

21世纪生物技术丛书

PCR理论与技术

(第二版)

主编 王廷华 Pierre Dubus



科学出版社

www.sciencep.com

21 世纪生物技术丛书

PCR 理论与技术

(第二版)

王廷华 Pierre Dubus 主 编

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

《PCR 理论与技术》是《21 世纪生物技术丛书》的一个分册,是分子生物学研究的重要理论和工具。该书第一版于 2005 年出版,随着当今生物技术的迅速发展和需求的日益扩大,现予以再版。第二版在第一版基础上主要增加了实验技术,从而使该书更具可操作性。

本书分上、下篇,共 13 章。上篇介绍 PCR 基础理论和技术操作知识,以及可能遇到的各种问题的处理方法。下篇介绍 PCR 技术的应用,特别是第二版中通过 RT-PCR 技术检测全横断损伤脊髓中 TGF- β_1 表达的实例分析,系统阐述了从 RNA 提取、反转录、PCR 引物设计到 PCR 扩增、电泳及图像分析等具体操作步骤,使学习者能够全面掌握 RT-PCR 技术,做到无师自通。本书是编者在一线长期从事分子生物学实验技术的总结,基本涵盖了目前实验室所需的 PCR 理论与技术,有较好的实用价值。

本书可供生物医学专业研究生、本科学学生及从事分子生物学的科研人员阅读和实验时参考。

图书在版编目(CIP)数据

PCR 理论与技术 / 王廷华等主编. —2 版. —北京:科学出版社,2009
(21 世纪生物技术丛书)
ISBN 978-7-03-023354-7

I. P… II. 王… III. 聚合酶-链式反应 IV. Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 173414 号

策划编辑:沈红芬 吴茵杰 / 责任编辑:王 红 / 责任校对:钟 洋
责任印制:刘士平 / 封面设计:黄 超

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>

源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2005 年 3 月第 一 版 开本:787 × 1092 1/16

2009 年 3 月第 二 版 印张:13 1/4

2009 年 3 月第三次印刷 字数:301 000

印数:5 001 - 8 000

定价:39.80 元

如有印装质量问题,我社负责调换

《21 世纪生物技术丛书》编审委员会

主 审 李云庆 蔡文琴
委 员 (按姓氏笔画为序)

王廷华	四川大学	特聘教授
方秀斌	中国医科大学基础医学院	教授
冯 华	第三军医大学西南医院	教授
冯忠堂	昆明医学院神经科学研究所	教授
齐建国	四川大学华西医学中心	教授
李云庆	第四军医大学基础医学院	教授
李成云	云南农业大学植物病理国家重点实验室	教授
李官成	中南大学湘雅医学院	教授
李建国	上海交通大学医学院	教授
吴良芳	四川大学华西医学中心	教授
吴承远	山东大学医学院	教授
应大君	第三军医大学	教授
沈馨亚	上海交通大学医学院	教授
周 东	四川大学华西医院	教授
赵春华	协和医科大学	教授
胡长林	重庆医科大学	教授
施 静	华中科技大学同济医学院	教授
姜保国	北京大学医学部	教授
顾晓松	南通大学医学院	教授
曾园山	中山大学中山医学院	教授
游 潮	四川大学华西医院	教授
蔡文琴	第三军医大学	教授
Jean Philippe Merlio	法国波尔多第二大学	教授
John W. McDonald	美国霍普金斯大学医学院	教授
Leong Seng Kee	新加坡国立大学	教授
Pierre Dubus	法国波尔多第二大学	教授
Xin-Fu Zhou	澳大利亚阿德莱德大学	教授
Xiong-Zhong Ruan	英国伦敦大学	教授

《PCR 理论与技术》(第二版)编写人员

主 编 王廷华 Pierre Dubus

副主编 景 强 刘 佳 刁杨彦彬

编 委 (按姓氏笔画为序)

刁杨彦彬 王廷华 王海燕 邓兴力

刘 佳 刘德华 关宇光 李力燕

杨 莹 何永文 张金国 聂胜洁

董 坚 景 强 戴 萍 魏明霞

Pierre Dubus

第二版总序

21世纪是生命科学飞速发展的时代。如果说20世纪后半叶是信息时代,那么21世纪上半叶,生命科学将成为主宰。随着我国加入WTO后与世界科技日益接轨,技术的竞争已呈现出其核心地位和作用。正是在此背景下,为适应我国21世纪生物技术发展和需求,科学出版社组织编写了这套融基础理论和实践技术为一体、独具特色、主要面向一线科技人员的学术著作——《21世纪生物技术丛书》。本套丛书共有八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。自2005年3月本套丛书问世以来,即得到了广大生物技术科技工作者的喜爱,2006年1月即进行了重印。本套丛书对满足日益扩大的研究生实践需求,以及我国21世纪生物技术的普及和发展起到了积极的促进作用。

