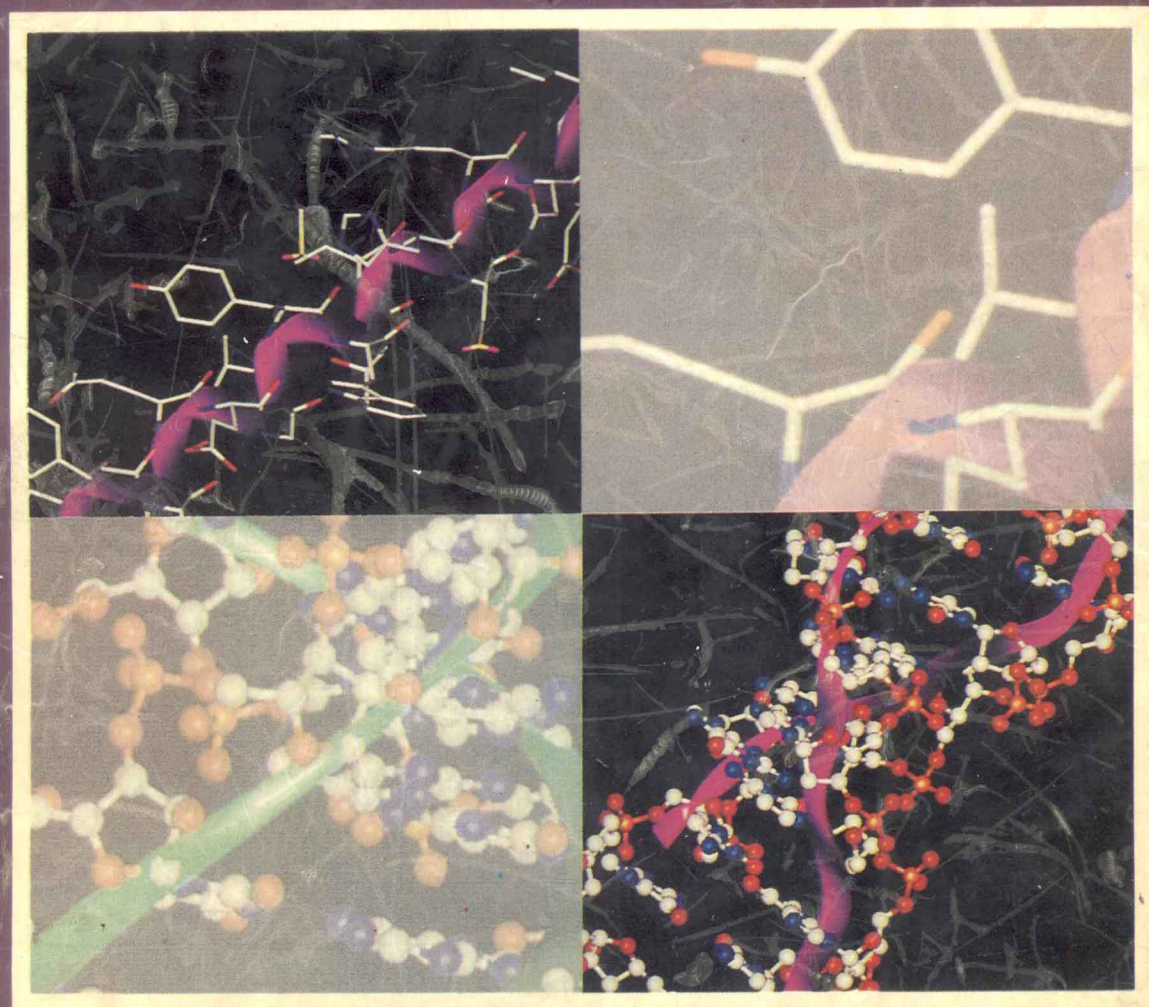


THE POLYMERASE CHAIN REACTION IN  
CLINICAL AND LABORATORY MEDICINE

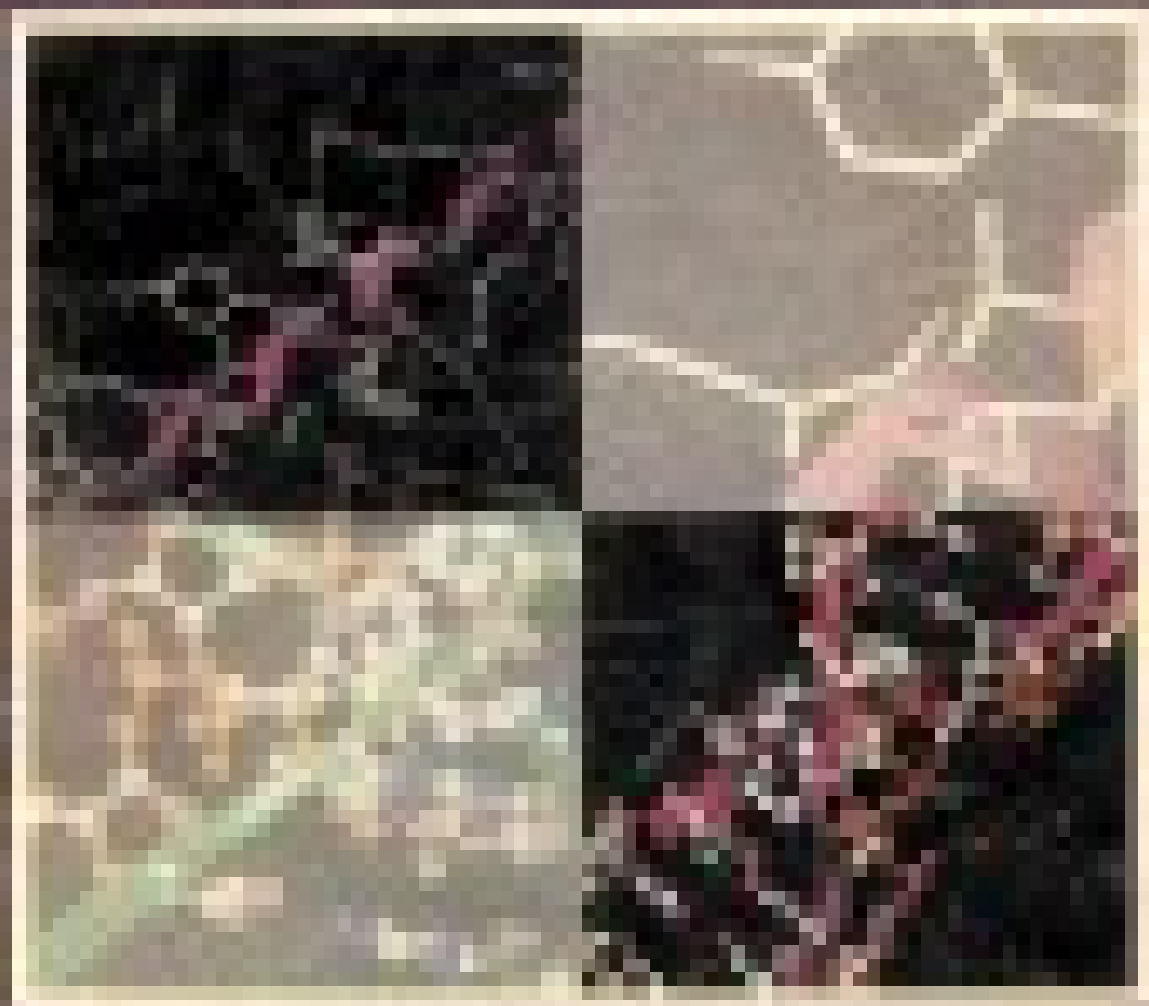
# PCR 检 验 技 术

主 编：朱沛轩  
副主编：杨朝国



四川大学出版社

# PCR 檢驗技術



# PCR 检 验 技 术

THE POLYMERASE CHAIN REACTION  
IN CLINICAL AND LABORATORY MEDICINE

主 编：朱沛轩

副主编：杨朝国

编写者：朱沛轩 杨朝国 王明谊 刘 武  
王 泓 刘 蓉 胡雅兵 邓正华

四川大学出版社

## 内 容 简 介

本书较全面地介绍了当今 PCR 技术及其应用的各个方面,充分反映了近两年 PCR 技术的飞速发展。全书共十章,主要有 PCR 技术基本原理和操作及最新进展,临床上常见标本的快速处理,PCR 在传染病、寄生虫病、肿瘤、遗传病、法医学和动植物检疫中的应用。各节较详细地介绍了 PCR 实际应用中标本的制备、引物设计、实验条件、注意事项和临床意义等。书后还提供了翔实的附录,包括分子生物学常用数据、实验室有关试剂的配制和医学检验常用名词等。

本书可供各级医院、防疫站、检疫所的医师和检验师及高等院校、科研单位有关专业的师生和科研工作者参考。

责任编辑:杨守智

封面设计:何 卓

### PCR 检 验 技 术

主编 朱沛轩 副主编 杨朝国

四川大学出版社出版发行 (成都市望江路 29 号)

四川省新华书店经销 四川省卫生管理干部学院印刷厂印制

787×1092mm 16 开本 22 印张 560 千字

1995 年 8 月第一版 1995 年 8 月第一次印刷

印数:0001—3000 册

ISBN7-5614-1211-8/Q·26、定价:28.00 元

(川)新登字 014 号

