

PCR

基因扩增 实验操作 手册

朱 平 主编

Q523
ZP

中国科学技术出版社

PCR基因扩增实验操作手册

朱 平 主 编

中国科学技术出版社

内 容 提 要

多聚酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是近几年发展起来的先进的快速体外基因扩增技术, 已经在很短的时间里, 迅速进入生命科学、医学研究、遗传工程、疾病诊断、法医学、考古学等各个领域。几年来有关PCR工作的文献在成倍扩充, 已经涉及到了各个学科, 很需要一个各实验室都能通用的手册。一些从事与分子生物学有关的不同行业的学者, 从我国实际状况出发, 结合自己的经验, 编写了这本手册。本书有系统地介绍PCR的各种方法和应用, 包括9个部分: 基本原理和方法, PCR基因扩增在研究中的应用, 遗传学疾病, 肿瘤性疾病, 法医学, 各种病毒和支原体诊断, 细菌和真菌病原体的鉴定, 农业中的应用, 以及PCR的常用设备和实验室条件。书中详尽介绍了各种实际应用中的PCR条件, 引物的序列和选择原则, 希望所有从事PCR的有经验的专家和初入此道的新手都能从本书中找到有用的资料。

(京) 新登字175号

PCR基因扩增实验操作手册

朱 平 主 编

责任编辑: 许 慧

插 图: 刘玉江

中国科学技术出版社出版 (北京海淀区白石桥路32号)

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经销

解放军运输工程学院印刷厂印刷

开本: 850×1168毫米 1/32 印张: 20 插页: 1 字数: 520千字

1992年1月第1版 1992年1月第1次印刷

印数: 1—5,000册 定价: 12.95元

ISBN 7-5403-0691-X/Q·23

PCR基因扩增实验操作手册

主 编：朱 平

副主编：刘权黎 董兆文 刘乐宇

作者：(以各章第一作者姓氏笔画为序)

丁 焰 (公安部第二研究所 北京 100038)

王连刚 吴保仁 (四军大西京医院 西安 710032)

王美岭 (山东医科院基础所 济南 250001)

王保成 (济南军区总医院 济南 250031)

王槐春 (军科院情报所 北京 100850)

朱 平 (天津第二医学院 天津 300203)

朱圣庚 (北京大学生物系 北京 100871)

朱恃贵 王秀琴 吴 昊 (医科院肿瘤所 北京 100021)

纪立农 (北京医科大学人民医院 北京 100044)

成卓敏 (农科院植保所 北京 100094)

李明发 (南京铁道医学院 南京 210009)

李银太 (军科院五所 北京 100071)

杜绍财 陶其敏 (北京医科大学肝病研究所 北京 100044)

刘乐宇 (北京医科大学人民医院 北京 100044)

刘权黎 (南开大学 天津 300071)

刘志萍 (天津第二医学院 天津 300203)

刘艳平 (哈尔滨医科大学附一院 哈尔滨 150001)

刘敬忠 (医科院基础所 北京 100005)

刘福森 (南开大学分子生物所 天津 300071)

肖 岗 (中科院遗传所 北京 100101)

张丽珊 蒋 清 (南京铁道医学院 南京 210009)
张美兰 (上海医学遗传研究所 上海 200040)
张燕玲 (天津第二医学院 天津 300203)
金坤林 (北京医科大学血液病研究所 北京 100044)
陈 虹 (北京儿童医院 北京 100020)
陈 明 (中国医科大学 沈阳 110001)
宋文源 (中科院遗传所 北京 100101)
吴雪琼 (解放军307医院 北京 100091)
吴振声 (天津医学院 天津 300070)
郑永晨 (白求恩医科大学一院 长春 130021)
严 真 (第四军医大学 西安 710032)
杨道理 (济南军区总医院 济南 250031)
赵 洪 (南开大学 天津 300071)
唐 榕 毛裕民 (复旦大学遗传所 上海 200433)
韩金祥 (山东医科院基础所 济南 250001)
董兆文 (国家计生委科技所 北京 100081)
穆士杰 (第四军医大学西京医院 西安 710032)

序

分子生物学是一门彻底革新的学科，从分子水平解释和阐明生命现象。它的发展有着漫长的历史，但是近20年来突飞猛进，是生命科学的一项重要生长点。1976和1977年，cDNA克隆技术和珠蛋白基因的相继发现，使分子生物学更加迅速、广泛地渗透到医学各个学科，揭示了许多新现象和新事实，成为生理状况、病理状况以及药物作用原理的理论基础，如分子遗传学，分子生理学、分子生物化学、分子免疫学、分子病毒学、微生物学、分子病理学、分子毒理学、分子寄生虫学以及分子血液学和分子肿瘤学等等。