由于生物技术发展迅速和需求日益扩大,本套丛书于2009年再版。第二版在第一版的基础上,主要对实验技术进行了全面增补和修订,新增内容20余章。补充了神经形态示踪、肿瘤干细胞培养、神经干细胞移植、转基因干细胞构建、抗体封闭、细胞凋亡染色、免疫荧光染色、蛋白质组和基因组等实用技术,并对各技术的相关实践经验进行了更全面的总结。丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在编写方式和风格方面,力求强调基本概念和理论的阐述,注重基本技术的实践,并提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。

本套丛书由我国神经科学青年专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家教授参加编写和审阅。本套丛书是全体参编人员实践经验的总结,对从事科研的研究生和一线研究人员有很好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅速,错误和不足之处在所难免,恳请各位读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术及科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础。感谢国内外一批知名专家教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅,感谢编者们所付出的辛勤劳动。感谢中国解剖学会对本套丛书的组织工作给予的支持。感谢各位同道给予的鼓励和关心。

《21世纪生物技术丛书》编审委员会

2009年1月

第一版总序

21 世纪是生命科学取得革命性进展和医学飞速发展的时代。如果说 20 世纪后半叶是信息时代,那么 21 世纪上半叶生命科学将成为主宰。随着我国加入 WTO 和与世界科技日益接轨,生命科学领域里生物技术的竞争已日益呈现出其核心地位和作用。正是在此背景之下,科学出版社组织编写了这套《21 世纪生物技术丛书》。该套丛书共八本,包括《组织细胞化学理论与技术》、《神经细胞培养理论与技术》、《蛋白质理论与技术》、《分子杂交理论与技术》、《PCR 理论与技术》、《基因克隆理论与技术》、《抗体理论与技术》、《干细胞理论与技术》。

本套丛书从形态、细胞、分子生物学三个层面介绍了目前常用生物技术的基本理论、进展及其相关技术与应用。从培养科学思维能力和科研工作能力的目标出发,以实用性和可操作性为目的,面向我国日益增多的研究生和广大的一线科研人员。在技术章节提供了大量原版彩图及实验经验体会,使丛书更具实用价值。在编写方式和风格方面,力求强调科学史的沿革及基本概念、基本技术和理论的阐述,基本反映了现阶段常用生物技术和理论的现状与进展。

丛书由我国青年神经科学专家王廷华教授牵头,邀请国内外一批知名专家、教授参加编写和审阅。丛书是全体参编人员实践经验的总结,对一线从事科研的研究生和科研人员有较好的参考价值。由于时间有限,加之科学技术发展迅猛,错误、不足之处在所难免,恳请各位前辈、老师、同道及广大读者批评指正。

值本套丛书出版之际,感谢为我国生物技术与科学发展孜孜不倦、奉献一生的老一辈科学家,是他们的指导、培养和杰出工作为我国中青年一代的发展奠定了基础,并为本套丛书提供了参考。感谢国内外一批知名专家、教授组成的编审委员会对丛书的认真审阅和编者们的辛勤劳动。感谢科学出版社的同志们对丛书出版所付出的辛勤劳动和支持。感谢各位同道给予的鼓励 and 关心。

《21 世纪生物技术丛书》

编审委员会

2004 年 12 月 8 日

目 录

上篇 PCR 的基本理论与技术

第一章 聚合酶链式反应	(1)
第一节 PCR 技术的原理	(1)
第二节 PCR 反应体系	(3)
第三节 PCR 的反应温度和循环参数	(9)
第四节 PCR 反应条件的优化	(11)
第五节 PCR 产物的检测	(19)
第六节 PCR 产物的纯化	(22)
第二章 DNA 模板的制备及 PCR 技术中常见问题的处理	(24)
第一节 DNA 模板的制备	(24)
第二节 PCR 常见问题及处理	(30)
第三节 PCR 技术中污染问题	(32)
第四节 PCR 技术实验室的质量控制	(33)
第三章 原位 PCR 相关技术	(35)
第一节 原位 PCR	(35)
第二节 原位 PCR 的分类	(42)
第三节 原位 PCR 技术	(44)
第四章 定量 PCR 技术	(69)
第一节 概述	(69)
第二节 基本概念	(69)
第三节 定量 PCR 技术基本原理	(70)
第四节 定量 PCR 技术的种类	(70)
第五节 定量 PCR 的主要影响因素	(74)
第六节 常用的定量 PCR 技术及其在临床上的应用	(75)
第七节 PCR 产物的检测与定量技术	(82)
第八节 目前存在的问题及展望	(84)
第五章 其他相关 PCR 技术	(86)
第一节 反转录-聚合酶链反应	(86)

