

临床 **PCR** 基因诊断技术

主编 丁振若 苏明权



 世界图书出版公司

临床PCR 基因诊断技术

主 编	丁振若	苏明权				
副主编	祝道成	穆士杰	马越云	陈必良		
编 者	于文彬	任力强	陈云春	李 萍	谭庆荣	
	殷晓莉	王利彦	王德堂	马 艳	史宪杰	
	姚 娟	任雨笙	杨 静	王燕宁	冯同喜	
	李琳琳	李绣萍				

世界图书出版公司

西安·北京·广州·上海

(陕)新登字 014 号

临床 PCR 基因诊断技术

丁振若 苏明权 主编

唐娟莉 责任编辑

世界图书出版公司 出版发行

(西安市南大街 93 号 邮编 710001)

国营五二三厂印刷

各地新华书店经销

开本: 787×1092 1/16 印张:13.5 字数:327 千字

1998 年 9 月第 1 版 1998 年 9 月第 1 次印刷

印数:0001—3000 册

ISBN 7-5062-3728-8/R·240

Wx3728 定价:31.00 元

前 言

临床医学实验诊断技术发展很快,随着现代科学技术的进步与发展,临床医学实验诊断技术,已从50年代的第二代生化检验指标作为临床疾病诊断的依据,发展到60年代的第三代免疫学诊断技术,到70年代末80年代初基因重组技术形成了第四代基因诊断技术。聚合酶链反应(PCR)技术,就是基因诊断技术在临床应用最为广泛的技术之一。由于PCR技术具有快速、简便、特异、敏感等优点,使该技术广泛应用于医学遗传学、法医鉴定、微生物学、植物等生命科学的各个领域。PCR技术作为一项临床医学实验诊断方法,为临床疾病的诊断从基因角度提供更加准确的诊断依据。

本书的重点是以临床实用性为目的,从PCR技术的基本原理,引物的设计,临床各种标本中的模板制备,PCR扩增,产物检测方法等,都进行了详细介绍,实验者只要按所述程序操作,便能顺利地完成你所要求的实验项目并获得满意的结果。同时对PCR技术在临床疾病诊断中的应用意义,给予了详细的论述,为临床医生进行疾病的诊断提供方便。本书是作者在参阅国内外大量的文献,并结合多年从事临床PCR实验诊断工作经验的基础上编写而成。它的出版,将为工作在医学临床第一线的医学实验诊断技术人员、临床医生提供一本具有较高价值的参考书。由于我们的学识水平和实践水平所限,在本书的编写过程中差错难免,敬请同行和读者给予指正。

苏明权

1998年6月于中国西安

目 录

第一章 概论	(1)
第一节 PCR 技术的发明	(1)
第二节 PCR 技术的发展	(1)
第三节 PCR 技术基本原理	(2)
第四节 PCR 技术的特点	(4)
第五节 PCR 技术的标准化操作	(5)
第六节 PCR 技术有关影响因素	(11)
第二章 PCR 技术的类型及应用	(14)
第一节 免疫 PCR 技术	(14)
第二节 定量 PCR 技术	(15)
第三节 原位 PCR 技术	(16)
第四节 毛细管 PCR 技术	(20)
第五节 其他种类 PCR 技术	(21)
第六节 几种特殊的 PCR 扩增模式	(23)
第三章 PCR 技术实验条件	(26)
第一节 PCR 引物的设计	(26)
第二节 GOLDKEY 数据库的应用	(28)
第三节 PCR 反应条件的优化	(32)
第四节 DNA 模板制备方法	(34)
第五节 RNA 模板制备方法	(42)
第六节 PCR 扩增产物检测的方法	(45)
第七节 电泳凝胶摄影技术	(62)
第四章 PCR 技术质量控制	(64)
第一节 PCR 污染及预防	(64)
第二节 避免扩增的 DNA 序列交叉污染	(65)
第三节 PCR 技术的室内质量控制	(67)
第四节 PCR 技术的室间质量控制	(69)
第五节 PCR 技术在临床检测中存在的问题及分析	(69)
第五章 基因诊断的临床意义	(74)
第一节 基因诊断的应用范围	(74)
第二节 病毒性肝炎	(75)
第三节 性传播性疾病	(81)

