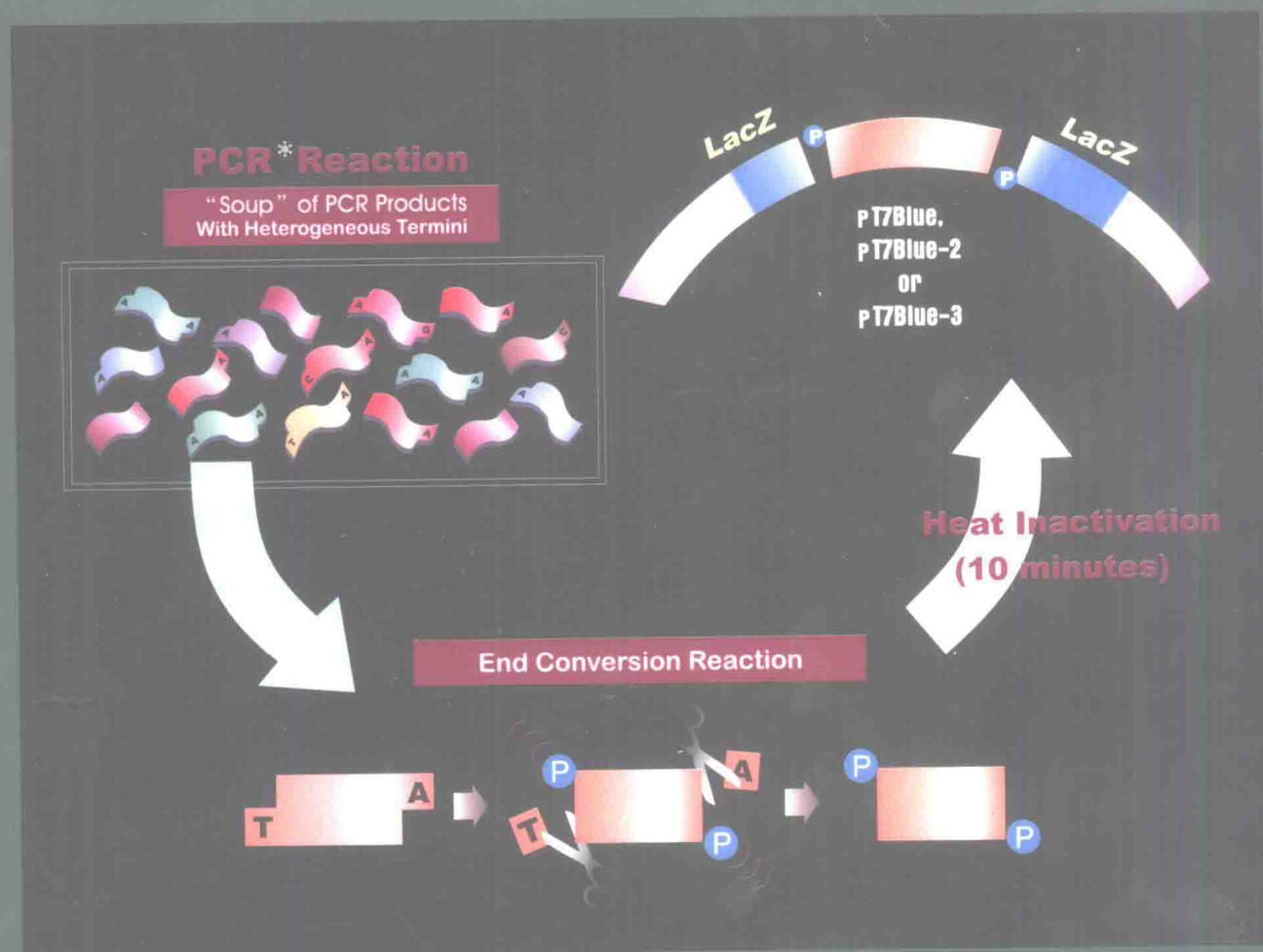


现代生物技术译丛

PCR技术实验指南

PCR Primer: A Laboratory Manual



[美] C.W.迪芬巴赫

G.S.德维克斯勒

科学出版社

内 容 简 介

该手册由美国冷泉港实验室从事 PCR 研究的专家们共同研讨和撰稿,是一部最新、最权威的 PCR 技术大型实验手册,其内容从最简单的 PCR 操作到最新的技术进步,从最基本的 PCR 技术到各种奇思妙想的 PCR 应用技巧无所不包,令读者目不暇接、倍受启迪。具体内容包括 PCR 导论、样品的制备、引物设计、PCR 产物检测(定量和分析)、RNA 样品的 PCR、PCR 介导的克隆、PCR 测序、PCR 产物的克隆、PCR 法制备突变体、其他扩增技术等。每个操作都配有疑难解析和完整的参考文献。

本书是《分子克隆实验指南》的姊妹篇,可供从事分子生物学、遗传学、细胞生物学、生物化学以及医学各领域研究的科研与教学人员参考,既是实验室必备的工具书,也是研究人员开阔眼界、拓展思路的不可不读之经典。