第二节	套式 PCR	(89)
第三节	多重 PCR	(91)
第四节	PCR 结合等位基因特异性的寡核苷酸探针法	(92)
第五节	PCR 结合序列特异性引物技术	(93)
第六节	单链构型多态性分析	(94)
第七节	限制性酶切片长度多态性分析	(95)
第八节	MVR-PCR	(96)
第九节	RAPD 技术	(98)

下篇 PCR 相关技术的应用

第六章	PCR 技术用于构建 cDNA 文库、测序及基因突变的检测	(102)
第一节	cDNA 文库构建的基本技术	(102)
第二节	PCR 测序	(109)
第三节	PCR 技术用于基因突变的检测	(111)
第七章	PCR 技术分析 DNA 序列多态性	(114)
第一节	DNA 的两种多态性和遗传标记分类	(114)
第二节	PCR 技术分析 DNA 序列多态性	(115)
第八章	用 PCR 技术分析 VNTR 和 STR	(122)
第一节	概述	(122)
第二节	扩增片段长度多态性分析分型技术基本原理	(123)
第三节	用 PCR 技术分析小卫星 VNTR 基因座分型的基本技术	(123)
第四节	用 PCR 技术分析微卫星 (STR) 基因座	(135)
第九章	用 PCR 技术对性别染色体进行分析	(146)
第一节	概述	(146)
第二节	PCR 扩增的基本方法	(146)
第三节	讨论	(148)
第十章	用 PCR 技术对动植物、微生物 DNA 进行分析	(149)
第一节	概述	(149)
第二节	实验方法与步骤	(152)
第三节	结果与讨论	(156)
第十一章	PCR 技术检测 CDK4 敲入转基因鼠的基因型	(158)
第一节	实验原理	(158)
第二节	实验方法	(158)
第三节	实验结果	(160)
第四节	结果分析及注意事项	(165)

第十二章 PCR 体系中模板 DNA 浓度与 PCR 扩增效率的关系	(166)
第一节 实验目的	(166)
第二节 实验方法	(166)
第三节 实验结果	(168)
第四节 结果分析	(171)
第十三章 RT-PCR 技术检测全横断损伤脊髓中 TGF- β_1 的表达	(173)
第一节 实验原理	(173)
第二节 实验设备、试剂及配制	(173)
第三节 实验步骤	(175)
第四节 实验结果	(196)
第五节 实验体会	(198)

上篇 PCR的基本理论与技术

第一章 聚合酶链式反应

分子克隆(molecular cloning)、DNA 测序(DNA sequencing)和聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是分子生物学的三大主流技术。在这三种技术中,PCR 技术在实践中的应用日益广泛,并随着分子生物学实验技术的成熟而不断创新和拓展。早在 20 世纪 70 年代初期,H. Ghobind Khorana 和他的同事就提出了用 PCR 技术来减少基因化学合成中的工作量的想法。由于当时技术条件的限制,基因测序、引物合成等方面的研究都存在一定的局限性,特别是还没有发现稳定的耐热 DNA 聚合酶(thermostable DNA polymerase)等诸多因素,使得 Khorana 的想法在当时看来还不可能实现,并且很快就被人们所遗忘。然而,随着耐热 DNA 聚合酶的发现,15 年后,美国 PE-Cetus 公司的 Kary Mullis 和他的同事通过使用 *E. coli* DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段成功地在体外扩增了哺乳动物的基因,从而实现了 Khorana 的设想,并将这一技术命名为聚合酶链式反应(PCR)。随着耐热菌 *Thermus aquaticus* 中耐热 DNA 聚合酶的发现和应用,大大地提高了 PCR 的效率并推动了其向 PCR 自动化技术的发展。此后,利用 PCR 技术,人们能在数小时内通过试管中的反应将特定的 DNA 片段扩增数百万倍。PCR 技术成为生物科学研究的一种重要方法,为医学、遗传学和考古学等学科的研究提供了新的技术手段。目前,与 PCR 相关的技术已经不断地被开发应用。

第一节 PCR 技术的原理

聚合酶链式反应(PCR)是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的方法,即通过试管中进行的 DNA 复制反应,使极少量的基因组 DNA 或 RNA 样品中的特定基因片段在短短几小时内扩增上百万倍。其反应原理与细胞内的 DNA 复制相似,但 PCR 的反应体系要简单得多,主要包括 DNA 靶序列、与 DNA 靶序列单链 3' 末端互补的合成引物、4 种 dNTP、耐热 DNA 聚合酶及合适的缓冲液体系。