第四节	肺部病原体感染	(85)
第五节	细菌性脑膜炎	(87)
第六节	在癌基因检测中的意义	(90)
第七节	几种特殊癌基因检测意义	(93)
第六章	PCR 检测性病病原体	(106)
第一节	PCR 检测人类免疫缺陷病毒	(106)
第二节	PCR 检测梅毒螺旋体	(110)
第三节	PCR 检测淋病奈瑟氏菌	(112)
第四节	PCR 检测解脲支原体	(113)
第五节	PCR 检测沙眼衣原体	(115)
第六节	PCR 检测单纯性疱疹病毒	(116)
第七节	PCR 检测乳头瘤病毒	(117)
第八节	PCR 检测人类巨细胞病毒	(119)
第九节	PCR 检测白色念珠菌	(121)
第七章	PCR 检测肝炎病毒	(123)
第一节	PCR 检测甲型肝炎病毒	(123)
第二节	PCR 检测乙型肝炎病毒	(125)
第三节	PCR 检测丙型肝炎病毒	(126)
第四节	PCR 检测丁型肝炎病毒	(128)
第五节	PCR 检测戊型肝炎病毒	(129)
第六节	PCR 检测庚型肝炎病毒	(130)
第八章	PCR 检测肠道致病菌	(132)
第一节	PCR 检测霍乱弧菌	(132)
第二节	PCR 检测伤寒杆菌	(133)
第三节	PCR 检测沙门氏菌	(134)
第四节	PCR 检测志贺氏菌	(135)
第五节	PCR 检测出血性大肠杆菌 0157:H7	(136)
第六节	PCR 检测肠毒性产气荚膜杆菌	(138)
第九章	PCR 检测呼吸道致病菌	(140)
第一节	PCR 检测结核分枝杆菌	(140)
第二节	PCR 检测肺炎支原体	(141)
第三节	PCR 检测肺炎衣原体	(143)
第四节	PCR 检测嗜肺军团菌	(144)
第五节	PCR 检测绿脓杆菌	(145)
第六节	PCR 检测肺炎杆菌	(147)
第十章	PCR 检测脑膜炎病原体	(148)
第一节	PCR 检测脑膜炎双球菌	(148)
第二节	PCR 检测新型隐球菌	(149)

第三节	PCR 诊断结核性脑膜炎	(150)
第四节	多重 PCR 诊断细菌性脑膜炎	(151)
第十一章	PCR 检测寄生虫	(153)
第一节	PCR 检测恶性疟原虫	(153)
第二节	PCR 检测阿米巴原虫	(154)
第三节	PCR 检测弓形虫	(156)
第四节	PCR 检测卡氏肺孢子虫	(157)
第五节	PCR 检测间日疟原虫	(158)
第六节	PCR 检测克氏锥形虫	(159)
第七节	PCR 检测利什曼原虫	(161)
第八节	PCR 检测隐孢子虫	(162)
第九节	PCR 检测旋毛形线虫	(163)
第十节	PCR 检测肠内贾第氏虫	(164)
第十二章	PCR 技术在遗传性疾病诊断中的应用	(166)
第一节	PCR 诊断缺失型 α -地中海贫血	(166)
第二节	PCR 诊断非缺失 α -地中海贫血	(167)
第三节	PCR 检测 β -地中海贫血	(168)
第四节	PCR 诊断甲型血友病	(168)
第五节	PCR 诊断乙型血友病	(170)
第六节	诊断苯丙酮尿症	(171)
第七节	PCR 诊断视网膜色素变性	(171)
第八节	PCR 诊断先天性肾上腺皮质增生症	(172)
第九节	PCR 诊断镰状细胞性贫血	(173)
第十三章	PCR 技术在检测肿瘤基因中的应用	(175)
第一节	PCR 检测白血病时 T 细胞受体基因重排	(175)
第二节	PCR 检测白血病时免疫球蛋白重链基因 CDR-序列重排	(177)
第三节	PCR 检测慢性粒细胞性白血病时 bcr-abl 嵌合基因的 RNA 序列	(179)
第四节	PCR 检测常见肿瘤 ras 基因突变	(180)
第五节	PCR 检测常见肿瘤 APC 基因	(185)
第六节	PCR 检测常见肿瘤 C-erb B2 基因	(186)
第七节	PCR 检测常见肿瘤 DNA 聚合酶-基因的突变	(188)
附录 1	PCR 技术所用设备	(190)
附录 2	常用贮存液	(198)
附录 3	PCR 实验常用缓冲液	(201)
附录 4	电泳缓冲液	(204)
附录 5	载样缓冲液	(205)
附录 6	常用裂解液	(206)

第一章 概 论

第一节 PCR 技术的发明

临床分子生物学技术正以惊人的速度发展和应用于生命科学的各个领域。一系列的新技术的兴起，为人类从分子水平上认识生命的奥秘提供了重要的手段。聚合酶链反应（Polymerase chain reaction, PCR）就是目前最广泛而先进的分子生物学技术之一。其发展与应用过程：