Carl W. Dieffenbach and Gabriela S. Dveksler

PCR Primer: A Laboratory Manual

Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995

图字:01-97-1997

图书在版编目(CIP)数据

PCR 技术实验指南/[美]迪芬巴赫(Dieffenbach, C. W.),[美]德维克斯勒(Dveksler, G. S.)著;黄培堂等译. -北京:科学出版社,1998.8
(现代生物技术译丛)

书名原文:PCR Primer: A Laboratory Manual

ISBN 7-03-006545-X

I . P… II . ①迪… ②德… ③黄… III . 聚合酶-高聚物反应:链式反应-实验-指南 IV . Q555.3-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字(98)第 08389 号

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号
邮政编码:100717

北 京 双 青 印 刷 厂 印 刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

1998 年 8 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2000 年 9 月第三次印刷 印张:34 3/4

印数:6 001-8 000 字数:803 000

定价:98.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换(新欣))

译者(按姓氏笔画排列)

王 翔	王建华	卢柏松	朱旭东
李 朝	李 赏	陈添弥	周晓巍
赵 东	俞炜源	袁清安	黄培堂
黄君健	程度胜		

译者序

1985年美国Cetus公司人类遗传学研究室Mullis K. B. 等人首创了一种称为聚合酶链式反应(PCR)的DNA扩增技术。开始是手工操作,在不同的温度水浴中往复进行,1987年逐步完成了自动操作的装置,现在已发展成为适合多种不同用途的仪器。这一技术的发明极大地推动了分子生物学的发展,而且迅速扩展至其他领域里应用,如临床疾病诊断、环境微生物的检测、法医学判定等等,可以说它是目前核酸分子水平的基础及应用研究中使用最广泛的一项技术。我们在1990年即完成了《PCR技术的原理和应用》一书,这是国内最早介绍该技术的专著。

美国冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory)是世界分子生物学研究中心,冷泉港实验室出版社以出版生物技术实验手册举世闻名。本书就是有关PCR技术的,与《分子克隆实验指南》同系列的大型实验手册。我们集中了多年来应用此项技术的中青年研究人员在短时间内译出本书,希望对读者能有所帮助。然而由于水平有限,经验不足,错误在所难免,尚请读者批评指正。

黄培堂

一九九八年七月于北京

前 言

技术在本质上是一个不断发展的东西,因而把它冻结在某个时间点上给它拍张快照是一种矛盾的行为。特别是对于聚合酶链式反应(PCR)这种技术就更加如此,因为它在不断发展而且进步迅速。然而,从试图应付 PCR 快速变化的实验室研究者的角度出发,提供这些技术的一个有组织的记录以便在实验室应用就显得非常重要了。为了这一目的,我们在《PCR 方法和应用》(*PCR Methods and Applications*)杂志中发表了一系列“手册增补”(manual supplements),这些增补旨在提供一个开发本书内容的工作间,并给杂志的读者以试用和评价这些方法的机会。这些原始的实验方案经过原作者的重新组织、修订和更新,同时也新增加了一些实验方法和附录,就以更为正规的形式形成了本书——《PCR 技术实验指南》(*PCR Primer: A Laboratory Manual*)。

这本 PCR 手册力图沿袭冷泉港实验室出版社出版的《分子克隆》(*Molecular Cloning*)和《抗体》(*Antibodies*)这两本实验室手册的特点。像许多其他研究者一样,我们极大地得益于这两本优秀的手册提供的基础知识和易于参照的实验方案。当冷泉港的 Judy Cuddihy 和 John Inglis 建议我们写这本书时,我们最关心的是本书能否达到前两本手册的水准。一句话,我们力图提供一幅包括全部 PCR 和扩增技术的操作图,操作图的形式使研究者能够决定哪种方法可用于他们所研究的课题,并让他们在实验室能够应用这些方法。本书的第一部分论述 PCR 中的比较基本的但却十分重要的思想——模板制备、引物设计、故障排除和污染控制方法等。其余部分包括用于特殊实验需要的比较复杂的方法,但它们有赖于对第一部分所涉及内容的成功理解。我们也提供了一些新出现的可供选择的扩增方法,它们无疑可以作为 PCR 方法的补充,有时甚至取代它。我们希望本手册对这些技术的详细描述,能够揭开不同种形式的 PCR 和扩增技术的秘密,使您能够掌握它们并尽快在您的实验室得到成功应用。

感谢本书所有作者,他们对我们的要求不厌其烦并按时交回手稿。感谢冷泉港实验室出版社全体员工的办事效率,尤其是 Patricia Barker、Inez Sialiano、Susan Schaefer 和 Maryliz Dickerson。另外对我们各自的家人表示谢意(Ann、Sara、Rebecca Dieffenbach 和 Pablo Gutman),在我们周末为这本书奔忙的时候,他们表现出极大的耐心,尤其感谢 Pablo Gutman 编辑了本书的部分章节。还要特意感谢冷泉港的 Judy Cuddihy,她对前两本手册的经验和对本书的建议都给了我们完成本书所需要的动力。衷心希望这本手册对您有用并能够有益于您的 PCR 实验。