## 前 言

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手段。聚合酶链反应(PCR)就是目前应用最广泛的先进分子生物学技术之一,自 1985 年 Mullis 发明这种基因体外扩增技术以来,该技术在很短时间里即风行全球,不同学科的科学们都蜂涌而上,从谈论到学习掌握 PCR,并尽快应用到他们的工作中,期望凭借这一工具来提高研究水平和解决所面临的一些难题。

医学检验已经历了形态学、生物化学和血清学几代实验诊断技术,PCR 等分子生物学方法在疾病诊断中的应用,又兴起了所谓的基因诊断技术,这无疑是现代医学发展的又一重要标志。PCR 应用于疾病诊断的早期,操作者们都一丝不苟地遵循标准的 PCR 反应体系及经典的 DNA 操作方法。然而,临床的特点却要求每种方法既要准确可靠,又要简便快速,才容易推广使用。这就促使人们在原有基础上对 PCR 进行简化和改进,以适应临床的特殊要求。实践中,样品处理被简化、扩增反应体积减少,多种成份预先混合以减少加样步骤、采用套式 PCR 扩增以避免繁琐的探针杂交法鉴定产物。结果表明,这些简化步骤大多数并不影响 PCR 的检测效果,反而节省试剂材料和操作者的时间精力,又满足了临床快速诊断要求。若与基础研究领域中的 PCR 相比较,检验领域中的 PCR 已发展形成迥然不同的操作风格。因此,我们认为有必要将这些简化方法汇集成册,以便我们在教学和实验室工作中查阅参考,同时可供检验同道们交流。这便是编写这本“PCR 检验技术”的初衷。本书主要介绍了 PCR 的基本原理、样品制备及扩增的常用方法,举例介绍了不同类型的 PCR 在常见传染病、肿瘤、遗传病、寄生虫病、动植物检疫及法医学中的实际应用。每一方法前简略说明了反应原理及主要试剂的作用,并列出了相应的参考文献,其目的是让引用者便于分析结果和进一步改进。

本书的编写人员皆为一些青年讲师和研究生,在 PCR 操作及临床应用方面已有多年工作经验,并有不少论著在国内外发表。编写者在完成大量教学和科研工作任务的同时,利用业余时间查阅了近年来有关 PCR 进展的最新资料,结合自己的工作经验和体会编写而成。分子生物学知识博大精深,所涉及的文献浩如烟海。PCR 技术的发明和应用给我们带来无限的启迪和思考,有数不清的问题等待我们去认识,有数不完的事情等待我们去做。汇写资料对青年人来说是一个锻炼机会,但终因编写者学识和经验有限,本书差错在所难免,恳请读者批评指正。