与细胞内的 DNA 复制相似,PCR 也是一个重复地进行 DNA 模板解链、引物与模板 DNA 结合、DNA 聚合酶催化形成新的 DNA 链的过程,这些过程都是通过控制反应体系的温度来实现的。PCR 包含下列三步反应:

(1) 变性(denaturation):将反应体系混合物加热到 94℃,维持较短的时间(大约 15 ~ 30s),使目标 DNA 双螺旋的氢键断裂,形成单链 DNA 作为反应的模板。

(2) 退火(annealing):将反应体系冷却至特定的温度(引物的 T_m 值左右或以下),引物

与 DNA 模板的互补区域结合,形成模板-引物复合物。必须精确地计算退火的温度以保证引物只与模板相对应的序列结合。由于模板链分子较引物复杂得多,加之引物量大大超过模板 DNA 的数量,因此, DNA 模板单链之间互补结合的机会很少。

(3) 延伸(elongation):将反应体系的温度提高到 72℃ 并维持一段时间,引物在耐热 DNA 聚合酶的作用下,以引物为固定起点,以四种单核苷酸(dNTP)作为底物,合成新的 DNA 链。因此,在这一阶段的末期,两条单链模板 DNA 又形成了新的双链,且双链中的新生 DNA 单链具有各种不同的延伸长度。

以上三步作为一个循环重复的进行,每一循环的产物作为下一循环的模板。因此,在第二轮循环中通过变性产生的 4 条 DNA 单链结合引物并延伸(图 1-1),在第三轮及更多的循环中重复进行变性、退火、延伸这三步反应。如此循环 20 次,原始 DNA 将扩增约 10^6 倍,而