Gabriela S. Dveksler

Carl W. Dieffenbach

英文缩写与译名

- ACE**, Angiotensin I-converting enzyme 血管紧张肽-I 转化酶
- AFLP**, amplified fragment length polymorphism 扩增片段长度多态性
- AMVRT**, avian myeloblastosis virus reverse transcriptase 禽成髓细胞瘤病毒反转录酶
- APOB**, Apolipoprotein B 载脂蛋白 B
- AP-PCR**, arbitrarily primed PCR 任意引物 PCR
- ARMS**, amplification refractory mutation system 扩增抗拒突变系统
- ASPCR**, allele-specific PCR 等位基因特异性 PCR
- ASRA**, allele-specific restriction analysis 等位基因特异性限制酶切分析
- BAC**, bacterial artificial chromosome 细菌人工染色体
- BBSH**, bead-based sandwich hybridization 玻珠介导的夹心杂交
- BGH**, bovine growth hormone 牛生长激素
- BNF**, buffered neutral formalin 中性福尔马林缓冲液
- BSA**, bovine serum albumin 牛血清白蛋白
- CMV**, cytomegalovirus 巨细胞病毒
- cPCR**, competitive PCR 竞争性 PCR
- CPCR**, capture PCR 捕捉性 PCR
- cpm**, counts per minute 每分钟计数
- CRS**, competitive reference standard 竞争性参比标准
- dATP**, deoxyadenosine triphosphate 脱氧腺苷三磷酸
- dCTP**, deoxycytidine triphosphate 脱氧胞苷三磷酸
- DEPC**, diethylpyrocarbonate 焦碳酸二乙酯
- DGGE**, denaturing gradient gel electrophoresis 变性梯度凝胶电泳
- dGTP**, deoxyguanosine triphosphate 脱氧鸟苷三磷酸
- DHFR**, dihydrofolate reductase 二氢叶酸还原酶
- DIFF-PCR** differential PCR 差示 PCR
- DMS**, dimethylsulfate 二甲基硫
- DMSO**, dimethylsulfoxide 二甲基亚砷
- DN-PCR**, double-nested PCR 双嵌套式 PCR
- dNTP**, any of the four deoxynucleotide triphosphates 四种脱氧核苷三磷酸中的任意一种: dATP、dCTP、dGTP、dTTP
- DOS**, degenerate oligonucleotide sequences 简并寡核苷酸序列
- DTT**, dithioereitol 二硫苏糖醇
- dTTP**, deoxythymidine triphosphate 脱氧胸苷三磷酸

dUTP, deoxyuridine triphosphate 脱氧尿苷三磷酸
ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay 酶联免疫吸附测定
ELOSA, enzyme-linked oligonucleotide sorbent assay 酶联寡核苷酸吸附测定
E-PCR, expression PCR 表达 PCR
FAF-ELOSA, fluorescein-antifluorescein based ELOSA 荧光素-抗荧光素 ELOSA
F-SSCP, fluorescence single-strand conformational polymorphism 荧光单链构象多态性
G-LCR, gapped LCR 缺口连接酶链式反应
HMA, heteroduplex mobility assay 异源双链体迁移率测定
HN-PCR, heminested PCR 半嵌套式 PCR
HTA, heteroduplex tracking assay 异源双链体示踪分析
ICVPCR, internally controlled virion PCR 内部校正的病毒粒子 PCR
IMS, immunomagnetic separation 免疫磁性分离法
IP-10, 4-aminomethyl-4,5-dimethylisopsoralen 4-氨基甲基-4,5-二甲基异补骨脂素
JOE, 6-carboxy, 4',5'-dichloro-2',7'-dimethoxy fluorescein 6-羧基 4',5'-二氯-2'-7'-二甲氧基荧光素
J-PCR, junction PCR 连接 PCR
KGM, potassium glutamate 谷氨酸钾
LAPCR, long and accurate PCR 长距离精确 PCR
LAR, ligase amplification PCR 连接酶扩增 PCR
LCR, ligase chain reaction 连接酶链式反应
LDR, ligase detection reaction 连接酶检测反应
LIC-PCR, ligation-independent cloning PCR 不依赖连接作用的克隆 PCR
LMPCR, ligation-mediated PCR 连接介导的 PCR
LOH, loss of heterozygosity 杂合性丢失
LS-PCR, low-stringency PCR 低严谨性 PCR
MAAP, multiple arbitrary amplicon profiling 多重任意扩增子分布图
MAMA, mismatch amplification mutation assay 错配扩增突变分析
MAPREC, mutant analysis by PCR and restriction enzyme cleavage PCR 的突变分析和限制性酶切分析
MARMS, multiple amplification refractory mutation system 多重扩增抗拒突变系统
MoMLV, Moloney murine leukemia virus Moloney 小鼠白血病病毒
MSSCP, Multiplex single-strand conformational polymorphism 多重单链构象多态性
NASBA, nucleic acid sequence-based amplification 基于核酸序列的扩增
PAC, P1-derived artificial chromosome P1 来源的人工染色体
PAH, phenylalanine hydroxylase 苯丙氨酸羟化酶
PASA, PCR amplification of specific alleles 等位基因特异性 PCR 扩增
PBL, peripheral blood lymphocytes 外周血淋巴细胞