朱沛轩

1995 年 8 月·成都

## 目 录

<b>第一章 PCR 技术概述</b>	
第一节 PCR 技术的发明 .....	(1)
第二节 PCR 的基本原理 .....	(2)
第三节 PCR 技术的特点 .....	(4)
第四节 PCR 技术的新进展 .....	(5)
<b>第二章 PCR 样品的制备</b>	
第一节 从全血细胞中快速提取 DNA .....	(13)
第二节 从血清中快速提取 DNA .....	(14)
第三节 从痰标本中提取 DNA .....	(15)
第四节 从尿标本中提取 DNA .....	(16)
第五节 从粪便标本中提取 DNA .....	(17)
第六节 从体液标本中提取 DNA .....	(17)
第七节 从临床拭子标本中提取 DNA .....	(18)
第八节 从组织标本中提取 DNA .....	(19)
第九节 从绒毛、羊水标本中提取 DNA .....	(20)
第十节 从细菌培养物中提取 DNA .....	(21)
第十一节 从法医学标本中提取 DNA .....	(22)
第十二节 固相吸附法快速制备 DNA 和 RNA(Boom 法)...	(23)
第十三节 从临床标本中快速提取 RNA .....	(24)
第十四节 去除临床标本中血污染的方法 .....	(25)
第十五节 DNA、RNA 的浓度和纯度测定 .....	(26)
第十六节 DNA、RNA 的保存 .....	(26)
<b>第三章 PCR 扩增操作方法</b>	
第一节 PCR 扩增体系的组成 .....	(28)
第二节 PCR 扩增 DNA 操作方法 .....	(30)
第三节 PCR 扩增 cDNA 操作方法 .....	(32)
第四节 PCR 反应条件的选择及优化 .....	(34)
<b>第四章 PCR 扩增产物的检测分析</b>	

第一节	琼脂糖凝胶电泳法 .....	(36)
第二节	聚丙烯酰胺凝胶电泳法 .....	(39)
第三节	限制性内切酶分析法 .....	(41)
第四节	核酸探针杂交鉴定法 .....	(42)
第五节	单链构型多态性分析法 .....	(45)
第六节	酶免疫分析法 .....	(47)
第七节	PCR 出现问题的分析和解决办法 .....	(51)
<b>第五章 PCR 检测常见传染病</b>		
第一节	PCR 检测结核杆菌 .....	(53)
第二节	PCR 检测淋球菌 .....	(56)
第三节	PCR 检测检测霍乱弧菌 .....	(59)
第四节	PCR 检测脑膜炎球菌 .....	(61)
第五节	PCR 检测幽门螺杆菌 .....	(62)
第六节	PCR 检测嗜肺军团菌 .....	(65)
第七节	PCR 检测沙门氏杆菌 .....	(68)
第八节	PCR 检测白色念珠菌 .....	(70)
第九节	PCR 检测甲型肝炎病毒 .....	(73)
第十节	PCR 检测乙型肝炎病毒 .....	(75)
第十一节	PCR 检测丙型肝炎病毒 .....	(81)
第十二节	PCR 检测戊型肝炎病毒 .....	(83)
第十三节	PCR 检测狂犬病毒 .....	(85)
第十四节	PCR 检测巨细胞病毒 .....	(87)
第十五节	PCR 检测单纯疱疹病毒 .....	(89)
第十六节	PCR 检测人乳头瘤病毒 .....	(91)
第十七节	PCR 检测 EB 病毒 .....	(94)
第十八节	PCR 检测人类免疫缺陷病毒 .....	(96)
第十九节	PCR 检测腺病毒 .....	(100)
第二十节	PCR 检测乙脑病毒 .....	(103)
第二十一节	PCR 检测流行性出血热病毒 .....	(105)
第二十二节	PCR 检测沙眼衣原体 .....	(108)
第二十三节	PCR 检测肺炎支原体 .....	(110)
第二十四节	PCR 检测解脲脲原体 .....	(112)
第二十五节	PCR 检测梅毒螺旋体 .....	(113)
第二十六节	PCR 检测莱姆病螺旋体 .....	(116)
第二十七节	PCR 检测钩端螺旋体 .....	(119)
<b>第六章 PCR 检测常见寄生虫病</b>		
第一节	PCR 检测恶性疟原虫 .....	(123)
第二节	PCR 检测间日疟原虫 .....	(125)

第三节	PCR 检测弓形虫 .....	(126)
第四节	PCR 检测卡氏肺孢子虫 .....	(129)
第五节	PCR 检测克氏锥虫 .....	(131)
第六节	PCR 检测利什曼原虫 .....	(134)
第七节	PCR 检测隐孢子虫 .....	(136)
第八节	PCR 检测旋毛形线虫 .....	(138)
第九节	PCR 检测阿米巴原虫 .....	(140)
第十节	PCR 检测肠内贾第虫 .....	(143)
<b>第七章 PCR 检测常见肿瘤的基因标志</b>		
第一节	PCR 检测常见肿瘤时 <i>ras</i> 癌基因突变 .....	(157)
第二节	PCR 检测胰腺癌 .....	(161)
第三节	PCR 检测常见肿瘤时 <i>P53</i> 基因突变 .....	(163)
第四节	PCR 检测乳腺癌在腋下淋巴结中的微转移 .....	(167)
第五节	PCR 检测常见肿瘤时 <i>APC</i> 基因突变 .....	(170)
第六节	PCR 检测常见肿瘤时 <i>C-erb B<sub>2</sub></i> 基因扩增 .....	(172)
第七节	PCR 检测常见肿瘤时 DNA 聚合酶 $\beta$ 基因突变 .....	(174)
第八节	PCR 检测急性髓性白血病时 <i>AML<sub>1</sub>-ETO</i> 融合基因 .....	(176)
第九节	PCR 检测白血病时 <i>bcr/ab1</i> 融合基因 mRNA .....	(180)
第十节	PCR 检测急性早幼粒细胞白血病时 <i>RAR<math>\alpha</math>/MYL</i> 和 <i>MYL/RAR<math>\alpha</math></i> 二种融合基因 mRNA .....	(182)
第十一节	PCR 检测淋巴瘤时 t(14;18)染色体异位 .....	(186)
第十二节	PCR 检测外套细胞淋巴瘤时 t(11;14)染色体异位 .....	(187)
第十三节	PCR 检测 B 淋巴细胞恶性肿瘤时免疫球蛋白重链基因重排 .....	(189)
第十四节	PCR 检测急性淋巴细胞白血病时 T 细胞受体基因重排 .....	(190)
第十五节	PCR 检测急性淋巴细胞白血病时 <i>E2A/PBX1</i> 融合 mRNA .....	(193)
第十六节	PCR 检测 pre-pre-B-ALL 时 <i>HRX-FEL</i> 融合转录本 .....	(195)
第十七节	PCR 检测 t(17;19)(q <sup>22</sup> ;p <sup>13</sup> )ALL 时 <i>E2A/HLF</i> 融合基因 .....	(197)
第十八节	PCR 检测白血病患者体内的多药耐药基因表达 .....	(200)
<b>第八章 PCR 检测遗传病</b>		
第一节	PCR 检测地中海贫血 .....	(205)
第二节	PCR 检测血友病 .....	(209)
第三节	PCR 检测苯丙酮尿症 .....	(212)
第四节	PCR 检测杜氏/贝氏进行性肌营养不良症 .....	(215)
第五节	PCR 检测视网膜色素变性 .....	(218)
第六节	PCR 检测先天性肾上腺皮质增生症 .....	(220)
第七节	PCR 检测 Leber's 遗传性视神经病 .....	(221)
第八节	PCR 检测脆性-X 综合症 .....	(223)
第九节	PCR 检测性别和性别发育异常 .....	(226)