众所周知，分子生物学的研究需要较昂贵的仪器设备和试剂，这就限制了这些先进技术在临床上的推广应用。1985年Saiki首先描述了多聚酶链反应(Polymerase Chain Reaction, 简称PCR) 基因扩增实验，建立了比较简易、经济的检查方法，是基因分析技术的一项重大突破，迅速扩大到医学、遗传学、法医学，农学以及其它学科，受到全世界学者的重视。

我国学者也重视了这一重大进展，相继开展这项先进技术并且取得了一些成绩。天津第二医学院朱平副教授等及时组织了全国从事这项工作的学者们编写这本“PCR基因扩增实验操作手册”，比较系统地介绍了PCR的原理，基本技术以及我国学者们的经验。无疑，这对应用和发展这项新技术将有重要的参考价值。我深信这本手册的出版，将进一步推动这项工作的开展，提高我国分子生物学发展水平。同时也殷切希望我国生物学、医学、农学等方面的科学工作者在研究和应用这项技术过程中，有所前进，有所创新。

陈文杰

1991年6月25日

前 言

多聚酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是近几年发展起来的先进的快速体外基因扩增技术, 已经在很短的时间里, 迅速进入生命科学、医学研究、遗传工程、疾病诊断、法医学、考古学等各个领域。尽管PCR在理论上看来并不很复杂, 但是几年来文献成倍扩充, 已经涉及广泛的多个学科, 很需要一个各实验室都能通用的手册。我们从我国实际情况出发, 参考国内外的文献并结合我们自己的经验, 希望尽可能多介绍一些先进而且可靠的方法供同行们参考。在本书雏形完成过程中, 由医学科学院基础研究所发起的全国首届PCR学术研讨会在1991年6月召开。会上成百篇论文反映了我国的PCR工作奋起直追, 取得了可喜的进展和宝贵的经验。在会上承蒙从事各个领域工作的专家慷慨承担, 介绍他们的宝贵经验和研究进展, 使本书大大增色。

本书有系统地介绍PCR的各种方法和应用, 包括9个部分: 基本原理, PCR基因扩增在研究分子生物学, 遗传学疾病, 肿瘤疾病, 法医学, 各种病毒和支原体诊断, 细菌和真菌病原体的鉴定, 农业中的应用, 以及PCR的常用设备和实验室条件。书中详尽介绍了各种实际应用中的PCR条件, 引物的序列和选择原则。我们希望所有从事PCR的有经验的专家和初入此道的新手都能从本书中找到有用的资料。

本书的宗旨是编写一本简明实用的工具书, 供与生物技术、遗传工程、分子生物学、医学遗传学、临床检验学、计划生育等有关的工作者和科研人员参考, 限于主编的水平有限, 深度和广度上都未必能反映PCR取得的飞速进展, 请同行们批评指正。

主编

1991 . 7

目 录

序

前言

第一部分 基本方法

1. PCR基因扩增的原理.....	(1)
2. PCR基因扩增的反应成分和 作用.....	(7)
3. 染色体基因组扩增.....	(15)
4. PCR扩增模板的 制备 (体液)	(25)
5. 用石蜡包埋组织制备样本.....	(31)
6. 远古DNA的扩增.....	(34)
7. RNA的多聚 酶 链反应.....	(41)
8. cDNA末端快 速 扩 增 (RACE)	(47)
9. PCR引物设计 原则.....	(57)
10. DNA扩增的简并引物.....	(62)
11. 耐热DNA多聚 酶.....	(69)
12. DNA多聚酶在PCR中的应用条件.....	(75)
13. 用简并引物进行cDNA克隆.....	(85)
14. 用 dGTP类似物进行PCR 扩 增.....	(92)
15. 竞争性PCR做mRNA定量.....	(97)
16. 定 量 PCR (内参标法)	(106)
17. 不对称PCR产生单链DNA.....	(112)
18. 用PCR克隆基因片 段.....	(117)
19. 双标记寡核苷酸结合实验.....	(123)
20. 彩色PCR 技 术.....	(129)
21. 探针和引物的非同位素标记.....	(133)

22. 生物素标记dUTP掺入..... (143)
23. 点杂交法检测PCR产物..... (147)