PBMC, peripheral blood mononuclear cells 外周血单核细胞
PCR-PIRA, PCR-primer introduced restriction analysis PCR 引物介导的限制性分析
PEG, polyethylene glycol 聚乙二醇
PET, paraffin-embedded tissue 石蜡包埋组织
Pfu, *Pyrococcus furiosus* 激烈热球菌
Pwo, *Pyrococcus woesei* 沃氏热球菌
RACE, random amplification of cDNA ends cDNA 末端的随机扩增
RAP-PCR, RNA arbitrarily primed PCR RNA 的任意引物 PCR
RAPD, random amplified polymorphic DNA 随机扩增多态性 DNA
RCR, repair chain reaction 修复链式反应
RDA, representational difference analysis 代表性差异分析
RFLP, restriction fragment length polymorphism 限制性片段长度多态性
RL/RT/PCR, RNA ligase reverse transcription-PCR RNA 连接酶反转录 PCR
RNA-PCR, PCR starting with RNA RNA PCR
rPCR, random amplification of whole DNA sequences 全 DNA 序列的随机扩增
RPCR, recombination PCR 重组 PCR
RS-PCR, restriction site PCR 限制性位点 PCR
RSO, restriction site oligonucleotide 限制性位点寡核苷酸
RT, reverse transcriptase 反转录酶
RT-PCR, reverse transcriptase PCR 反转录酶 PCR
RT-RPCR, reverse transcriptase rapid PCR 反转录酶快速 PCR
SDA, strand displacement amplification 链置换扩增
SDM, site-directed mutagenesis 定点突变
2-SLA, two-stage linear amplification 二步线性扩增
3-SLA, three-stage linear amplification 三步线性扩增
SNuPE, single nucleotide primer extension 单核苷酸引物延伸
SOE, spliced overlap extension 剪接式重叠延伸
SpCCM, solid-phase chemical cleavage 固相化学裂解
3SR, self-sustained sequence replication 自身支持性序列复制
SS, sucrose synthase 蔗糖合成酶
SSB, single-stranded DNA-binding protein 单链 DNA 结合蛋白
SSCP, single-strand conformational polymorphism 单链构象多态性
STR, short tandem repeat 短串联重复
STS, sequence tagged site 序列标志位点
Taq, *Thermus aquaticus* 水生栖热菌
TAS, transcription-based amplification systems 基于转录的扩增系统
Tbr, *Thermus brockianus* 布鲁克氏栖热菌
TD PCR, touchdown PCR 降落 PCR

TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase 末端脱氧核苷酸转移酶
Tfl, *Thermus flavus* 黄栖热菌
Tli, *Thermococcus litoralis* 里氏热球菌
TRF, time-resolved fluorometry 时间分辨性荧光术
Tth, *Thermus thermophilus* 嗜热栖热菌
UNG or UDG, uracil, *N*-glycosylase or uracil DNA glycosylase 尿嘧啶 DNA-糖基酶
UP, universal product 通用产物
UTL, untranslated leader 非翻译前导序列
VNTR, variable number tandem repeat 可变数串联重复序列
X-PCR, xeno-competitive PCR 外源竞争性 PCR
YAC, yeast artificial chromosome 酵母人工染色体

目 录

译者序

前言

英文缩写与译名

第一章 PCR 导论	1
第一节 PCR 实验室的建立	4
第二节 标准 PCR 方法: β -珠蛋白 DNA 的快速分离和 PCR 分析	10
第三节 PCR 中遗留污染的酶法控制	14
第四节 表面紫外线照射减少 PCR 污染	19
第五节 PCR 反应的特异性、效率和忠实性	23
第六节 PCR 的优化和疑难解析	33
第七节 长距离 PCR	41
第二章 样品的制备	52
第一节 用基因释放剂快速制备 PCR 扩增用的 DNA	53
第二节 石蜡包埋组织的 PCR 扩增: 样品制备与固定的效果	64
第三节 RNA 纯化	74
第三章 引物设计	88
第一节 PCR 引物设计的一般概念	88
第二节 错配和简并引物的设计和应用	95
第三节 多重 PCR	105
第四章 PCR 产物检测: 定量和分析	117
第一节 PCR 产物的免疫检测	119
第二节 使用 AmpliSensor 分析的定量 PCR	131
第三节 用任意引物 PCR 进行 DNA 指纹分析	138
第四节 用任意引物 PCR 进行 RNA 指纹分析	145
第五节 原位 PCR	162
第六节 单链构象的多态性	173
第七节 用异源双链体迁移率测定技术对人免疫缺陷病毒进行遗传亚型 分类	178
第八节 灵敏快速的突变检测方法——固相化学裂解法	192
第五章 RNA 样品的 PCR	201
第一节 PCR 法测定基因表达的相对差异	205
第二节 运用磷光剂驻存技术的定量液相杂交 PCR	218
第三节 用 SNaPE 法定量分析单个核苷酸差异的等位基因特异性序列	

