓度增加一倍,才能维持扩增量呈指数增长。

非专一性扩增产物的竞争作用与底物过量的情况密切相关。在这种情况下,不需要的 DNA 片段和所需要的片段共同竞争有限的 DNA 聚合酶。显然,解决这个问题的办法是提高 PCR 反应的专一性,以降低非靶序列的累积程度。另外,在退火引物延伸前发生的单链

PCR 片段重新结合可抑制扩增产物的进一步积累。现在还不能确定这种抑制作用是由引物的分支迁移和置换还是由聚合酶本身的低效置换合成作用引起的。当产物浓度达到 $10 \text{ pmol} / 100 \mu\text{l}$ 时便会出现这种抑制作用, 只有稀释反应液才能消除它。

在多数情况下, 平台期是不可避免的, 是 PCR 反应内在的限制因素。幸而当平台期到来时, 已经累积了足够的产物, 几乎可用于任何目的。如果需要更多的产物, 那么进行多次反应比企图避免平台期可能要容易得多。

影响专一性的因素

影响扩增反应专一性的因素很多。通过调节退火时的温度可以在一定程度上控制退火过程的严谨性。尽量缩短退火和延伸过程的保温时间, 将会减少由其它闲置 DNA 聚合酶导致的错误引动和延伸作用的机会。降低引物和聚合酶的浓度也将减少错误引动(尤其是导致形成二聚体的那种错误引动)的发生。最后, 改变 MgCl_2 (也许还有 KCl) 的浓度将会进一步提高反应的专一性, 这要通过提高反应的严谨性、或通过直接影响聚合酶本身(活性、过程性)等来实现。

概 要

由于 PCR 的反应成分之间(尤其是引物和 DNA 样品之间)存在着非常复杂的相互作用, 而且这项技术的应用范围很广泛, 因此, 不可能有一套对所有情形都最适宜的扩增条件。但在多数情况下, 利用已阐述过的一般条件常常能获得满意的结果。必要时对反应参数略加修改, 通常就能将勉强合格的 PCR 转变为专一性强、产量高的 PCR 反应。

参考文献

1. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. (1985) *Science* 37:170-172.
2. Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., and Erlich, H.A. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273.
3. Faloona, F., and Mullis, K. (1987) *Meth. Enzymol.* 155:335-350.
4. Scharf, S.J., Horn, G.T., and Erlich, H.A. (1986) *Science* 233:1076-1078
5. Stofflet, E.S., Koeberl, D.D., Sarkar, G., and Sommer, S.S. (1988) *Science* 239:491-494.
6. Watson, B., personal communication.
7. Clark, J.M. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16:9677-9686.
8. Denney, D., personal communication.
9. Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., and Brow, M.A. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:9436-9440.
10. McCabe, P., personal communication.

11. Petruska, J., Goodman, M.F., Boosalis, M.S., Sowers, L.C., Cheong, C., and Tinoco, I., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6252-6256.

12. Kim, H.S., and Smithies, O. (1988) Nucl. Acids Res. 16:8887-8903.