第二部分 PCR在分子生物学研究中的应用

24. PCR扩增显微切割染色体所得DNA..... (153)
25. PCR模板体外转译实验..... (156)
26. 重组PCR..... (162)
27. 锚定多聚酶链反应..... (168)
28. DNaseI足迹法..... (171)
29. 用Taq DNA多聚酶测序..... (175)
30. 用噬菌体启动子直接测序..... (180)
31. 变性梯度凝胶电泳鉴定DGGE DNA多态性... (186)
32. 反向PCR (染色体步移) (194)
33. 同源性重组的检测..... (200)
34. RNA转录扩增和小珠夹心杂交检测法..... (205)
35. 应用单个精子或双倍体细胞进行单倍型分析... (212)
36. 扩增核蛋白体RNA基因进行分子进化研究... (218)
37. PCR研究真菌种系发育..... (224)

第三部分 PCR分析遗传类型和疾病

38. 甲型血友病的基因诊断和产前诊断..... (231)
39. 苯丙酮尿症的诊断..... (236)
40. 巴氏水肿胎儿的产前基因诊断..... (239)
41. β -地中海贫血的基因诊断..... (242)
42. HLA基因的多态性分析..... (252)
43. 应用多重PCR诊断中国人DMD基因缺失..... (301)
44. 检测线粒体DNA突变引起的Leber's遗传性视
神经病..... (306)
45. 胎儿性别鉴定..... (310)

46. 性连锁鱼鳞病基因突变的检测…………… (315)
47. 以可变的简单序列丛诊断强直性肌营养不良… (318)

第四部分 肿瘤

48. PCR扩增免疫球蛋白重链基因CDR-序列检测
B-淋巴系统白血病和淋巴瘤…………… (323)
49. 应用PCR技术扩增T细胞受体基因重排………… (332)
50. PCR检测慢性粒细胞白血病abl/bcr嵌合基因的
mRNA序列…………… (339)
51. 分析ras基因点突变…………… (345)
52. B细胞淋巴瘤t(14; 18)染色体重排…………… (360)
53. PCR技术诊断视网膜母细胞瘤…………… (365)

第五部分 法医学

54. 微量法医检材DNA制备…………… (371)
55. 应用PCR和序列分析技术确定血缘关系………… (376)
56. 扩增片段长度多态性分析在法医学中的应用… (385)

第六部分 病毒和支原体

57. 检测人类T-细胞淋巴瘤/白血病病毒…………… (393)
58. 人类免疫缺陷病毒的检测…………… (400)
59. 乙型肝炎病毒RNA的测检…………… (406)
- 60(A). 检测丙型肝炎病毒…………… (414)
- 60(B). RNA PCR检测丙型肝炎病毒RNA及其
临床应用…………… (418)
- 61(A). 生殖系统的人类乳头瘤病毒的检测和分型
…………… (426)
- 61(B). PCR检测第16、18型人类乳头瘤病毒………… (435)
- 62 检测人巨细胞病毒感染…………… (439)

63. 检测肠道病毒·····	(445)
64. 检测新病毒·····	(450)
65. 应用 PCR 技术扩增和定型粪便标本中的轮状病毒 ·····	(458)
66. 人类细小 DNA 病毒 B19 的检测 ·····	(465)
67. 检测腺病毒·····	(470)
68. 肺炎支原体检测·····	(475)

第七部分 细菌和真菌

69. 从真菌菌丝或单个孢子中分离 DNA·····	(479)
70. PCR 和基因探针方法检测环境水样的致病菌···	(484)
71. 检测莫氏立克次体·····	(491)
72. 检测博氏疏螺旋体·····	(495)
73. 检测痢疾性腹泻病原菌·····	(502)
74. 快速检测产 VT 毒素大肠杆菌·····	(511)
75. 肠毒素型 (LT) 大肠杆菌的检测·····	(516)
76. PCR 检测结核和其他分支杆菌病方面的应用 ·····	(521)

第八部分 农业

77. 应用 PCR 法于大麦黄矮病毒 (BYDV) 核苷酸序列 分析和病毒外壳蛋白基因全长 cDNA 的合成·····	(533)
78. PCR 分析水稻核糖体基因的第一转录间隔区···	(539)
79. PCR 检测携带大麦黄矮病毒 (BYDV) 的单头蚜 虫介体·····	(543)

第九部分 装备和应用

80. PCR 实验室 组 建·····	(547)
81. PCR 基因扩增仪·····	(550)

82. 计算机辅助 PCR 引物设计.....	(562)
83. PCR 引物的合成.....	(568)
84. PCR 引物的分离和纯化.....	(574)
85. 设备和 PCR 常用试验技术.....	(580)
86. 常用试剂配制.....	(593)
附录: 名词解释.....	(608)