.....	238
第四节 内部外显子和 3' 末端外显子的捕捉	241
第五节 表达 PCR	261
第六章 PCR 介导的克隆	267
第一节 cDNA 末端的快速扩增	268
第二节 Panhandle PCR	288
第三节 差异显示法检测和鉴定表达基因	295
第四节 用磁珠和 PCR 构建减法 cDNA 文库	310
第五节 PCR 法筛选 DNA 文库	321
第六节 YAC 文库的自动化筛选	327
第七节 PCR 无限增殖法得到重排免疫球蛋白基因表达文库	344
第七章 PCR 测序	359
第一节 PCR 扩增 DNA 产物的直接测序	359
第二节 循环测序法	371
第八章 PCR 产物的克隆	380
第一节 PCR 产物的克隆策略	380
第二节 PCR 产生的 DNA 片段的克隆和分析	393
第九章 PCR 法制备突变体	416
第一节 致突变 PCR	416
第二节 PCR 突变和体内重组	421
第三节 PCR 法构建突变基因及新型重组基因	429
第四节 快速 PCR 定点突变	437
第十章 其他扩增技术	445
第一节 连接酶链式反应(LCR)	450
第二节 3SR 检测法的优化及特点	467
第三节 单管定量 NASBA 检测 HIV-1 RNA	478
附录	487
用于引物选择的计算机软件	487
PCR 中使用的修饰寡核苷酸	492
供应商	496
商标	499
索引	503

第一章 PCR 导论

聚合酶链式反应(PCR),即通过引物延伸核酸的某个区域而进行的重复双向 DNA 合成,在设计上十分简单并且似乎有无限的应用方式。由于 PCR 远不仅是把试剂混合在试管里然后开动机器,所以本章列出了利用现有实验室从事 PCR 操作的最佳方案,并包括了如何避免 PCR 污染的方法。除了讨论在哪里进行干净的 PCR 外,本章还描述了如何从常规的 PCR 方法开始。

使用 *Taq* DNA 聚合酶的常规 PCR 方案所需的成分如下:

10×酶特异性反应缓冲液:

10~50 mmol/L Tris-HCl (pH7.5~9.0)

6~50 mmol/L KCl 或 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

1.5~5.0 mmol/L MgCl_2 或 MgSO_4

0.2 mmol/L dATP、dCTP、dGTP、dTTP

0.1~1.0 $\mu\text{mol/L}$ 每种寡核苷酸引物

2.0~2.5U 耐热 DNA 聚合酶

核酸模板, $10^2 \sim 10^5$ 拷贝

加蒸馏水到 100 μl

PCR 扩增一个模板要求一对寡核苷酸引物、4 种脱氧核糖核苷酸(dNTP)、摩尔数超过 dNTP 的镁离子和进行 DNA 合成的热稳定 DNA 聚合酶。对于每一个特定的应用,寡核苷酸引物、dNTP 和镁离子的用量可以不同。由于 PCR 倾向于是一种经验性技术,本书中不同方法所推荐的反应条件各不相同,这些推荐的条件对于不同的 DNA 序列和寡核苷酸引物有必要进行优化。

“标准 PCR 方法: β -珠蛋白 DNA 的快速分离和 PCR 分析”提供了一个最基本的 DNA-PCR 的范例,而“PCR 的特异性、效率和忠实性”则强调反应混合物中不同的成分对产物获得率和酶忠实性的影响。如果 PCR 产物量不高可以调节不同的参数,这些参数和可能额外加入的辅助溶剂在“PCR 优化和疑难解析”章节中讨论。

提高扩增产量和增加特异性的一个普遍而容易做到的方法是热启动技术。为此有多种推荐的方法,包括尿嘧啶-*N*-糖苷酶和 dUTP,蜡质屏障,注入镁的蜡珠,或者抗 *Taq* DNA 聚合酶的单克隆抗体。所有这些方法在第一次加热反应物到 92℃ 以后,各种不同反应成分才混合起来, DNA 合成只在准确配对的引物处发生。热启动的应用在“PCR 实验室的建立”和“PCR 中遗留污染的酶法控制”中讨论。

商业来源的热稳定 DNA 聚合酶有不同的最佳 pH 值和不同的盐浓度要求。表 1.1 中

列出了推荐的缓冲液、反转录酶和核酸外切酶活性,以及一些比较常用的热稳定 DNA 聚合酶的生产厂家。

另一个考虑的可变条件是反应的终体积。PCR 需要由热循环仪来实现温度的迅速变化。作为一个总的规则,反应体积通常在 20 μ l 到 100 μ l 之间。较大体积的样品加热和冷却效率都不够高,而小体积的反应得到的产物量不足下一步操作和分析。

PCR 循环过程中有三种不同的事件发生:①模板变性;②引物退火;③热稳定 DNA 聚合酶进行 DNA 合成。

- 1) 在反应物加热到 92~96 $^{\circ}$ C 时发生 DNA 变性。变性 DNA 所需要的时间决定于 DNA 的复杂性、反应管的几何学、热循环仪的种类和反应的体积。对于 G+C 含量高的 DNA 序列,据报道额外加入甘油、延长变性时间、应用核苷酸类似物可以提高 PCR 产量。
- 2) 变性以后,寡核苷酸引物与和它互补的单链靶序列杂交。这一步的温度从 37 $^{\circ}$ C 到 65 $^{\circ}$ C 都有,由引物与靶序列的同源性程度和寡核苷酸的碱基组成决定。引物以显著大于靶序列的浓度存在,长度也短于靶序列,因而它们与互补序列的配对速度比靶序列重新配对成双链的速度快几个数量级。
- 3) 最后一步是由热稳定 DNA 聚合酶延伸寡核苷酸引物。循环中的这一步通常在 72 $^{\circ}$ C 进行。拷贝模板所需要的时间完全由 DNA 产物的长度决定。根据所使用的 PCR 热循环仪,在某些情况下使用两步法 PCR 而不是像在“PCR 的特异性、效率和忠实性”中所讨论的三步法 PCR 是可行的。