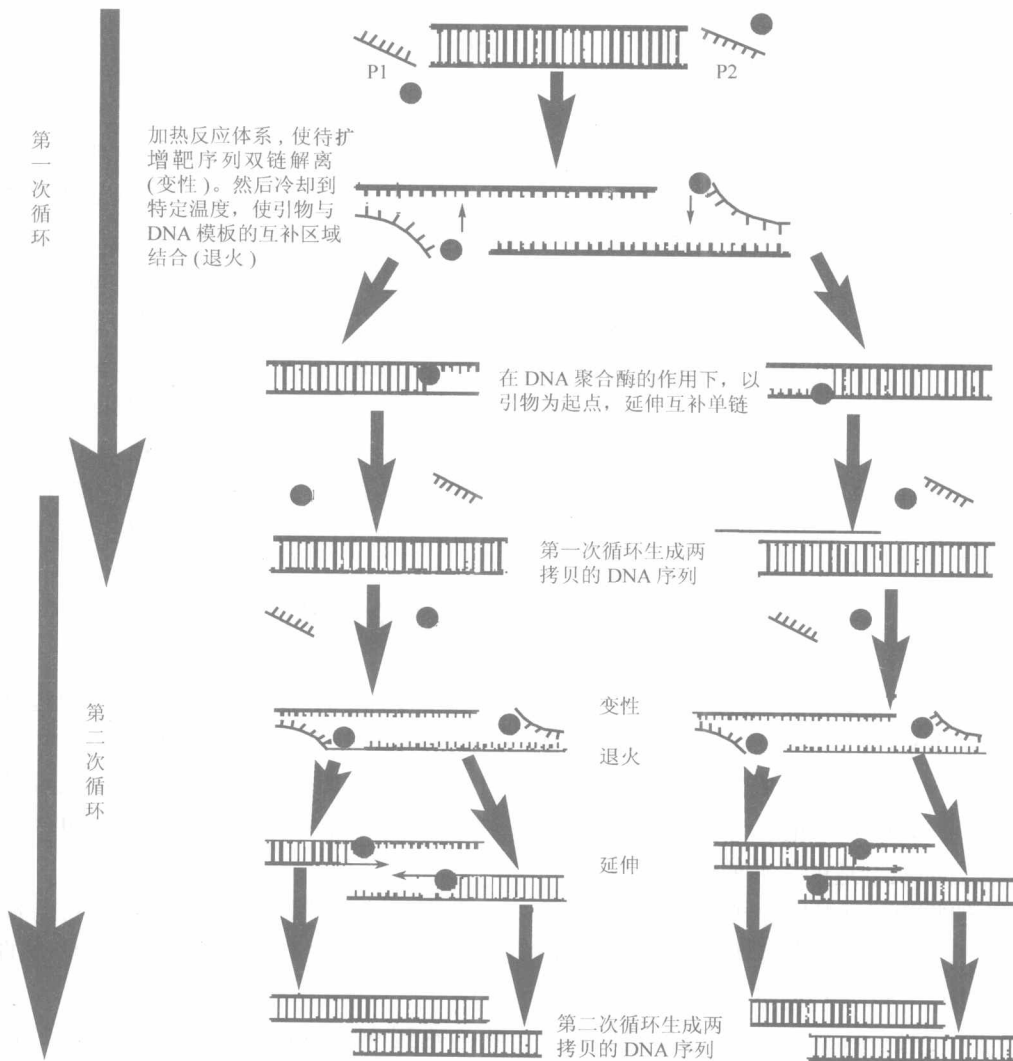


图 1-1 PCR

循环 30 次后将达 10^9 倍。而所有上述过程将在 1~2h 内完成。经过扩增后的 DNA 产物大多为介于引物与原始 DNA 相结合的位点之间的片段,而在反应前几轮循环产生的超过引物结合位点的较长链的 DNA 的比例将随着循环不断地进行稀释至可以忽略的程度。

第二节 PCR 反应体系

PCR 的基本反应体系包括:需要扩增的模板(template)、一对寡核苷酸引物(primers)、维持 pH 的反应缓冲系统(reaction buffer system)、一价或二价阳离子(monovalent or divalent cations)、4 种三磷酸脱氧核糖核苷酸(dNTP)、催化依赖模板的 DNA 合成的耐热 DNA 聚合酶以及 PCR 促进剂等。

一、模 板

PCR 的模板可以是 DNA,也可以是 RNA。当用 RNA 做模板时,先经过反转录生成 cDNA 然后再进行 PCR。PCR 反应体系中,对模板的要求如下:

(一) 纯化的模板

DNA 模板的来源广泛(可以从培养的细胞或微生物中提取,也可以从临床组织标本、犯罪现场标本、病理标本和考古标本中提取),无论来源如何,待扩增的核酸模板都需要经过纯化处理以除去 DNA 聚合酶抑制剂。

(二) 模板的形式

含有目标靶序列的模板 DNA 可以通过单链或双链的形式加入 PCR 反应体系中。

(三) 线性 DNA

由于环状 DNA 复性太快,使其扩增效率略低于线性 DNA,故常用线性 DNA 分子。若模板为环状质粒,最好先用酶将其切开成线性分子。

(四) 小片段模板 DNA

尽管 PCR 对模板大小的要求不是十分严格,但是通常小片段模板 DNA 的扩增效率要高于大分子。因此,建议在 PCR 前使用机械剪切或者限制性内切酶消化基因组 DNA 以提高产量。

(五) 适宜的模板量

理论上 PCR 的最佳工作条件需要目标靶序列的单一拷贝作为模板,然而实际工作中,反应体系中存在数千拷贝的目标 DNA。在哺乳动物基因组,通常每次 PCR 最多取 $1\mu\text{g}$ 的基因组 DNA 作为模板,而这已含有多达 3×10^5 常染色体基因的拷贝。而对于简单得多的酵母、细菌及质粒基因组,每次反应的模板最大加入量分别为 10ng 、 1ng 和 1pg 。

二、引物

PCR 扩增产物的大小及扩增靶序列在基因组中的位置是由引物限定的,因此,引物的选择关系到 PCR 的特异性。

(一) 引物的质量

一旦确定引物的序列,就可以用核苷酸合成仪合成引物。由于合成的引物中可能含有相当数量的“错误序列”,其中包括不完整序列和脱嘌呤产物,以及可以检测到的碱基修饰的完整链和高分子量产物。这些序列可以导致非特异扩增和信号强度的降低。因此,PCR 所用的引物必须是高质量的引物且需要纯化。通常可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳法、离子交换法、高效液相层析法或寡聚核苷酸纯化柱法纯化。使用自动 DNA 合成仪合成的寡聚核苷酸引物通常可以直接用于标准 PCR 而不需要纯化。引物不使用时,应在 -20°C 保存。在 -20°C 下,冻干引物至少可以保存 12~24 个月,液体状态则可以保存 6 个月。