1953 年 Watson 和 Crick 根据 X—线衍射图样及各种化学分析的数据，提供了 DNA 双螺旋结构及其半保留复制模型。

1958 年 Meselson 和 Stahl 用实验证实了 DNA 半保留复制模型。

1968 年 Weiss 等和 1970 年 Smith 等先后发现 DNA 的连接酶和限制性内切酶。

1971 年 Khorana 提出在体外经 DNA 扩增设想。

1985 年 Kary. B. Mullis 教授发明了具有划时代意义的 PCR 技术。

1985 年 Saiki 首先应用 PCR 技术成功扩增了人 β -珠蛋白 DNA，并应用于镰刀状红细胞贫血的产前诊断。

1988 年 Saiki 发现耐热 DNA 聚合酶，从此 PCR 技术进入应用阶段。

1988 年毛裕民在我国开始耐热 DNA 酶的研究，同时我国多个实验室进入应用研究。如祝道成博士等应用聚合酶链反应对淋病进行快速诊断的应用研究等。

1993 年 Mullis 获诺贝尔化学奖。

第二节 PCR 技术的发展

聚合酶链反应技术（Polymerase Chain Reaction, PCR）又称无细胞分子克隆或特异性 DNA 序列体外引物定向酶促扩增技术，是基因扩增技术的一次重大飞跃。该项技术 1985 年由美国 PE 公司遗传部的 Kary B. Mullis 教授发明。PCR 技术首先应用于人 β -珠蛋白 DNA 的扩增及镰刀状红细胞贫血病的产前诊断。由于此项技术可将极微量的靶 DNA 特异地扩增上百万倍，从而大大提高对 DNA 分子的分析 and 检测能力，能检测到单分子或对每 10 万个细胞中仅含 1 个靶 DNA 分子的样品，因而，此技术在短短的几年内就广泛的应用于分子生物学、

微生物学、遗传学等生物学的各个领域。PCR 技术自 1988 年在我国开展以来得到了迅速的发展，在临床应用上我国已走在了世界的前面。由于 PCR 技术对医学疾病的诊断能力比任何一种检测方法更优越，至此进行 PCR 技术研究的人员就象 PCR 技术本身一样也呈指数增长。PCR 技术得到如此广泛的发展和应用主要是因为它简单而易于成功，能从疾病的基因内部探测其发病的原因，给临床诊断提供更加有力的诊断依据。

第三节 PCR 技术基本原理

PCR 是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的方法，其特异性是由两个人工合成的引物序列决定的。所谓引物就是与待扩增 DNA 片段两翼互补的寡核苷酸，其本质是 ssDNA 片段。待扩增 DNA 模板加热变性后，两引物分别与两条 DNA 的两翼序列特异复性。此时，两引物的 3' 端相对，5' 端相背。在合适条件下，由 TaqDNA 聚合酶催化引物介导的 DNA 合成，即引物的延伸。这种实验过程是在温度控制下进行的，一个变性—复性—延伸的过程就是一个 PCR 循环。PCR 就是在合适条件下的这种循环的不断重复；延伸的产物经第二循环变性，亦与引物互补，作为引物引导 DNA 合成的新模板；因此，第二循环后延伸的模板由第一循环的四条增为八条，依次类推，以后每一循环后的模板均比前一循环增加一倍。理论上讲 PCR 扩增 DNA 产量是呈指数上升的。