随着 PCR 的广泛使用,最严重的问题是靶序列的污染,这在 PCR 反应之前就可能发生。“PCR 中遗留污染的酶法控制”和“表面紫外线照射以降低 PCR 污染”提供了减少污染的特殊方法,而且“PCR 实验室的建立”中讨论了如何把这些方法与好的实验操作相结合以及如何改进实验室设计。

PCR 中的一个重要突破是能够高效地扩增达到 45kb 的 DNA 片段。这通过使用两种耐热 DNA 聚合酶实现,一种酶有校对功能,另一种没有。正如在“长距离 PCR”中讨论的那样,成功地扩增很长的 PCR 产物需要优化缓冲液的条件,以及循环中每一步的温度和时间。

扩增起始物(即模板核酸)的质量和数量在 PCR 中至关重要,能够扩增的 PCR 产物的大小由反应条件和模板的质量决定。

样品的制备在第二章详细讨论。在建立 PCR 反应时一个经常被忽略的问题是所加的靶序列的量或拷贝数的多少。一个反应中的模板量应该用所含靶序列的拷贝数而不是重量来定量,过多的模板可能妨碍成功的扩增。

为了从 PCR 得到有意义的数据,有必要适当处理模板核酸和得到的 PCR 产物。为此我们强调控制模板和 PCR 产物引起的污染的方法的重要性。没有这些预备措施以及本章所讨论的提高和评价反应灵敏性和特异性的方法,PCR 对你的研究只会有害不会有益。

表 1.1 热稳定 DNA 聚合酶、缓冲液、活性和来源

酶和供应商 ^a	外切核酸酶活性 ^b	缓冲液 ^c /pH (mmol/L)	盐浓度 (mmol/L)	二价阳离子 ^c (mmol/L)	其他附加成分 ^d
<i>Taq</i> DNA 聚合酶 ^{B,L,M,N,P,T} <i>Thermus aquaticus</i>	5	10 Tris-HCl/ 8.3	50 KCl	1.5~5.0 MgCl ₂	BSA, NP-40 Tween20
Stoffel 片段 ^P (<i>Taq</i> DNA 聚合酶的 羧基端 544 氨基酸)	0	10 Tris-HCl/ 8.3	10 KCl	2.0~10.0 MgCl ₂	BSA, Tween 20
<i>UITma</i> DNA 聚合酶 ^P <i>Thermotoga maritima</i>	5	10 Tris-HCl/ 8.8	10 KCl	1.5~5.0 MgCl ₂	Tween20
<i>Tth</i> DNA 聚合酶 ^{B,E,P,T} <i>Thermus thermophilus</i>	5	10 Tris-HCl/ 8.3	90 KCl	反转录酶活性 1.0~2.0MnCl ₂ , DNA 合成 2.0 ~4.0MgCl ₂ , 用 EGTA 螯和 Mn ²⁺ 离子	甘油, Tween20, 在 Mn ²⁺ 离子存在 时有较强的 反转录酶活性
<i>pfu</i> DNA 聚合酶 ^S <i>Pyrococcus furiosus</i> (天然)	3	20 Tris-HCl/ 8.2	10 KCl, 6(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5~2.5 MgCl ₂	BSA, Triton X-100
<i>pfu</i> DNA 聚合酶 ^S (重组和 Exo ⁻ 形式)	3 0	20 Tris-HCl/ 7.5	—	8.0 MgCl ₂	BSA
Vent, DeepVent ^N <i>Thermococcus litoralis</i> , <i>Pyrococcus GB-D</i>	3 0	20 Tris-HCl/ 8.8	10 KCl 10(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5~5.0 MgSO ₄	Triton X-100
<i>Tli</i> DNA 聚合酶 ^M <i>Thermococcus litoralis</i>	5	10 Tris-HCl/ 9.0	50 KCl	1.5~5.0 MgCl ₂	Triton X-100
Hot Tub DNA 聚合酶 ^H <i>Thermus ubiquitus</i>	0	50 Tris-HCl/ 9.0	20(NH ₄) ₂ SO ₄	0.7~2.0 MgCl ₂	—
<i>Tfi</i> DNA 聚合酶 ^{E,M} <i>Thermus flavus</i>	5	50 Tris-HCl/ 9.0 或 20 Tris-醋酸/ 9.0	20(NH ₄) ₂ SO ₄ 70 醋酸钾 ^M	DNA 合成 1.5 ~5.0MgCl ₂ , 反转录酶活性, 1.5~5.0 MnSO ₄	0.5% Tween20, 在 Mn ²⁺ 离子存在 时有较强的 反转录酶活性
<i>Pwo</i> DNA 聚合酶 ^B <i>Pyrococcus woesei</i>	3	10 Tris-HCl/ 8.85	20(NH ₄) ₂ SO ₄	1.5~4.0 MgSO ₄	BSA, 不能用 dUTP
<i>Tbr</i> DNA 聚合酶 ^{A,F} <i>Thermus brockianus</i>	5	10 Tris-HCl/ 8.8	50 KCl	1.5~5.0 MgCl ₂	Triton X-100