(二) 引物的设计原则

在影响扩增反应的各种因素中,寡聚核苷酸引物的设计最为重要。为了抑制不需要的序列扩增而获得大量的预期产物,我们需要精心设计引物。

通常 PCR 体系中有一对引物,即 5'端引物和 3'端引物。在扩增基因片段或 cDNA 片段时,通常以信息链为基准,5'端引物与位于待增片段 5'端上游的一小段 DNA 序列相同,引导信息链的合成;3'端引物与位于待增片段 3'端的一小段序列互补,引导互补链的合成,PCR 反应的扩增产物就是这一对引物之间的双链 DNA 片段。当需要同时扩增靶 DNA 上的许多片段,即多重 PCR(multiplex PCR)时,需要在反应体系中加入一对以上的引物。

不同的 PCR 反应体系,由于模板的组成、待增片段的长度及其使用目的的不同,对引物的要求也不相同。引物设计的基本原则是最大限度地提高扩增效率和特异性,同时尽可能地抑制非特异扩增。引物设计的基本要求如下:

1. 引物的长度 设计引物的目的是要提高 PCR 的特异性。因此,这就要求引物与模板 DNA 中的靶序列以较稳定的形式互补结合。寡聚核苷酸的长度越长,获得的特定靶序列的特异性就越好,引物过短则会影响 PCR 的特异性。然而,引物过长会使延伸温度超过耐热 DNA 聚合酶的最适温度,也会影响产物的特异性。因此,引物的长度应适宜,一般要求 18~25bp,一对引物中两个引物之间的长度差异应小于 3bp。

2. 基本成分 G+C 的含量一般为 40%~60%。四种碱基应随机分布,避免碱基堆积的现象。尤其引物的 3'端,不应有连续的 3 个 G 或 C,否则会使引物与核酸的 G 或 C 富集区互补,从而影响 PCR 的特异性。

3. 引物自身 引物自身不应有反向重复序列或者大于 3bp 的自身互补序列,否则引物自身会折叠,形成发夹结构,影响引物与待增 DNA 中的靶序列杂交结合。

4. 引物之间 引物之间不应存在互补序列,尤其应避免 3'端的互补重叠,以免形成引物二聚体。由于 PCR 反应体系中含有高浓度的引物,即使引物之间存在极为微弱的互补作

用,也会使引物相互杂交,最终得到引物二聚体的扩增产物。若引物二聚体在 PCR 的早期形成,它们将通过竞争 DNA 聚合酶、引物及四种单核苷酸从而抑制待增 DNA 的扩增。通过精心设计引物、应用热启动 PCR (hot start PCR) 或者降落 PCR (touch down PCR) 及特制的 DNA 聚合酶,可以减少引物二聚体的生成。

5. 3'末端 引物的 3'端是引发延伸的起点,因此一定要与模板准确配对。四种碱基引起的错配有一定的规律,以引物 3'端 A 的影响最大;另外,引物 3'末端碱基错配时,不同碱基的引发率存在很大差异,当末位碱基为 A 时,错配的引发率大大降低,而当末位碱基为 T 时,错配的情况下也能引发链的合成。因此,应尽量避免在引物 3'端的第一位碱基是 T。引物 3'端最佳碱基的选择是 G 和 C,因为它们形成的碱基配对比较稳定。

6. 5'末端 引物的 5'端并无严格的限制,在与模板结合的引物的长度足够的前提下,其 5'端碱基可不与模板 DNA 互补而成游离状态。通常这些序列对寡聚核苷酸引物与模板的结合的影响并不显著。因此,引物的 5'端可以被修饰,如附加限制酶酶切位点、引入突变位点、标记生物素、荧光物质、地高辛等,加入其他短序列包括起始密码子、终止密码子等。在后续的扩增循环中,这些与模板未配对的序列将被带到 PCR 产物的双链中,故在其 PCR 产物中,既含有目的扩增片段又含有两侧引入的核苷酸序列。

7. 溶解温度 3'端引物和 5'端引物应有相似的 T_m 值,其差别不应大于 5°C 。扩增产物与引物的 T_m 值差别应小于 10°C ,以确保 PCR 循环中的扩增产物有效变性。

8. 引物的特异性 引物与非特异扩增序列的同源性不要超过 70% 或有连续 8 个碱基同源。

9. 引物的简并性 引物的 3'端应为保守的氨基酸序列,即采用简并密码较少的氨基酸,如 Met、Trp,并且要避免三联体密码第三个碱基的摆动位置位于引物的 3'端。

引物的设计要考虑多方面的综合因素,依据实际情况具体分析,应尽量遵循上述原则。现在有许多设计引物的计算机软件,能综合分析优化组合引物的各种参数,对引物设计具有指导作用。