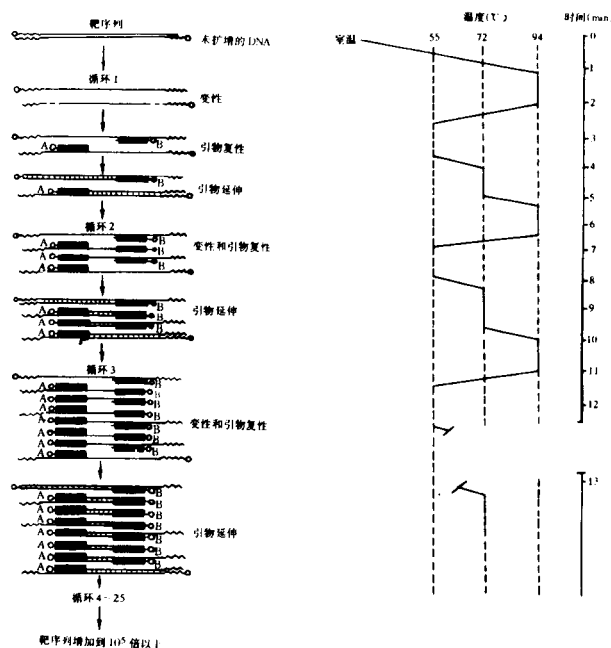


图 1-1 PCR 反应基本原理

右侧曲线为变性、复性、延伸的温度与时间

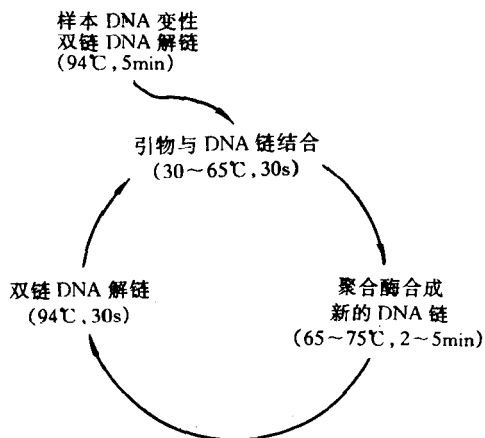


图 1-2 PCR 循环示意图

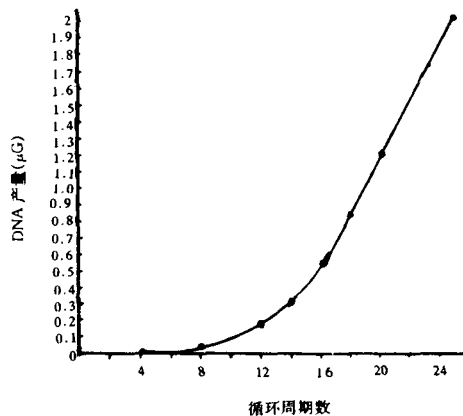


图 1-3 PCR 扩增产物增长曲线

表 1-1 DNA 片段的 PCR 扩增

循 环 次 数	双链靶分子数扩增倍数
1	0
2	0
3	2
4	4
5	8
6	16
7	32
8	64
9	128
10	256
11	512
12	1 024
13	2 048
14	4 096
15	8 192
16	16 384
17	32 768
18	65 536
19	131 072
20	262 144
21	524 288
22	1 048 576
23	2 097 152
24	4 194 304
25	8 388 608
26	16 777 216
27	33 554 432
28	67 108 864
29	134 217 728
30	268 435
31	536 870 912
32	1 073 741 824

扩增倍数 (Y) 可用 $Y = (1+x)^{n-2}$ 公式表示。其中“X”为扩增效率, “n”为循环次数。由于在第 3 次扩增时, 特异性靶序列增加了 1 倍, 所以用此公式计算扩增产物时应取 $n \geq 3$ 。

第四节 PCR 技术的特点

1. **特异性强** 自 1988 年 Saiki 等从温泉水中分离到的水生嗜热杆菌中提取出耐热 Taq DNA 聚合酶以来, 在热变性处理时不被消化、不必在每次循环扩增中再加入新酶, 以在较高温度下连续反应。显著提高 PCR 反应产物的特异性, 序列分析证明其扩增的 DNA 序列与原模板 DNA 一致, 在 PCR 扩增过程中, 单核苷酸的错误掺入程度很低, 其错配率一般只有约万分之一, 足可以供特异性分析。

2. **敏感性高** 从理论上讲 PCR 可以按 2^n 倍数扩增 DNA 十亿倍以上, 实际应用已能被认为是不可检出极微量的靶 DNA 成百万倍以上地扩增到足够检测分析量的 DNA。能从 100 万个细胞中检出一个靶细胞, 或对诸如病人感染部位中只含一个感染细胞的标本或仅含 0.01pg 的感染细胞的特异性片段样品中均可检测出。

3. **快速** 整个 PCR 操作过程需 3~4 小时即可完成。一般标本处理约 30~60min; PCR 扩增 2 小时; 加上产物分析, 可在 4 小时内完成全部试验。对检测标本纯度要求低、不用分离提纯病毒, DNA 粗制品及总 RNA 均可作为反应起始物; 可直接应用于临床标本如: 血液、尿液、分泌物、脱落细胞、粪便、组织等粗制的 DNA 提取物的扩增检测, 省去费时繁琐的提纯过程, 扩增产物用一般的琼脂糖凝胶电泳分析即可。

4. **简便** 扩增产物可直接供作序列分析和分子克隆, 摆脱繁琐的基因分析方法; 可直接从总 RNA 或染色体 DNA 中或部分 DNA 已降解的样品中分离目的基因, 省去常法中须先进行克隆后再作序列分析的模式。已固定和包埋的组织或切片亦可用于检测。

5. **可扩增 RNA 或 cDNA** 先按通常方法用寡脱氧核苷酸引物和逆转录酶将 mRNA 转录成主链 cDNA, 再将得到的单链 cDNA 进行 PCR 扩增。即使 mRNA 转录片段只有 100ng cDNA 中的 0.01%, 也能经 PCR 扩增出 1 μ g 有 242 碱基对长度的特异性片段。有些外显子分散在一段很长的 DNA 中, 难于将整段 DNA 大分子扩增和做序列分析。若以 mRNA 作为模板, 则可将外显子集中, 用 PCR 一次便完成对外显子的扩增并进行序列分析。

6. **对起始材料质量要求低** 由于 PCR 技术具有灵敏度高和特异性强的优点, 故仅含极微量目的 DNA (Pg、ng)、DNA 粗制品或者总 RNA, 都可用以做起始材料来获得较多的目的产物。已部分降解了的 DNA 材料也可通过 PCR 多次循环反应, 最终得到所需要的全长 DNA 片段。

7. **具有一定程度单核苷酸错误掺入** TaqDNA 聚合酶缺少 3'→5' 核酸外切酶活性, 因而不能纠正反应中发生的核苷酸错误掺入; 与大肠杆菌聚合酶 I Klenow 片段相比较, 用 TaqDNA 聚合酶的反应发生错误掺入相对多些。由于发生错误的程度还要受反应条件的影响, 所以对于仅由该酶引发的错误很难精确估计。Tindall 估计每 9000 个核苷酸掺入中发生一次错误, 而每合成 41000 个核苷酸可能导致一次框码移位。但是, 这种错误并不意味着 PCR 产物一定会发生序列改变。Innis 发现, 错误掺入的碱基有终止链延伸的作用倾向, 这就使得发生了的错误不会再扩大。