- a. 酶的名称和从中分离或克隆该酶的微生物名称, 上标中的字母为供应商, 有关供应商的详细信息在附录中给出。A: AmRESCO, B: Boehringer Mannheim, C: CLONTECH, E: Epicentre Technologies, F: Finnzymes OY, H: Amersham, L: Life Technologies, Inc., N: New England Biolabs, M: Promega Corp., P: Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, S: Stratagene, T: TaKaRa (Pan Vara)。
- b. 外切核酸酶活性: 3'→5' 外切酶=3, 5'→3' 外切酶=5, 无外切酶活性=0。Exo⁻=无外切酶活性
- c. 常规扩增所用的缓冲液(室温下)、盐和二价阳离子条件。
- d. 附加成分和对特定酶的评价。

第一节 PCR 实验室的建立

Carl W. Dieffenbach¹, Elizabeth A. Dragon², and Gabriela S. Dveksler³

¹ Division of AIDS, NIAID, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland 20852

² Roche Molecular Systems, Somerville, New Jersey 0887-1700

³ Department of Pathology, Uniformed Services University of the Health Sciences, Bethesda, Maryland 20814

一、简介

PCR 的特性决定了进入反应的唯一 DNA 必须是实验者所加的模板,所以 PCR 应该在一个没有 DNA 的干净环境中进行。污染问题和进行无污染 PCR 所要求的洁净度之间的关系被比喻成操作病原体与好的微生物技术之间的关系(J. Sninsky, pers. comm.),这里主要的差别在于“生物危害”感染的是 PCR 而不是研究者。本节为建立和保持干净的 PCR 环境提供了指南。这种环境是任何以 PCR 为基础的分析系统所需要的,不管其处理的样品数量如何。如果在污染发生以前就照这些建议行事最为有效,如果污染已经成为问题,这里也提供了应付这些问题的策略。

由于 PCR 的应用已发展到了像遗传病的临床诊断(Wang et al. 1992)或监测接受抗反转录病毒治疗病人的病毒量(Piatlak et al. 1993)等领域,显然事先需要有建立 PCR 的设施和监控污染的合理指南。本节的讨论主要针对建立两种类型的实验室——一类实验室从事对污染很敏感的 PCR 分析,像测定样品中靶序列的数量;另一类把 PCR 用作对污染不敏感的分子生物学工具,比如诱发突变一个 DNA 克隆。

事先计划实验室的设计和定位,并且在不同的地点进行 PCR 的目的是为了避免污染,即旧的 PCR 产物对新 PCR 分析的污染、分子克隆的污染和样品与样品之间的污染。至今提出了 4 种防止污染的方法,第一种是把 PCR 的各部分在区域上分为样品制备、前 PCR 区和后 PCR 区(Kwok and Higuchi 1989),这一方法应该是任何污染控制策略的核心部分,并能够放大以适应研究者的需要。将 PCR 过程各部分在区域上分开需要额外的空间、资金和设备来装备和维持一个较大的机构。然而,单单这些还不保险,要防止样品之间的污染还需要良好的实验室操作。第二种方法是使用尿嘧啶 DNA-糖苷酶(UNG),并用脱氧尿苷三磷酸(dUTP)代替脱氧胸苷三磷酸(dTTP),它只对防止 dUTP 标记的 PCR 产物污染有效(Longo et al. 1990)。第三种方法用紫外线,它对任何污染都有效。然而它也有缺陷,它不能消除所有污染,而只能将污染降低几个数量级,并且当 DNA 片段小于 300bp 时效果较差(Sarkar and Sommer 1990, 1991)。最后一种方法是用化学加合物比如异补骨脂素将单链或双链 DNA 衍生化,这些加合物可防止污染的 DNA 作为反应的底物(Cimino et al. 1991)。UNG 和紫外污染控制系统的应用在本章以后的节中讨论(Hartley and Rashtchian; Cone and Fairfax)。记住了这些忠告,我们建议在建立 PCR 实

验室时考虑以下指导意见。

二、PCR 实验室的建立

为了对一个特定序列进行 PCR 作重复检测,需要三个不同的区域,每一个区域的具体技术操作和试剂在下面详细列出。现在对用 PCR 定量检测目的序列,比如人免疫缺陷病毒(HIV)出现了新的兴趣(Piatlak et al. 1993; Mulder et al. 1994)。随着对定量特定 RNA 的兴趣的增长和用 RNA-PCR 测定病毒量的重要性的增加,越来越需要进行可靠的、不污染的 PCR。

1. 样品准备区

这个区域专门用作样品的准备,在制备和操作用于核酸提取的试剂时应该采取如下预防措施:

- 1) PCR 产物和带有要扩增序列的 DNA 克隆不能在这个房间操作。
- 2) 组织培养物、组织标本和血清样品都带进样品准备间处理,以根据应用的需要提取 DNA 或 RNA。
- 3) 用于样品处理的工具不能被用作普通分子克隆的工具,也不能用于操作靶序列。
- 4) DNA 样品应该用有专门防护或正压活塞式移液管操作,以防止在吸取样品时有气溶胶遗留。
- 5) 大体积样品应该用单独包装的无菌一次性移液管吸取。
- 6) 管子打开之前都要简短离心以减少气溶胶的产生,而且管子不能用力崩开,这样会产生气溶胶。
- 7) 任何时候都应该穿实验服和戴手套,手套要经常更换,尤其在抽提过程中每一步之间都要更换。实验服要专门用于样品准备间,经常清洗。

纯化模板所选用的方法对污染的风险有极大的影响。一般而言,只要能够得到可靠的结果,纯化方法越简单越好,因为这样需要较少地操作样品。要永远使用新鲜配制的或者适当贮存的未使用过的试剂或缓冲液来提取核酸,不要使用以前用于别的样品的试剂。

如果你的实验室或研究所没有专门用于样品准备的空间,可以考虑与同事协商借用样品准备的空间和必要的设施,这种安排只能在从未分子克隆过你所感兴趣的序列的实验室进行。虽然其他实验室肯定受到过 DNA 的污染,但如果你的引物不能扩增他们的克隆就无关紧要。这一特别的方法对样品准备和前 PCR 区都有效。

2. 样品准备和 RNA-PCR

RNA-PCR 的额外步骤需要额外的样品操作,这样增加了样品之间污染的机会。为了避免这一问题,反转录一步可以在样品准备区进行。在 RNA-PCR 中应用 UNG 以防止污染的方法也有报道(Pang et al. 1992),这一方法由 Hartley 和 Rashtchian 在本章以后的节中描述。该法在反转录用的是随机六聚引物而不是特异反义寡核苷酸时尤为有效,在这

里样品中的所有 RNA 都被等效地转换成了 cDNA,由于产生的不是一个单的特异的产物,它成为污染源的可能性不大。

反转录反应要用煮沸来终止,这样使反转录酶失活同时使 DNA:RNA 双链变性。或者,也可以用 RNase H 处理来清除 RNA 链,或者通过碱水解。对于多方面的应用, *rTth* 聚合酶可以用来代替传统的反转录酶和 *Taq* DNA 聚合酶两步反应(Myers and Gelfand 1991)。用 *rTth* 聚合酶的优点是明显的:①只有一种缓冲液体系;② dUTP 和 UNG 可以加入到反转录反应中;③由于减少了引物的错误配对,反应的特异性增强了。因为用 *rTth* 时 cDNA 合成反应是在更高的温度下进行。就对 RNA 样品进行大数目的分析的实验室而言,样品处理的减少和污染控制的改进使得 *rTth* 系统成为双酶 RNA-PCR 系统的一个有吸引力的代替者。

3. 前 PCR 区

必须有专门用于准备各种反应的区域,这个区域必须保持干净,而且没有来自分子克隆和样品准备的污染源。前 PCR 区要有试剂和设备,特别是专门用于前 PCR 区的正压活塞式移液管。

每个系或实验室都必须决定其引物或探针是在实验室内合成还是在外部合成,如果实验室内部就具有合成能力,引物的合成和纯化都应该在远离从事 PCR 后活动、样品准备和普通的分子克隆的区域进行。任何上面提到的活动都会导致引物被 DNA 的不经意污染,这种污染不可能去掉,会导致假阳性结果。同样,用于操作引物的移液管应该是专用的。

4. PCR 实验室试剂的操作

应该对准备和保持干净的 PCR 成分给予特殊的重视。

- 1) 所用的所有溶液都应该没有核酸和(或)核酸酶(DNase 和 RNase)污染。为了确保制备的核酸常规情况下能顺利扩增,每种溶液都必须使用高质量的成分,这样可以避免由于重金属离子、核酸酶和其他非特异污染物的引入而引起的麻烦。配制试剂、操作样品、建立反应和以后的检测扩增产物过程中任何时候都要戴手套。
- 2) 所有 PCR 试剂中使用的水都应该是最高质量的——新鲜蒸馏的去离子水,用 0.22 μ m 滤膜过滤的,并且高压灭菌。我们发现过滤并高压灭菌过的 USP 认可的水可以用于 PCR。每一组实验使用一瓶新水也可以避免污染。应该经常检验从水龙头流出的水的导电性和可能的细菌和真菌污染,绝不能认定供应的水是干净的,即使在应用了紫外灭菌的家用蒸馏或去离子水系统中也检测到过明显的细菌污染。记住细菌、真菌和藻类可以在储水系统中生长(如塑料水缸);所以为了减少配试剂所用水的污染机会,总是要使用新鲜收集并处理的水。
- 3) 在 20℃ 到 25℃ 储存的试剂建议加点像叠氮钠一类的抗微生物剂,在扩增试剂或样品制备试剂中加入 0.025% 的叠氮钠不抑制扩增反应。
- 4) 所有试剂都应该以大体积配制,试验一下看试剂是否满意,然后分装成仅够一次使用的量进行储存。使用分装的经过验证的试剂(在合适条件下储存)可以确保实验与实验