



Current PCR Technology:

Fundamentals, Methods and Applications

# PCR最新技术 原理、方法及应用

第二版

黄留玉 主编



化学工业出版社



科学出版社  
Science Press

中国科学院植物研究所  
中国科学院微生物研究所

中国科学院微生物研究所  
中国科学院植物研究所

# PCR最新技术 原理、方法及应用

张永成 编

科学出版社

ISBN 7-03-014111-1



**Current PCR Technology:**

**Fundamentals, Methods and Applications**

# PCR最新技术 原理、方法及应用

**第二版**

黄留玉 主编

王恒樑 刘先凯 袁静 侯利华 副主编

苏国富 主审



化学工业出版社

·北京·

## 图书在版编目 (CIP) 数据

PCR 最新技术原理、方法及应用/黄留玉主编. —2  
版. —北京: 化学工业出版社, 2010. 11

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-09482-7

I. P… II. 黄… III. 聚合酶-链式反应 IV. Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 176699 号

---

责任编辑: 傅四周 郎红旗  
责任校对: 王素芹

文字编辑: 向 东  
装帧设计: 关 飞

---

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 25¼ 字数 723 千字 2011 年 1 月北京第 2 版第 1 次印刷

---

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

---

定 价: 99.00 元

版权所有 违者必究

## 出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学无时无刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和发展了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了“生物实验室系列”图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，约请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

“生物实验室系列”图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及

高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望“生物实验室系列”图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社  
生物·医药出版分社

# 序

受作者之邀为这本书作序，初看书名我有点兴趣索然，因为当今 PCR 仅在实验室几乎是唾手可及，有关 PCR 的文章比比皆是，关于 PCR 的专著也不胜枚举。但本书的目录及编者诱使我浏览全书，翔实的内容及文风令我欣然命笔。

PCR 是分子生物学的常规方法，广泛的应用也促进了 PCR 自身的发展。PCR 已不再是单一的技术方法，而是一大类技术方法的总称。这些方法分散于多种书籍和资料之中，不便查寻和应用。本书对几十种 PCR 方法进行收集、分析和整理，比较全面地反映了 PCR 的全貌，在一定程度上将给广大分子生物学工作者的查阅提供方便。

PCR 是分子生物学的实用技术，需要对每种方面进行详细、实用的描述。这本书的编者正是一群几乎天天与 PCR 打交道的科研人员，他们将理论与实践相结合，对每一种 PCR 方法既介绍简要的原理，又有实用的操作步骤和应用示例，更有处理疑难问题的经验总结，是一本难得的 PCR 技术方法操作手册。

全面而实用使本书具备了工具书的基本特点。作为分子生物学工作者，执此书于案头或实验台旁，或读或查，相信都将有益于提高科研工作的质量和效率，推动科技事业的发展。

黄翠芬

中国工程院院士，军事医学科学院研究员

2004 年 4 月 26 日于北京

## 第二版前言

《PCR 最新技术原理、方法及应用》一书出版已 5 年了。在这期间随着生命科学研究的深入，又衍生出了一些新的方法。这次再版的目的是想及时地把它们介绍给读者。在新版中，详细地介绍了芯片 PCR、电子 PCR 和数字 PCR 及其应用。还增加了 PCR 在各领域中应用的内容。对一些重要的 PCR 方法，诸如致突变 PCR、免疫 PCR、实时荧光定量 PCR 和 PCR 在法医中的应用等一些章节由原编者进行了改写，但为了保持一定的完整性，也保留了第一版中的一些方法。整本书的编排还是按照第一版的编排方式。同样这种编排方式不尽完善，因为一种 PCR 方法有几种不同的用处，为了达到一种目的可采用几种不同 PCR 方法。所以建议读者在书中寻找符合自己实验目的的 PCR 方法时，除了阅读与此相关的章节外，还可参阅其他章节。为了便于读者快速检索，我们尝试着编了主题索引，以技术方法和应用领域为关键词，置于书后，读者可参考使用。