第十节 PCR 检测亨廷顿氏病 .....	(229)
第十一节 PCR 检测 G-6-PD 缺陷 .....	(231)
第十二节 PCR 检测镰状细胞性贫血 .....	(233)
第十三节 PCR-SSCP 检测家族性多发性结肠息肉 .....	(235)
<b>第九章 PCR 在法医学中的应用</b>	
第一节 PCR 构建 DNA 指纹图谱技术 .....	(240)
第二节 PCR 在法庭物证鉴定中的应用 .....	(242)
第三节 PCR 在亲权鉴定中的应用 .....	(246)
<b>第十章 PCR 在动植物检疫中的应用</b>	
第一节 PCR 检测口蹄疫病毒 .....	(250)
第二节 PCR 检测非洲马瘟病毒 .....	(252)
第三节 PCR 检测猪瘟病毒 .....	(253)
第四节 PCR 检测猪繁殖和呼吸综合征病毒 .....	(254)
第五节 PCR 检测猪丹毒杆菌 .....	(256)
第六节 PCR 检测牛白血病病毒 .....	(257)
第七节 PCR 检测犬细小病毒 .....	(258)
第八节 PCR 检测蓝舌病病毒 .....	(259)
第九节 PCR 检测鸡传染性法氏囊病病毒 .....	(261)
第十节 PCR 检测牛病毒性腹泻病毒 .....	(262)
第十一节 PCR 检测伪狂犬病病毒 .....	(264)
第十二节 PCR 检测甘薯羽状斑驳病毒 .....	(265)
第十三节 PCR 检测番木瓜环斑病毒 .....	(266)
第十四节 PCR 检测黄瓜花叶病毒 .....	(268)
第十五节 PCR 检测甜菜黄化病毒 .....	(270)
第十六节 PCR 检测芜菁花叶病毒 .....	(271)
第十七节 PCR 检测辣椒轻微斑驳病毒 .....	(272)
第十八节 单温扩增检测柑桔衰退病毒 .....	(274)
第十九节 PCR/T 检测菜豆黄色花叶病毒 .....	(277)
<b>附录一 分子生物学常用试剂和数据</b> .....	(279)
一、常用 DNA 分子量标准参照物 .....	(279)
二、几种生物的单倍体 DNA 含量 .....	(279)
三、几种代表性限制性内切酶的细菌来源和靶顺序 .....	(279)
四、常用蛋白酶抑制剂的特性 .....	(280)
五、常用酶溶液的配制 .....	(281)
六、用于 $\lambda$ 噬菌体操作的溶液 .....	(282)
七、常用缓冲液 .....	(282)
八、同位素资料 .....	(286)
九、凝胶加样缓冲液 .....	(287)

十、常用的电泳缓冲液 .....	(288)
十一、溴化乙锭溶液的净化处理 .....	(288)
十二、PCR 常用试剂的配制方法 .....	(289)
十三、细菌培养基 .....	(292)
十四、用于 PCR 的耐热 DNA 聚合酶特性 .....	(294)
十五、常见抑制剂对 <i>Taq</i> DNA 聚合酶活性的影响 .....	(294)
附录二 常见的市售酸碱的浓度 .....	(295)
附录三 各种浓度的酸碱贮存液的近似 pH 值 .....	(295)
附录四 医学检验常用试剂配制 .....	(295)
附录五 国内外化学试剂的规格、等级与标志 .....	(303)
附录六 常用化学药品的英文、分子式和分子量 .....	(305)
附录七 原子量 .....	(313)
附录八 国际制与统一公制计量单位对照 .....	(316)
附录九 希腊字母表 .....	(317)
附录十 离心转速与相对离心力(g)的换算 .....	(317)
附录十一 几种常用指示剂变色点、变色范围及配制 .....	(318)
附录十二 1ml 水在不同温度时的重量对照表 .....	(318)
附录十三 在标准温度 20℃ 时标称容量的允许误差 .....	(318)
附录十四 蛋白质含量测定 .....	(319)
附录十五 分子生物学常用名词解释 .....	(321)
附录十六 PCR 常用缩写词汇注释 .....	(324)
附录十七 医学检验中常用词汇英汉对照和缩写 .....	(325)
附录十八 国内外常用 PCR 扩增仪 .....	(337)
附录十九 国内检验试剂、仪器公司(厂)名录 .....	(338)