(三) 引物的用量及其计算

在 PCR 反应体系中,引物的浓度一般要求在 $0.1 \sim 0.5 \mu\text{mol}$ 之间,这一引物浓度足以使 1kb 的 DNA 片段在 PCR 反应体系中循环扩增 30 次。引物浓度过低,则产物量低;引物浓度过高,则会促进引物二聚体的形成及非特异性产物的形成。非特异性产物和引物二聚体都可以作为 PCR 的底物,与靶序列竞争 DNA 聚合酶和 dNTP,从而抑制靶序列的扩增。

引物浓度的计算可按下面的方法进行:摩尔猝灭系数(E_M)是 1cm 光程比色杯中测定 1mol/L 寡核苷酸溶液在 $\text{UV}_{260\text{nm}}$ 下的光密度(OD)值。 E_M 可按式计算:

$$E_M = a(16000) + b(12000) + c(7000) + d(9600)$$

其中, a 、 b 、 c 和 d 分别代表寡核苷酸引物中的 A、G、C 和 T 的个数。

例如:一纯化的 24bp 寡核苷酸溶于 0.1ml 水中,取 $10 \mu\text{l}$ 稀释至 1ml,测其 $\text{OD} = 0.76$,原液 OD 为 $0.76 \times 100 = 76$,若此寡核苷酸的碱基组成为

$$A = G = C = T = 6, \text{ 其 } E_M = 6 \times 16\,000 + 6 \times 12\,000 + 6 \times 7000 + 6 \times 9600 = 267\,600$$

故原液中的寡核苷酸浓度为

$$76 \div 267\ 600 = 3.4 \times 10^{-4} \text{ mol/L} = 340 \text{ nmol/L}。$$

三、反应缓冲系统

反应缓冲系统提供 PCR 所必需的、合适的酸碱度和某些离子。目前,最常用的缓冲液是 10~50mmol/L 的 Tris-HCl (pH8.3~8.8, 20℃), 在 72℃ (通常 PCR 延长阶段的温度) 时, 其 pH 为 7.2 左右, 故在实际的 PCR 反应体系中, 其 pH 变化于 6.8~7.8 之间。

反应缓冲系统中还含有 KCl, 50mmol/L 以内的 KCl 有利于引物的退火, 而 50mmol/L 以上的 KCl 则抑制 *Taq* DNA 聚合酶的活性。然而, 也有人认为含有 50mmol/L KCl 的缓冲系统有利于大于 500bp 的 DNA 片段的扩增, 而将缓冲系统中的 KCl 浓度提高到 70~100mmol/L, 则有利于提高较小的 DNA 片段的扩增产量。

此外, 还可向反应缓冲系统加入 *Taq* 聚合酶保护剂, 如小牛血清白蛋白 (100μg/ml)、明胶 (0.01%)、Tween-20 (0.05%~0.1%) 或二巯基苏糖醇 (DTT, 5mmol/L) 等。

四、二价阳离子—— Mg^{2+}

所有耐热的 DNA 聚合酶的活性都需要二价阳离子 (通常是 Mg^{2+})。虽然使用含有 Mn^{2+} 的缓冲溶液也可以使一些聚合酶具有催化活性, 但其效率要比加入 Mg^{2+} 低得多; 而 Ca^{2+} 则不能活化 DNA 聚合酶。因此, PCR 中耐热 DNA 聚合酶的活性与反应体系中游离 Mg^{2+} 浓度直接相关。反应体系中 Mg^{2+} 浓度低时, 酶的活力显著降低; 过高时, 酶则催化非特异性扩增。此外, Mg^{2+} 浓度还影响引物的退火、模板与 PCR 产物的解链温度、产物的特异性、引物二聚体的生成等。值得注意的是, 由于 PCR 反应体系中的 DNA 模板、引物和 dNTP 磷酸基团均可与 Mg^{2+} 结合从而降低 Mg^{2+} 的实际浓度, 因此, Mg^{2+} 的总量应比 dNTP 的浓度高 0.2~2.5mmol/L。如果可能的话, 制备 DNA 模板时尽量避免引入大剂量的螯合剂 (如 EDTA) 或负离子 (如 PO_4^{3-}), 因为它们会影响 Mg^{2+} 的浓度。

五、三磷酸脱氧核苷酸

四种三磷酸脱氧核苷酸 (deoxynucleotide triphosphates, dNTPs) 为 PCR 的合成原料。在标准的 PCR 中各种 dNTP 的浓度应相等, 若任何一种浓度明显不同于其他几种时, 会诱发聚合酶的错误掺入而降低链合成的速度。dNTP 的浓度直接影响到 PCR 的速度和特异性, 因此, 应严格地控制 PCR 体系中 dNTP 的浓度, 具体要求详见本章第四节。