由于本书是一本介绍实验方法的书，所以在编写时力图使提供的方法尽可能详细，对每一种方法提供了详细的反应体系和反应条件，但读者在具体应用时，也不宜照本宣科，应在实验过程中因势制定，对实验条件进行必要的优化。本书适用于所有从事生命科学的科技工作者、教师和研究生。

本书由军事医学科学院微生物流行病学研究所、生物工程研究所、疾病预防控制所与中国药品生物制品检定所、海军总医院、中国疾病预防控制中心传染病预防控制所的中青年科技工作者和博士研究生撰写。尽管他们工作在第一线，但毕竟年轻、水平有限，加上时间仓促，书中难免有疏漏和不足之处，恳请读者指正！

黄留玉

军事医学科学院疾病预防控制所

2010 年 10 月于北京



# 第一版前言

PCR 是分子生物学的关键技术，又是常规技术。PCR 技术的出现极大地推动了分子生物学的发展，旋即被迅速推广和应用到生命科学的其他领域。广泛的应用带动了 PCR 技术的发展，PCR 技术的发展又产生了新的应用。如此螺旋上升，使 PCR 技术在 20 年的时间里，从无到有，从只能单纯扩增已知两端序列之间的 DNA 片段，发展到应用于各个领域的几十种 PCR 方法，而且这种发展还在继续。

本书的重点不是介绍常规 PCR 的原理和方法，因为已出版了不少介绍这方面内容的书籍。编写本书的目的是想把到目前为止已报道的各种各样的 PCR 方法呈现给读者。在编排过程中发现把这些方法单独罗列出来显得有些凌乱，于是我们设法按照设计这些 PCR 方法的目的和应用进行归类，本书就把它们归成十四章。但发现这种归类也不完全合理，例如第二章是“反转录 PCR”，并没有也不可能把所有与反转录有关的 PCR 都列在这一章，所以在其他章节也有反转录 PCR 的内容。第五章的标题是“致突变 PCR”，但其他章节的 PCR 方法有的也能引起突变。还有，由于一个 PCR 方法有几种不同的用处，不可能把它归到各个章节中去，例如多重 PCR 被归在第十二章“PCR 在遗传病诊断中的应用”，但它还可用于感染性疾病的诊断、法医学和检测转基因动植物。所以，建议读者在寻找符合自己实验目的的 PCR 方法时，除了阅读与自己实验目的相符的章节外，还可参阅其它章节。以亲子鉴定为例，首先阅读第十一章“PCR 在法医学中的应用”，再参阅其它章节，因为其它章也有可用于亲子鉴定的 PCR 方法。为便于读者快速检索，我们尝试着编出主题索引，以技术方法和应用领域的关键词为主，置于书后，读者可参考使用。

由于本书是介绍技术方法的书，所以在编写时力求使提供的方法尽可能详细，对每一种方法提供了详细的反应体系和反应条件，但读者在具体应用时，也不宜照本宣科，应在实验过程中因势制宜，对实验条件进行必要的优化。