第五节 PCR 技术的标准化操作

一、PCR 技术扩增体系的基本成分

(一) 引物

PCR 所扩增的靶序列在基因组中的位置和长度是由引物限定的, 因此引物的特异性对扩增产物起决定作用。位于高保守区互补的引物, 可以特异性扩增某一目标 DNA 片段, 可用于目的基因的分离或鉴定, 而随机引物可导致多区域扩增, 产生特异性 PCR 扩增指纹图, 可用于快速基因分型。每项 PCR 扩增目的不同所用引物也不同, 引物的设计与选择, 应注意以下条件:

1. **引物的长度** 寡核苷酸 15—30 个碱基, 一般为 20—24 个碱基。

2. **引物的特异性** 选自靶 DNA 序列两端保守区, 可设计出不同特异性的引物, 如检测病原微生物, 可选择出针对属、种、型的共同抗原基因保守区的引物。应查出亲缘关系密切的微生物相关基因进行比较, 以免发生交叉扩增。

3. **引物的组成** 碱基应随机分布, G+C 含量为 40—60%。引物内不应有互补序列, 以免出现二级结构。引物间也不应有互补序列, 以免形成引物二聚体。尤其在 3' 端不应重叠。引物序列在合成前可用计算机专用软件进行相关性分析, 以确定引物在基因数据库中的特异性程度以及排除自身的影响。

4. **引物的浓度** 在 PCR 反应体系中, 引物的适宜浓度为 0.1—1 $\mu\text{mol/L}$, 引物浓度过高, 则易形成引物二聚体, 会影响 PCR 的特异性, 相反, 如引物浓度过低, 以至不足完成 30 个循环, 则会降低 PCR 的产率。

5. **计算引物使用量 (ng/反应体积) 的方法** 直接使用每反应体积引物的具体量表示引物用量。这种方法一般按每个脱氧核苷酸平均分子量为 330 计算。例如一条 20 个碱基的引物, 其分子量为 $20 \times 330 = 6600$ 。

$$1\text{mol/L} = 6600\text{g/L}$$

$$1\text{mmol/L} = 6.6\text{g/L}$$

$$1\mu\text{mol/L} = 100\text{nmol/L} = 0.66\text{mg/L} = 66\text{ng}/100\mu\text{l} = 33\text{ng}/50\mu\text{l}$$

所以可以按紫外光定量结果直接稀释使用。对新引物来说, 一般根据下列浓度经实验来选择工作浓度。对每一 20 个碱基引物的梯度为:

0.5 $\mu\text{mol/L}$	165ng/50 μl
0.25 $\mu\text{mol/L}$	82.5ng/50 μl
0.1 $\mu\text{mol/L}$	33ng/50 μl
0.05 $\mu\text{mol/L}$	16.5ng/50 μl

(二) Taq DNA 聚合酶

Taq DNA 聚合酶有两种, 一种是以嗜热水生菌中提取天然酶, 另一种是大肠杆菌合成的基因工程酶, 在 PCR 中它们可代替使用。Taq 酶是一种耐热的 DNA 聚合酶, 92 $^{\circ}\text{C}$ 时的半衰期

至少 130 分钟,在不同的实验条件下,此酶的聚合酶活性为每秒 35—100 个碱基,在 70℃ 延伸时,链的延伸速度每秒可达 60 个碱基。在 100 μ l 标准体积的反应液中,一般加 Taq DNA 聚合酶 2.5U,足以达到每分钟链延伸 100—4000 个碱基,Taq DNA 聚合酶除了聚合作用外,还具有 5'—3' 外切酶活性,但缺乏 3'—5' 外切酶活性,因此不能纠正链延伸过程中核苷酸的错误掺入。估计每 9000 个碱基出现一次错误,而合成 41000 个核苷酸可能导致一次框码移位。由于错误掺入碱基有终止链延伸的倾向,这就使得发生了的错误不会继续扩大。使用耐热 Taq DNA 聚合酶有如下优点:

1. **简便操作** 因为 Taq DNA 聚合酶能抵抗 PCR 每次循环开始时双链 DNA 变性所需高温 (94—95℃) 的反复处理,所以就不需要在每次循环中添加新鲜酶。这样,大大简化了 PCR 操作程序。只要将一次性配制的反应系统置于自动化热循环仪,即可实现 PCR 自动化。

2. **提高退火温度,增加 PCR 特异性** Klenow 酶的最适温度为 37℃,在此温度下引物与模板形成错配双链,而多数这类错配的引物都足以稳定到被 klenow 酶延伸,由此产生非特异性扩增产物。根据 Acharf 等的实验报告,用 Klenow 酶的 PCR 虽然可以将靶 DNA 序列扩增 200,000 倍,但实际上 PCR 产物中仅约 1% 才是靶序列。在这种情况下,PCR 产物需用特异性探针的杂交反应进行分析。与此相反,Taq DNA 聚合酶的最适温度为 72℃,引物能在较高的温度下与模板结合并延伸。在较高的温度下,引物与模板错配的概率就小,减少了与模板错配引物的延伸,从而增加了 PCR 特异性。其扩增产物经凝胶电泳后在紫外灯下常呈现一条溴化乙锭染色的荧光带。