# 第一章

## PCR 技术概述

### 第一节 PCR 技术的发明

生物体不同于非生物的一个突出特点,是它们具有繁殖能力及遗传特性。一切生物体都能自身复制,复制品与原样无几差别,而且代代相传。早在四十年前,人们对遗传基因的化学本质还不清楚,而近年来,随着生物化学的进展,已经证实,脱氧核糖核酸(DNA)是遗传信息的主要载体。基因就是 DNA 大分子的一个片段,基因的不同只不过是 DNA 分子中核苷酸残基的种种不同排列顺序而已。1953 年 Watson 和 Crick 根据 X-线衍射图样及各种化学分析的数据,提出了 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,这是当代生物科学取得的极其重大的成就之一。在 DNA 双螺旋结构和复制方式的启发下,60 年代对基因的表达和调控的研究又取得很大进展,从细胞中分离目标基因并在体外克隆和表达的研究引起人们的普遍关注。70 年代以来,人们采用两种思路去尝试建立基因的无性繁殖体系,一是从众多的基因中分离出单个的目标基因,将其拼接到载体中构建成重组 DNA,因载体是具有独立复制能力的质粒或噬菌体等,当重组 DNA 引入细菌细胞后,经多次复制便可得到足够数量的 DNA 克隆片段。由于 Weiss 等(1968)和 Smith 等(1970)先后发现了 DNA 的连接酶和限制性内切酶,为重组 DNA 途径进行基因克隆铺平了道路,成为基因克隆最常用的技术。另一种思路是 Khorana 等(1971)提出的在体外经 DNA 变性,与适当引物杂交,再用 DNA 聚合酶延伸引物并不断重复该过程便可克隆 tRNA 基因。然而当时因不能合成寡核苷酸的引物和 DNA 测序困难两大主要技术障碍,这一设想渐渐被人们遗忘。直到 1985 年,美国 Cetus 公司人类遗传研究室的年轻科学家 Kary. B. Mullis 在偶然灵感的启迪下发明了具有划时代意义的聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction, PCR),使 Khorana 等的这一设想终于付诸实现。Saiki 等首次应用 PCR 法成功地扩增了人  $\beta$ -珠蛋白 DNA,并应用于镰刀状红细胞贫血的产前诊断。PCR 技术的发明,使人们多年来期望能在体外无限扩增 DNA 片段的梦想成为现实。

Mullis 等在建立 PCR 方法的初期,仅采用非常简单的三种温度的水浴进行实验,应用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段催化复性引物的延伸反应。由于该酶会在进行 DNA 变性的温度下失活,所以每一轮反应中都需重新加一次酶。这种反应只能扩增短片而且产量不高,加之操作繁琐,常规应用受到限制。1988 年, Saiki 等将耐热 DNA 聚合酶 (Taq 酶)引入 PCR,整个反应只加一次酶即可,扩增特异性和效率都明显改善,使操作大

为简化。随 *Taq* 酶的应用和自动化扩增仪的发展,极大地推动了 PCR 的普及应用。近年来,PCR 技术迅速渗透到生命科学的各个领域,成为当今最重要的分子生物学技术之一。由于 Mullis 的杰出贡献,这位年轻科学家荣获了 1993 年度诺贝尔化学奖。

PCR 技术能快速特异地扩增所希望的目标基因或 DNA 片段,并很容易使得微微克( $\mu\text{g}$ )水平的起始物达到微克( $\mu\text{g}$ )水平的量,它现已成为生命科学实验室获取某一目标 DNA 片段的一常规技术。PCR 技术本身的发展及与其他分子生物学技术相结合,已广泛应用于基因分离,克隆和核酸序列分析,突变体和重组体构建,基因表达与调控的研究,基因多态性分析,遗传病和传染病诊断,肿瘤机制的探查,法医学和考古学等领域。PCR 技术是核酸操作方法学上的一次革命,它必将大大推动分子生物学及其他相关学科的研究进展。

## 第二节 PCR 的基本原理

PCR 是体外酶促反应合成特异性 DNA 的一种方法。它利用人工合成引物介导的 DNA 聚合酶促反应,扩增位于两段已知序列之间的 DNA 区段。其主要步骤为:人工合成一对寡聚核苷酸引物,与待扩增 DNA 片段两条链的两端序列分别互补,由高温变性、低温复性和适温延伸组成一个周期,循环进行,使目的 DNA 得以迅速扩增。由此可见,PCR 就是在引物介导下反复进行“热变性—复性—延伸”而扩增 DNA 的循环过程(图 1,图 2)。

**变性:**模板 DNA 在  $94^{\circ}\text{C}$  下变性,双螺旋结构解开成为单链。

**复性:**将反应混合物降温,引物与单链 DNA 模板(或从 mRNA 逆转录来的 cDNA 模板)上的互补序列复性,形成模板-引物复合物。此时两个引物的 3' 端相对,5' 端相背。

**延伸:**在  $72^{\circ}\text{C}$  条件下,由 *Taq* DNA 聚合酶催化,将单核苷酸从引物的 3' 端开始掺入,沿模板  $5' \rightarrow 3'$  方向延伸,合成一条新的 DNA 链。

经上述变性—复性—延伸这样一个循环,模板拷贝数增加一倍。在以后进行的循环,新合成的 DNA 都起模板作用。因此每经过一个循环,DNA 拷贝数便增加 1 倍。理论上讲,DNA 的产量是指数方式增加,

即  $n$  次循环后,扩增产物拷贝数为  $2^n$ 。经过 25~30 个循环周期后,目标 DNA 可增加  $10^9$  倍。但是应该指出,扩增产物的指数式增加不是无限制进行的,在 PCR 反应后期,由于引