PCR基因扩增的原理

概 述

多聚酶链式反应,英文缩写为PCR(Polymerase Chain Reaction),又称无细胞分子克隆法,是近年发展起来的一种快速的特定DNA片段体外扩增法。这种方法操作简单,能在普通实验室完成,结果比较可靠。因此,PCR在数年内迅速地进入生命科学、医学工程、遗传工程、疾病诊断、法医学和考古学等各个领域。通常的DNA扩增法是分子克隆法,首先要构建含有目的基因的载体,然后将它导入细胞后进行扩增,还要用同位素探针进行筛选。这种方法,要经过DNA内切、连接、转化和培养等相关的过程,操作复杂,一般需要数周时间。而PCR扩增法,只需要数小时,就可以用电泳法检出0.1 μ g基因组DNA中仅含数个拷贝的模板序列。PCR的操作简述如下:在微量离心管中,加入适量的缓冲液,微量的模版DNA,四种脱氧单核苷酸(dNTP)溶液,耐热性多聚酶, Mg^{2+} 和两个合成DNA的引物。将上述溶液加热,使模板DNA在高温下(如95 $^{\circ}C$)变性,双链解链,然后降低溶液温度,使合成引物在低温下(如37 $^{\circ}C$)与模板DNA互补退火,形成部分的双链;溶液反应温度升至中温(如72 $^{\circ}C$),在Taq多聚酶的作用下,以dNTP为原料,以引物为复制的起点,模板DNA的一条双链,在解链和退火之后延伸成为两条双

链。如此重复改变反应温度，即高温变性、低温退火和中温延伸三个阶段，这三次改变温度为一个循环，每一次循环使特异区段的基因拷贝数放大一倍。一般样品是经过30次循环，最终使基因放大了数百万倍。将扩增产物进行电泳，经溴化乙锭染色，在紫外灯照射下肉眼能见到扩增特异区段的DNA带。

PCR历史沿革

1958年Kormberg分离出DNA多聚酶，这是第一个可在试管中合成DNA的酶。科学家们设想有可能利用DNA多聚酶来制造大量的DNA。但当时难以获得寡核苷酸引物，同时测定DNA的序列亦很困难。1983年Mullis发现了多聚酶链式反应，1984年他申请了专利，1987年获得了专利。关于PCR最早报道是在1985年，Saiki用于检测镰刀贫血病。PCR扩增法，需要在高温下使模板DNA变性，而通常的DNA多聚酶在高温下都已失活，因此必须在每一次热循环之后加入新的多聚酶，这非但操作费时，而且容易造成差错。1976年Chien分离出热稳定多聚酶。1986年Erllich分离并纯化了适用于PCR的Taq热稳定性多聚酶，1988年获得了专利。1988年Saiki开始使用耐热性多聚酶Taq进行PCR扩增，从此PCR进入实用阶段。毛裕民报道，1988年复旦大学开始进行耐热性多聚酶的研究，随后研制出适用于PCR用的FD多聚酶。90年代末，序列分析的自动化和DNA合成的自动化，又给PCR的发展以巨大的推动力，几年来有新的发展。截至1990为止，发表的PCR文章有千篇以上。1989年美国《Science》杂志由Guyer著文誉名1989年为《分子年》，列PCR为十余项重大科学发明之首，比喻1989年为PCR爆炸年。

DNA的组成和结构

DNA的基本结构单位是脱氧核苷酸，脱氧核苷酸有碱基、

磷酸和脱氧核糖。其中碱基有四种：腺嘌呤（A）、鸟嘌呤（G）、胞嘧啶（C）和胸腺嘧啶（T）。DNA片段是一条多聚脱氧核苷酸的长链。DNA链的形成主要由一个脱氧核苷酸上的5'—磷酸基和另一个脱氧核苷酸上的3'—羟基共价键连接，是相当稳定的。自然界中的DNA是以双螺旋结构形成存在的。DNA双螺旋结构主要有两条互补的多聚脱氧核苷酸链，并由氢键的作用配对在一起。碱基的配对是固定的：A—T相配，G—C相配。A和T配对之间有两个氢键，G和C配对之间有三个氢键。