3. **延长到达平台的循环次数,提高 PCR 产量** PCR 循环后期由于酶量渐感不足而使扩增片段停止指数增长,而达到平台期。在 PCR 中用 Taq DNA 聚合酶代替 Klenow 酶,由于 PCR 特异性的增强,降低了非目的产物对酶和引物的竞争作用。在用 1 μ g 基因组 DNA 做模板的 Taq DNA 聚合酶中,约经 30 次循环到达平台,而在 Klenow 酶 PCR 中则经 20 次循环就到达平台。所以与 Klenow 酶相比,Taq PCR 的扩增产量较高。

4. **Taq DNA 能扩增序列较长的靶 DNA 序列** 应用 Taq DNA 聚合酶,退火引物沿模板延伸在 70—75℃ 下进行。在这样高的温度下,模板链不易形成二级结构,这可能是 Taq DNA 可扩增较长序列的原因。实验证明,用 Klenow 酶能扩增的最长序列约 400bp,而用 Taq DNA 聚合酶则能增长至 10Kb 的 DNA 序列。

与 Klenow 酶相比,Taq DNA 聚合酶的缺点是它没有 3'→5' 外切核酸酶活性。如果在模板延伸过程中发生 dNTP 的错掺率约为 2×10^{-4} ,也即每掺入约 2×10^4 个单核苷酸,就有一个单核苷酸错配。由于 PCR 的产量很高,而错配产物在 PCR 总产物中仅占很小的比例。因此,对 PCR 产物的分析而言,这一错掺率并不是一个严重的问题。但是,PCR 产物如用于克隆,含有错配核苷酸的产物克隆后,所有该克隆的 DNA 都会带有相同的“突变”。在这种情况下,减低错掺率就显得重要了。通过增加模板分子,减少循环次数和减低 DNA 合成的总量可以减少 PCR 反应中错配产物的形成。

5. 模板 DNA

PCR 的起始材料可以是单链或双链 DNA。如果起始材料是 mRNA,则先要通过逆转录获得 cDNA,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。常用的 PCR 样品为从细胞提取的整个基因组 DNA。PCR 样品 DNA 不需要纯化,细胞加热所释放的 DNA 就可直接应用。如用 DNA

粗品，应避免混有任何蛋白酶、核酸酶、DNA 聚合酶抑制剂及能结合 DNA 的蛋白质。用纯化的 DNA 做 PCR 样品，由于增加了模板分子的浓度，除去了会抑制 PCR 反应的杂质，因而可提高 PCR 扩增的成功率。提取 DNA 的基本过程是：用蛋白酶 K (Proteinase K) 及 SDS，在 EDTA 存在的条件下，裂解细胞，消化蛋白质，使核蛋白解聚及胞内 DNA 酶失活。然后用酚/氯仿多次提取去除蛋白质。在 DNA 中若混有少量 RNA，可用 RNA 酶去除。最后，用乙醇沉淀得到纯 DNA。在提取中应尽量保持 DNA 的完整性和纯度，防止 DNA 降解。要被扩增的 DNA 特定序列也不需要事先从样品 DNA 中分离。因为 PCR 产物的序列，也即反应的特异性是由寡核苷酸引物所决定。

PCR 所需 DNA 的量极微，不到 $1\mu\text{g}$ 的基因组 DNA 序列，就足以进行 PCR 分析。PCR 甚至可以从 1 个 DNA 分子扩增特定的 DNA 序列。DNA 分子只要不与核酸酶接触，它是非常稳定的。正因为 DNA 的稳定性，科学家们用 PCR 技术可以从石蜡包埋 40 多年的宫颈癌活检组织中检测出人乳头瘤病毒 (HPV) DNA，可以从多年前的血斑分析苯丙酮尿症，甚至从几千年前的埃及木乃伊中分离出来的 DNA 也能用做 PCR 样品进行扩增。

(三) 4xdNTPs

PCR 反应体系中的 4xdNTPs (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP) 是提供靶 DNA 序列扩增的原料。dNTP 贮存液的 pH 应为 7.0，以保证反应的 pH 值不低于 7.1。中性 dNTP 溶液可以从 USB、Sigma 和 Pharmacia 等公司购得，但价格昂贵。如购买游离核苷酸冻干粉，自配溶液，则可节省很多开支，但溶液必须用 1mol/L NaOH 将 pH 调至 7.0，再用紫外光吸收法准确地测定其浓度。在反应体系中每种脱氧核苷三磷酸的浓度以 $50\text{--}200\mu\text{mol/L}$ 为宜，而且 4 种 dNTP 的浓度应相同。dNTP 浓度过高，有可能造成非靶位置启动和延伸时核苷酸的错误掺入，而且当 dNTP 浓度高于 50mmol/L ，还会抑制 Taq 酶的活性。dNTP 的浓度不能低于 $10\text{--}15\mu\text{mol/L}$ ，浓度过低会影响扩增产量。4 种 dNTP 中任一种浓度偏高或偏低，都会导致核苷酸的错误掺入，降低合成速度，过早终止反应。