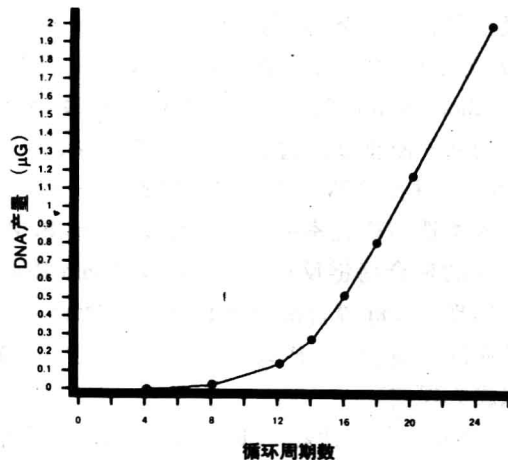


图 1 PCR 扩增产物增长曲线

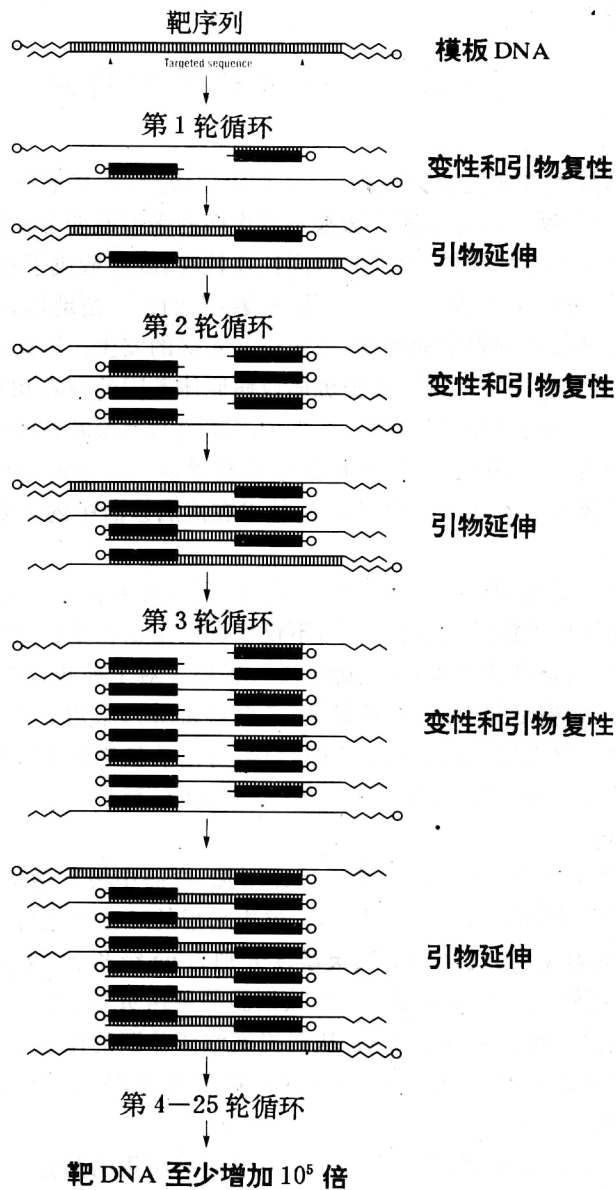


图 2 PCR 反应的基本原理

物和底物的消耗, *Taq* 酶活力下降等因素的影响, 扩增产物的增加逐渐由指数形式变为线性形式。所以实际上进行 30 个循环后, 扩增倍数一般可达  $10^6 \sim 10^7$ 。如想提高扩增产物的产量, 可将产物 DNA 样品稀释 1000~10000 倍后, 作为新的模板再进行第二轮 PCR 扩增。用这种方法, 二次 PCR 共经过了 60 个变性、复性和延伸的循环, DNA 的扩增倍数可达  $10^9 \sim 10^{10}$ 。这样, 再用核酸探针作印迹杂交, 便可测待检 DNA 样品中  $1/10^{13}$  的单拷贝靶序列 DNA。

### 第三节 PCR 技术的特点

传统的疾病诊断方法主要有四种,一是临床学诊断,二是形态学诊断,三是生物化学诊断,四是免疫学诊断。以上诊断方法都是以疾病的表型改变为依据的。现已知道,表型改变在很多情况下不是特异的,出现的时间往往较晚,因此造成了有时不能明确诊断和延误病情的困难。随着分子生物学知识的不断积累,人们已清楚地认识到作为生命的物质基础基因的改变会导致各种表型的改变,进而引起疾病的发生。因此,从方法学的发展和深化,采用各种分子生物学技术直接探查机体或病原体基因的存在和变异,从而对人体的状态和疾病作出诊断,这就是基因诊断。在多种多样的基因诊断技术中,以核酸探针杂交技术和 PCR 技术在临床应用最广,其中尤以 PCR 技术以其巧妙的原理和与众不同的特点,成为基因诊断首选的技术之一。现将 PCR 技术在疾病诊断中的主要特点概括如下。

#### 一、特异性高

以探测基因为目标,属于“病因诊断”,针对性强,对多种传染病,根据 PCR 检测结果可以确诊。在感染性疾病的基因诊断中,不仅可以检出正在生长的病原体,也可以检出潜伏的病原体,既能确定既往感染,也能确定现行感染。对于那些目前尚不能体外培养或难于培养的病原体(如梅毒螺旋体、结核杆菌、乙肝病毒等),采用 PCR 检查来确定感染就特别有效。PCR 检测的靶标志是病原体核酸,与生物化学和免疫学检查相比,PCR 结果与病原体分离培养结果更为一致,直接反映病原体的存在与否。

#### 二、灵敏度高

在 PCR 扩增中,模板 DNA 以指数级迅速增加,样品中极其微量的靶序列在数小时内即可增加上百万倍,因此检测灵敏度极高。过去采用的一些微量检测法,如酶联免疫吸附试验(ELISA)和放射免疫分析(RIA)其灵敏度分别为 ng 级和 pg 级,而 PCR 检测灵敏度可达 fg 级,理论上可检出一个细菌或一个真核细胞的单拷贝基因的存在。用 PCR 可以发现临床标本中微量的病原体或异常细胞,从而提高临床诊断的阳性率和准确性。PCR 方法还可用于单一双倍体细胞、一根头发、甚至单一精子进行 DNA 定型。