许多厂商出售专门用于 PCR 的 dNTP 储存液。这种储存液具有较强的酸性而不含焦磷酸盐, 其目的是保护 dNTP 在储存液的冷冻和加热期间不受到破坏。因此, 在使用前应用 NaOH 将 pH 值调至 7.0~7.5。无论是自配的还是购买的 dNTPs 溶液在储存前都应分成较小的几份, 然后在 -20℃ 下储存, 经过两次冷冻-加热循环后, 储存液就必须丢弃。若长期在 -20℃ 下冻存, 储存液中的少量的水分会蒸发, 而后凝结在储存容器上, 因此, 储存 dNTP 液

的容器在加热后,应在微型离心机中离心数十秒以减少 dNTP 浓度的变化。

六、耐热 DNA 聚合酶

1983 年,美国 PE-Cetus 公司的 Kary Mullis 使用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段首先建立了 PCR 技术,其延伸温度为 37℃,然而,由于 Klenow 片段在 95℃ 的 DNA 解链温度下完全失活,因此在每轮循环步骤之后都需要再添新酶,操作十分繁琐,并且在反应体系中形成快速沉积变性的酶蛋白。此外,由于 Klenow 片段聚合反应温度偏低,引物与模板的非特异性结合增加,导致非特异性产物增多;同时,由于受到某些 DNA 二级结构的影响,聚合反应不完全,得不到完整的 PCR 扩增产物。直到 1987 年,发现了热稳定的 *Taq* DNA 聚合酶(*Taq pol*)等耐热的 DNA 聚合酶后,才使 PCR 技术有了重大的发展并逐步实现了自动化。

耐热 DNA 聚合酶(thermostable DNA polymerase)能经受 95℃ 以上的高温而不失活,因而无需在每轮循环中添加新酶;同时它催化的聚合反应的最适温度为 70 ~ 80℃,此时引物与模板结合的特异性好,故产物的纯度高。现在已发现多种耐热 DNA 聚合酶,其共同特点是在高温下仍保持一定的酶活性,但各耐热 DNA 聚合酶的性能尚有一定的差别。目前在 PCR 中应用最多的是 *Taq pol*。

(一) *Taq* DNA 聚合酶

天然的 *Taq pol* 是从嗜热水生菌 *Thermus aquaticus* YT-1 菌株中分离获得的。该菌株在 1969 年就从美国黄石国家公园的温泉中分离出来,能在 70 ~ 75℃ 生长。现已克隆出该酶的基因,全长 2499 个碱基,编码分子质量为 94kDa、长度为 832 个氨基酸的蛋白质。现将 *Taq pol* 的特点叙述如下:

1. 高热稳定性 *Taq pol* 在 92.5℃、95℃、97.5℃ 的半衰期分别为 130min、40min 和 5 ~ 6min。在 PCR 中 DNA 变性时间通常为 30 ~ 60s,若总共进行 30 轮循环,累计热变性时间为 15 ~ 30min,此时该酶仍然保持相当高的活性,完全可以保证 PCR 反应的需要。

2. 高催化活性 在已发现的耐热 DNA 聚合酶中,*Taq pol* 的活性最高,达 200 000 U/mg。实验证明,*Taq pol* 的活性有明显的温度依赖性,*Taq pol* 催化 DNA 合成的最适温度为 75 ~ 80℃,此时延伸速率达 150 ~ 300 个核苷酸/(秒·酶分子);70℃ 时为 60 个核苷酸/(秒·酶分子);55℃ 时为 22 个核苷酸/(秒·酶分子);37℃ 和 22℃ 时分别为 1.5 个和 0.25 个核苷酸/(秒·酶分子)。当温度超过 80℃ 时,几乎没有 DNA 的合成,可能与高温下引物和模板结合的稳定性遭到破坏有关。

3. 忠实性 序列分析表明 *Taq pol* 与 *E. coli pol I* N 端区域(此区域与该酶具有 5'→3' 外切酶活性有关)高度同源,因此 *Taq pol* 亦有 5'→3' 端的外切酶活性。然而,由于 *Taq pol* 没有 *E. coli pol I* 的 3'→5' 外切酶活性区的同源序列,故 *Taq pol* 无 3'→5' 外切酶活性。因此,*Taq pol* 不具有 Klenow 酶的校对功能,在其催化的 PCR 扩增过程中,引起碱基错配的几率大大增加。通常,*Taq pol* 在 PCR 出现碱基错配的几率为 1/300 ~ 1/18 000,在经过 25 轮扩增后,扩增产物的序列中每 400 个碱基就有一个与原始序列不同。