在一个 $100\mu\text{l}$ 的标准反应体系中，浓度为 $50\mu\text{mol/L}$ 和 $200\mu\text{mol/L}$ 的 dNTP，就足以分别合成 $6.5\mu\text{g}$ 和 $25\mu\text{g}$ 的 DNA。

(四) 缓冲液及其他成分

PCR 反应系统中一般建议用 $10\text{--}50\text{mmol/L}$ Tris-HCl 缓冲液 (20°C 时 $\text{pH}8.3\text{--}8.8$)。Tris 是一种双极离子缓冲液， 20°C 时的 pK_a 值为 8.3， ΔpK_a 为 $-0.021/^\circ\text{C}$ 。这样， 20°C 时 pH 为 8.3 的 20mmol/L Tris 缓冲液在 PCR 典型的热循环条件下，其真正的 pH 值为 $7.8\text{--}6.8$ 。

PCR 反应系统中 Mg^{2+} 的浓度十分重要，因为它会影响引物退火、模板和 PCR 产物双链的变性温度、PCR 产物的特异性、引物二聚体的形成以及酶的活性和错掺率。适宜的 Mg^{2+} 浓度为高于 dNTP 总浓度 $0.5\text{--}2.5\text{mmol/L}$ ，当各种 dNTP 浓度为 0.2mmol/L 时，建议 Mg^{2+} 的浓度为 1.5mmol/L 。 Mg^{2+} 浓度过高，容易生成非特异性扩增产物；反之，浓度过低会使产量降低。反应体系中 Mg^{2+} 有效浓度受到系统中酶螯合剂 EDTA 和高浓度的磷酸根的影响。因为它们可与 Mg^{2+} 结合从而降低 Mg^{2+} 的有效浓度。一般用作模板的 DNA 应溶于 10mmol/L Tris-HCl ($\text{pH}7.6$)， 0.1mmol/L EDTA 中，如在 PCR 反应中用高浓度的 DNA 及 dNTP，则必须相应的调整 Mg^{2+} 浓度。

二、DNA 的 PCR 扩增方法

PCR 是体外扩增 DNA 的方法。标准的 PCR 反应体系体积为 100 μ l, 在 0.5ml 体积的微量离心管中进行。由于一些鉴定实验或临床诊断中只要求快速定性, 因此 PCR 反应体积又常用 50 μ l 甚至 25 μ l。容器除微量离心管, 也可用毛细管。PCR 扩增仪也发展出多种多样, 其加热原理有水浴、半导体变温铝或热空气等, 其本质都是提供一个“变性—复性—延伸”的温度循环。

(一) 试剂

10 $\times$ PCR 缓冲液

500mmol/L KCl

100mmol/L Tris—HCl (pH8.3, 室温)

15mmol/L $MgCl_2$

0.1% 明胶

dNTPs 溶液(各 1.25mmol/L)

引物(各 5 μ mol/L)

样品 DNA

TaqDNA 聚合酶

液体石蜡

表 1—2 PCR 扩增 DNA 加样方法

成 份	体 积	终 浓 度
灭菌双蒸水	23 μ l	
10 $\times$ PCR 缓冲液	5 μ l	
100mmol/L Tris—HCl		10mmol/L Tris—HCl
500mmol/L KCl		50mmol/L KCl
0.1% 明胶		0.1% 明胶
15mmol/L $MgCl_2$		1.5mmol/L $MgCl_2$
dNTPs 混合物	8 μ l	各 0.2mmol/L
1.25mmol/L dATP		
1.25mmol/L dTTP		
1.25mmol/L dGTP		
1.25mmol/L dCTP		
引物 1	2 μ l	0.2 μ mol/L
20 个碱基: 5 μ mol/L = 33 μ g/ml		
引物 2	2 μ l	0.2 μ mol/L
20 个碱基: 5 μ mol/L = 33 μ g/L		
模板 DNA	10 μ l	
(94 $^{\circ}$ C 作用 5 分钟, 高速离心 10 秒)		
TaqDNA 聚合酶	0.2 μ l	1U/50 μ l 反应体积
液体石蜡	50 μ l	

(二) 设备、材料

PCR 扩增仪

紫外检测仪

微量可调加样器

塑料吸头

微量离心管

(三) 加样方法

取 0.5ml 体积的微量离心管，按下表顺序将各反应成份混合，总体积 50 μ l。当检测 多份样品时，可将各成份按总量混合后分装，再分别加入样品 DNA（表 1—2）。混匀离心，72℃ 反应 2 分钟后即可进行循环。将微量离心管放入 PCR 扩增仪，进行 循环扩增。循环参数见表 1—3。