#### 三、简便快速

早期的 PCR 方法操作繁琐,原因有二,一是由于所用的酶是不耐热的 Klenow 片段,每一循环周期都必须补加有活性的聚合酶;二是必须不停地按时将反应管在三种温度水浴中转移,以满足变性、复性和延伸三个反应阶段的需要。随着耐热的 *Taq* DNA 聚合酶在 PCR 中的应用,使操作大为简化,加一次酶即可完成全部循环反应过程。加之 DNA 循环仪的发展和普及,使手工操作改为仪器自动循环,只需将反应管置入仪器内,反应便会按照预定的程序进行。商品化试剂盒的发展和运用,样品处理更为简单,一些试剂盒将各种反应成份预先混合制成工作液并分装成单人份,操作者不必自配各种试剂,只需将样品作简单处理和加样后即可进行扩增。许多 PCR 检查项目在两小时左右即可出报告。

#### 四、对样品要求低

几乎所有的临床标本都可用于 PCR 扩增。不同标本处理方法有所差异,但 PCR 检查

的标本预处理都不复杂。PCR 检测病原微生物,并不要求标本中有存活的病原体,病原体虽然失活,只要有完整的靶序列核酸,PCR 就可检查出来。因此,经过远距离运输临床标本或低温保存多年的陈旧标本,都可用于 PCR 扩增。一些过去靠脑脊液、骨髓检查的项目,PCR 以其高灵敏度和高特异性,从检查血、唾液或尿标本同样可以得到一致的结果,为标本采集带来方便,也使检测范围扩大和容易开展。

### 五、PCR 的局限性

由于 *Taq* 酶缺乏 3' → 5' 端的外切酶活性,因而不能纠正反应中发生的错误的核苷酸掺入,使 PCR 扩增产物有一定程度的错误掺入。估计这种错误是每 9000 个核苷酸掺入中发生一次错误,而合成 41000 个核苷酸可能导致一次框码移位。但是,错误掺入的碱基有终止链延伸作用的倾向,这使得发生了的错误不会进一步扩大。

PCR 在临床应用中另一种不足是,由于过高敏感性容易导致交叉扩增,在实验室污染的情况下可能出现假阳性结果;而在引物针对范围过窄或存在抑制剂等影响下也可能出现假阴性结果。因此需要严格设置各种对照以排除干扰,同时操作者还需不断积累观察和判断结果的经验,以保证检验报告的准确性。目前一些实验室在开展 PCR 方面还受仪器设备条件的限制,进一步降低 PCR 试剂成本,同各种传统检验方法比较分析以及操作人员的培养都是国内急待开展的工作。总之,PCR 有优点也存在缺点,它是现有各种检验方法的一种补充而不是替代。尤其对一些生物化学、免疫学检验可以获得明确结果的情况下,就没有必要滥用 PCR。

## 第四节 PCR 技术的新进展

PCR 本身及相关技术以惊人的速度发展,产生了许多新型的 PCR 技术或由 PCR 衍生的新技术。一些 PCR 新技术主要是在操作方法上的改进或与其他分子生物学技术相结合,从而给予了不同的名称。此外,在 PCR 发明的启发下,确有不少新的核酸体外扩增技术不断诞生,如转录依赖的扩增系统(TAS)、连接酶链反应(LCR)、自主序列复制系统(3SR)、链替代扩增(SDA)、Q $\beta$  复制酶系统、循环探针反应,等温扩增系统等。它们各有利弊,与 PCR 技术互为补充,形成了核酸体外扩增的一个方法学体系。许多新技术在理论上很诱人,但实际应用中由于需要特殊仪器、试剂或者操作复杂,因而难于推广普及。目前, Mullis 发明的经典的 PCR 技术,仍然是多数实验室进行核酸体外扩增时首选和常用的技术。在医学实验室,PCR 用于疾病诊断时,作者们各种方法学改进的尝试都突出反映临床的特点和要求,既要准确可靠又要简便快速,既要高灵敏度又要高特异性,还需防止交叉污染,在临床要求和实验室可操作性之间去寻找一个医师和检验师都能接受的平衡点。对这一平衡点的追求使得这类 PCR 技术独具特征,如同本书所称的“PCR 检验技术”,以突出反映 PCR 技术在医学检验领域中的应用。因此,本节将重点介绍有关医学检验方面的 PCR 技术的研究进展及应用前景。

### 一、简化样品制备

采用经典的 DNA 操作方法从临床标本中提取核酸,通常需要表面活性剂裂解细胞,

酚-氯仿-异戊醇反复抽提,蛋白酶 K 消化, RNA 酶消化和乙醇沉淀等步骤,其操作复杂费时,而且增加了标本间交叉污染的机会。因此简化 PCR 样品制备,探讨一种适用于临床诊断的简便和高效的核酸提取方法,是推广 PCR 在医学实验室普及应用中急待解决的问题。近年来,在简化 PCR 样品制备的研究中取得了一些进展,主要发展了三类简化方法,即表面活性剂处理法、固相吸附分离法和免疫磁珠法。现将三类方法简介如下,具体操作参见下章。

### (一)表面活性剂处理样品

许多作者实验发现,采用一定浓度的表面活性剂直接与标本混匀,经煮沸处理和高速离心后,取上清液即可作 PCR 扩增。其原理为,表面活性剂在裂解细胞的同时,加热使蛋白变性沉淀,而核酸游离于上清液中。这类方法的优点是简便快速,实验成本低,在单管内就可完成样品制备。不足之处是提取核酸的产量和纯度都比较低,有杂质残留。残留杂质主要有两个方面,一是临床标本中的杂质未能除尽,二是样品处理中所用表面活性剂的残留。许多实验表明,象 SDS 等残留会干扰下一步的 PCR 扩增反应。所以,选择适当的表面活性剂处理样品也很重要。目前文献报道中的 PCR 样品制备使用表面活性剂种类有 SDS, Sarkosyl, Tween-20, TritonX-100, Nonidet-P40(NP-40)等。其中 TritonX-100 和 NP-40 两种试剂比较温和,对 PCR 扩增反应的干扰比较小,为许多实验室广为采用。其应用浓度范围常在 0.25~1.0%,与临床标本等体积混合后,100℃煮沸 10 分钟,高速离心,取 10ul 上清液作 PCR 扩增。表面活性剂处理法适用于多数细胞、革兰氏阴性菌及一些病毒,如结核杆菌、淋球菌、军团菌和乙肝病毒等。对一些难处理的革兰氏阳性菌,在表面活性剂裂解液中再加入 6mol/L 的 NaI,裂解效果更好。这类处理法适用的临床标本包括血清,胸水、腹水和尿的沉淀物,分泌物等。