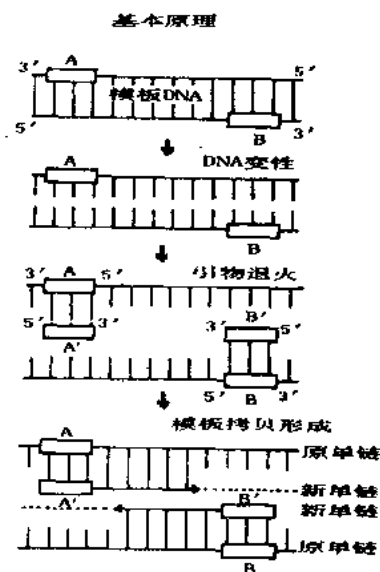


图1-1 PCR基本原理

变性作用和复性作用

DNA双螺旋结构的生物功能主要是在于复制和转录。以加热或碱性作用可以使DNA双螺旋的氢键断裂，双链解离，形成单链DNA，这称为DNA变性。解除变性的条件之后，变性的单

链可以重新结合起来,形成双链,其原有的物性和活性复原,这称DNA复性,也叫退火。变性和复性在一定条件下是完全可逆的。DNA双链离解一半时的温度称为解链温度 T_m 。不同的DNA解链温度不同,这是由于DNA中G—C与A—T的比例不同引起的。G—C之间有三个氢键连接,A—T之间有二个氢键连接,所以G—C比例大,则解链温度高。一般地讲,G—C含量每增加1%,解链温度增加0.4℃。 T_m 范围一般是在85℃~95℃之间。哺乳动物基因组中DNA含40%G—C时, T_m ~87℃,而含60%G—C时, T_m ~95℃。因此,PCR高温变性温度在90~95℃之间选择,加热时间为1~2分钟。

低 温 退 火

PCR的扩增是一种特定区段DNA的复制,这仍然遵守DNA生物合成的基本规律,其复制方式是以半保留形式进行的。PCR法的DNA复制,必须有DNA模板、DNA多聚酶、DNA引物和四种dNTP。如图1-1所示,要扩增模板DNA中A—B区间的DNA片段,首先要设计二条寡核苷酸引物A'和B'。PCR扩增DNA的特异性是由人工合成的这二条引物所决定的。A和B这段DNA的序列是已知的,这是PCR扩增的必要条件;A—B中间的序列未必清楚。A和B序列的长度一般为15~20个碱基,可以用DNA合成仪合成与A和B对应互补的二个引物A'和B'。PCR扩增系统中模板DNA经过高温变性后,分解为二条单链。然后,系统温度降低(25~37℃),引物退火,与相互互补的模板DNA结合,形成局部的双链,这是DNA复制的固定起点,即延伸的固定起点。如图1-1所示,A'和A相结合,B'和B相结合。退火的时间为1~2分钟。

中 温 延 伸

PCR扩增过程中,链的延伸是有方向性的,是以引物为固

定起点，延伸才能进行。目前使用的DNA多聚酶，合成DNA的方向都是从5'端到3'端。当PCR扩增体系温度升至中温(60~72℃)，已经与引物退火的单链，有了固定的延伸起点，在多聚酶的作用下，四种dNTP会迅速地以旧链为模板，合成新链，合成方向，若以A'和B'引物而言，都是从5'端到3'端的方向进行。自然界中DNA的复制是通过一种短的、不连续的片段合成起来的。真核细胞中，这种片段长约100个碱基；原核细胞中，这种短片则大约有1~2 kb碱基。这就是所谓的冈崎片段。在复制过程中，这些短片段最后由连接酶连接起来。PCR扩增片段的长度范围，从数百个至2kb个碱基。在PCR的扩增中，真核细胞和原核细胞没有明显的差别，其扩增的长度由引物来限定。至于PCR扩增，是否受到冈崎片段的限定，尚未见到有关报道。

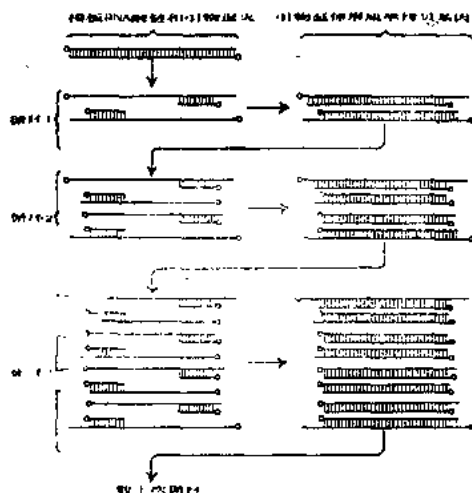


图1-2 PCR扩增