表 1—3 扩增不同长度 DNA 片段所用循环参数

	扩增产物长度			
	100bp	500bp	1000bp	2000bp
94℃ 变性反应	30 秒	30 秒	1 分钟	1 分钟
55℃ 复性反应	30 秒	30 秒	1 分钟	1 分钟
72℃ 延伸反应	30 秒	38 秒	2 分钟	3 分钟

一般作 25~30 个循环即可（扩增约 10^6 倍）。经 30 个循环后。进行最后一个循环时，72℃ 延伸反应增加 5 分钟。反应结束后，取出反应管，使之冷却到室温后放于 4℃ 保存。并进行扩增产物的检测和分析，如凝胶电泳分析、核酸探针杂交、基因克隆及 DNA 序列分析等。

三、RNA 的 PCR 扩增方法

(1) cDNA 第一链的合成：反应体积为 20 μ l，成分如下：

样品总 RNA 或 mRNA	1~10 μ g
10 $\times$ 逆转录酶缓冲液	2 μ l
AMV 逆转录酶	20U
RNasin	20U
dNTPs	2 μ l
下游引物	10~50pmol
去离子水补至	20 μ l
42℃ 反应	30~60min

(2) 95℃ 灭活逆转录酶 10min

(3) PCR：

上述逆转录产物	20 μ l
10 $\times$ PCR 反应缓冲液	10 μ l
上游引物	10~50pmol

Taq 酶

2.5U

去离子水补至

100 μ l

(4) 混匀后加 100 μ l 矿物油, 在适当温度参数下扩增 30~35 个循环。

(5) 应用 2% 琼脂糖或 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。

四、循环参数

PCR 扩增是由变性、退火和延伸三个步骤反复循环而实现的。所谓循环参数是指循环中每一步骤的温度和时间, 以及循环次数。确定正确的循环参数是 PCR 成功的保证。

1. 变性温度和时间

模板 DNA 和 PCR 产物的变性不完全, 是 PCR 反应失败最常见的一个原因。在变性步骤, 使温度达到双链 DNA 完全分离的变性条件是 95 $^{\circ}$ C, 30s。对 GC 含量多的靶 DNA 序列, 宜用较高的变性温度。在解链温度下, DNA 的变性仅需几秒。但是, 使反应管内达到解链温度还需要一定的时间。这可用一根微探针温差链会很快恢复, PCR 产物就会明显减少。反之, 过度变性也是不必要的。变性温度过高、时间过长, 会加快酶的失活。原则上变性步骤应高温、短时, 即要保证变性充分, 又要保持聚合酶在整个反应中的活性。

2. 引物退火

引物退火的温度和时间取决于引物的长度、碱基组成及其在反应体系中的浓度。一般退火温度低于扩增引物的降解温度 (T_m) 5 $^{\circ}$ C。对 GC 含量约 50%, 长 20 个碱基的典型寡核苷酸引物而言, 最佳的退火温度为 55 $^{\circ}$ C。在温度较高的条件下退火, 可减少引物与模板的错配, 提高 PCR 的特异性。在典型的 PCR 反应体系中, 引物的浓度为 0.2 μ mol/L, 在这一引物过量的条件下, 退火可在瞬间完成。

3. 引物延伸

引物延伸是 DNA 聚合酶将脱氧单核苷酸逐一地加到引物的 3'-OH 末端, 依据模板序列合成一条互补新链的过程。引物延伸温度取决于 DNA 聚合酶的最适温度。如用 Taq DNA 聚合酶, 一般取 70—75 $^{\circ}$ C, 常用 72 $^{\circ}$ C。在 72 $^{\circ}$ C 时, 1 分钟延伸时间足以合成 2Kb 的序列。延伸步骤的时间则取决于靶序列的长度、浓度和延伸温度。靶序列越长、浓度越低、延伸温度越低, 则所需的延伸时间越长; 反之, 靶序列越短、浓度越高、延伸温度越高, 所需的延伸时间则越短。在相同的延伸温度下, 循环早期因靶序列, 也即酶的底物浓度低, 根据酶反应动力学, 反应速度较慢, 所以延伸时间就要长些。但是, 在循环后期, 当 PCR 产物的浓度超过酶的浓度 (1nmol/L) 时, 酶被底物饱和, 为了增加酶的周转利用, 延伸时间也要长些。一般而言, 每 1000 个碱基的序列, 延伸时间 1 分钟便足够了。对于扩增 100—300 个碱基的短序列片段, 可省去延伸温度这一步骤, 而采用快速简便的变性、退火双温循环。这是因为 Taq DNA 聚合酶即使在退火温度下仍保持很强的活性, 而延伸过程可在退火温度转变为变性温度的过程中完成。

有时引物较短, 只有 12—15 个碱基, 其退火温度也较低, 约 40—45 $^{\circ}$ C。这样短的引物在常用的 72 $^{\circ}$ C 延伸温度下不可能保持退火状态。这时可将反应物在 50—60 $^{\circ}$ C 时进行保温, 或将温度从 40 $^{\circ}$ C 逐渐升高到 72 $^{\circ}$ C, 利用 Taq DNA 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, 然后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸。在设定以上循环参数时, 还应考虑到所用的热循环