### (二)固相吸附法

经典的 DNA 提取方法是在液相中用有机溶剂选择性沉淀核酸,而固相吸附法的原理不同,是利用一些特殊的载体物质来吸附临床标本中的微量核酸,经洗涤除去杂质后,再改变液相条件将吸附的核酸洗脱下来,或者直接用固相物质上吸附的核酸进行下一步试验。近年来,采用这类方法制备 PCR 样品发展很快,所用可以吸附核酸的固相载体包括玻璃粉、二氧化硅、硅藻颗粒、Immobilon-P 滤膜等。其中利用固相颗粒吸附的方法以 Boom (1990)的硅藻吸附法为代表并且应用最广,既可提 DNA 也可提 RNA。此法的原理是利用硫氰酸胍具有裂解细胞和灭活核酸酶的两种特性,因而在高浓度硫氰酸胍存在下,以细胞或病毒颗粒中释放出的核酸可以吸附在硅藻颗粒上,用 TE 缓冲液再将核酸洗脱,或直接用硅藻颗粒作反转录试验等。Boom 的方法简便快速,能除去样品中的绝大多数杂质,可同时处理大规模的临床标本。尤其对于痰、脓液、粪便等混杂标本,采用其他方法提取效果不好时,改用 Boom 法制备 PCR 样品,可排除多种干扰,获得较好的扩增效果。对一些 RNA 病毒,如血浆中的丙肝病毒、艾滋病毒等,Boom 法也同样适用,除扩增结果好外,还缩短处理标本所需的时间,可更快地为临床医生提供 PCR 检验报告。

另一类固相吸附法是采用 Immobilon-P 滤膜,此膜具有亲蛋白和疏核酸的特性。因此将临床标本经该膜过滤时,膜对蛋白有高度结合能力而吸附病毒颗粒,使之固相化,再用表面活性剂 Tween-20 和蛋白酶 K 消化膜上的病毒颗粒,于是核酸从衣壳中释放出



来,同时灭活存在于标本中的核酸酶。由于 Immobilon-P 膜亲蛋白疏核酸的特性,从病毒颗粒释放的核酸进入溶液中,而蛋白则吸附在膜上,从而将核酸与杂质分离开来。在溶液中加入相应引物后即可作反转录及 PCR 扩增。这种膜取提方法较常规的病毒 RNA 分离技术简单、快速和敏感。可以 100ul 血清中测出 6.5CFU 的 RNA 病毒,因此适用于低水平病毒血症的检测。随着有关试剂的商品化和普及,利用膜吸附法制备 PCR 样品会有一定的应用前景。

### (三)免疫磁珠法

这一方法是采用免疫学途径制备 PCR 样品的代表,其全称为“磁性免疫 PCR 分析”(Magnetic Immuno PCR Assay, MIPA),主要应用于粪便之类复杂标本的预处理。过去靠传统的方法从粪便标本中提取病原菌 DNA,既繁琐又费时,而且难于提取到纯净的 DNA,残留杂质常常干扰 PCR 反应,导致假阴性结果。MIPA 的基本原理是,采用特异性抗体包被的磁珠与稀释为匀浆的粪便标本混合温育,借助于磁力,将表面结合有免疫复合物的磁珠与样品中的杂质相分离,洗涤磁珠并重悬于蒸馏水中,95℃处理 5 分钟以裂解磁珠表面结合的病原菌,上清液就可用于 PCR。用 MIPA 法制备 PCR 样品操作简单、省时,PCR 扩增效果好。目前已成功地用于从粪便标本中提取沙门氏菌、志贺氏菌、梭状芽胞杆菌等病原菌 DNA。

## 二、改进扩增方法

PCR 在临床应用中的另一个显著的特点是扩增方法的改进,这些改进表现在引物设计、扩增体系和产物检测等方面,以适应临床的特殊要求。

### (一)引物类型的改变

用于临床诊断中检测病原体的 PCR 系统,过去常用特异性抗原或毒素的基因为扩增靶序列,而目前的发展普遍选择 16S RNA 基因或特异性重复序列为扩增靶序列,因为后者序列具有高度保守性,扩增检测特异性高;而且 16S RNA 基因或重复序列在细胞内呈多拷贝存在,使这类 PCR 检测系统比使用其他靶序列的 PCR 具有更高的灵敏度。

引物方面的改变还表现于 PCR 中引物对数目的增加,称为复合 PCR。即在同一 PCR 扩增系统中同时使用多对引物,每对引物针对不同的病原体,不同引物介导的扩增产物在长度上有明显差别。所以观察电泳结果时,不同的片段代表不同的病原体,从而实现一步扩增法同时诊断多种疾病。Nedjar 等(1994)报道的乙肝病毒(HBV)和丙肝病毒(HCV)的同步扩增就是这类方法的代表。这种复合 PCR 法降低临床检测成本,减少检验人员的重复劳动,临床医生通过一次送样检测可获得更多的参考依据。除血清标本外,复合 PCR 还可用于其他标本,如同时检测粪便标本中的不同病原菌(沙门氏菌、志贺氏菌、霍乱弧菌、致病性大肠杆菌等),或同时检测临床拭子标本中的淋球菌和沙眼衣原体(Wong, K. C. 等,1995)等方面也具有一定的应用潜力。

引物类型改变的另一种趋势,是在特异性引物介导的扩增之外,由通用引物介导的非特异性扩增的兴起和应用。两者的差别是,特异性引物扩增只检测病原体某一基因片段,而非特异性引物扩增是对整个基因组扫描,以分析 DNA 序列的多态性。结合 PCR 技术检测 DNA 多态性的方法主要依靠 DNA 指纹图。九十年代以来,利用 PCR 构建 DNA 指纹图主要有四种途径:1)利用 PCR 扩增时掺入示踪物产生标记探针,与基因组酶切图谱杂交