由于时间仓促，水平有限，书中难免有疏漏和错误之处，恳请读者指正。

黄留玉

2004 年 4 月 20 日于北京

军事医学科学院

# 目 录

<b>第一章 绪论</b> .....	1	三、材料 .....	27
第一节 PCR 发展简史 .....	1	四、操作步骤 .....	28
第二节 PCR 技术的基本原理和操作 .....	2	五、注意事项 .....	30
一、PCR 的基本原理 .....	2	六、应用 .....	31
二、PCR 的基本成分 .....	2	七、小结 .....	33
三、PCR 的基本操作 .....	3	参考文献 .....	33
第三节 PCR 的主要应用 .....	4	<b>第五节 Bubble-PCR</b> .....	34
一、基础研究方面的应用 .....	4	一、引言 .....	34
二、临床上的应用 .....	5	二、原理 .....	34
三、法医学中的应用 .....	6	三、材料与方法 .....	35
四、其它方面的研究 .....	6	四、注意事项 .....	36
本章参考文献 .....	7	五、应用 .....	36
<b>第二章 扩增已知序列两侧 DNA 的 PCR</b> .....	8	六、小结 .....	37
第一节 反向 PCR .....	8	参考文献 .....	37
一、引言 .....	8	<b>第三章 巢式 PCR</b> .....	38
二、基本原理 .....	8	第一节 常规巢式 PCR .....	38
三、材料 .....	8	一、引言 .....	38
四、方法 .....	9	二、原理 .....	38
五、注意事项 .....	10	三、材料 .....	38
六、应用 .....	11	四、方法 .....	39
七、小结 .....	13	五、注意事项 .....	39
参考文献 .....	13	六、应用与小结 .....	39
第二节 锚定 PCR .....	13	参考文献 .....	40
一、引言 .....	13	<b>第二节 半巢式 PCR</b> .....	40
二、原理 .....	14	一、引言 .....	40
三、用连接锚定 PCR 从基因文库中扩增已知基因侧翼序列 .....	15	二、材料 .....	40
四、用互补锚定 PCR 直接扩增已知序列侧翼 cDNA 序列 .....	16	三、方法 .....	40
五、问题及对策 .....	19	四、注意事项 .....	41
六、小结 .....	20	五、应用与小结 .....	41
参考文献 .....	21	参考文献 .....	41
第三节 RACE-cDNA 末端的快速扩增 .....	21	<b>第三节 反转录巢式 PCR</b> .....	41
一、引言 .....	21	一、引言 .....	41
二、RACE 基本原理 .....	22	二、材料 .....	41
三、实验方案 .....	23	三、方法 .....	42
四、RACE 的应用 .....	26	四、注意事项 .....	43
五、小结 .....	26	五、应用 .....	43
参考文献 .....	26	参考文献 .....	43
第四节 连接介导的 PCR .....	27	<b>第四节 共有序列巢式 PCR</b> .....	43
一、引言 .....	27	一、引言 .....	43
二、原理 .....	27	二、材料 .....	43

参考文献 .....	45	五、在遗传学及 SNP 分析上的应用 .....	71
第五节 种特异巢式 PCR .....	45	本章小结 .....	71
一、引言 .....	45	本章参考文献 .....	72
二、材料 .....	45	<b>第五章 致突变 PCR .....</b>	<b>74</b>
三、方法 .....	45	第一节 随机错误掺入 PCR 构建突变	
四、注意事项 .....	46	体库 .....	74
五、应用与小结 .....	46	一、引言 .....	74
参考文献 .....	47	二、原理 .....	75
第六节 巢式 PCR-变性梯度凝胶电泳 .....	47	三、材料与方法 .....	75
一、引言 .....	47	四、注意事项 .....	75
二、材料 .....	47	五、讨论 .....	76
三、方法 .....	47	六、应用 .....	76
四、注意事项 .....	48	第二节 PCR 构建定点突变序列或重组	
五、应用与小结 .....	49	序列 .....	77
参考文献 .....	49	一、引言 .....	77
第七节 巢式 PCR-限制性片段长度多		二、实验方案 .....	77
态性 .....	49	方案 1 重叠延伸 PCR .....	77
一、引言 .....	49	方案 2 大引物 PCR .....	79
二、材料 .....	49	方案 3 重组 PCR .....	80
三、方法 .....	50	方案 4 环状质粒 PCR .....	82
四、注意事项 .....	51	三、注意事项 .....	84
五、应用与小结 .....	51	四、讨论 .....	84
参考文献 .....	51	五、应用 .....	85
<b>第四章 实时荧光定量 PCR .....</b>	<b>52</b>	六、小结 .....	86
第一节 实时荧光定量 PCR 原理 .....	52	本章参考文献 .....	86
一、引言 .....	52	<b>第六章 测序和 DNA 合成 PCR .....</b>	<b>87</b>
二、概念及原理 .....	52	第一节 不对称 PCR .....	87
第二节 实时荧光定量 PCR 中的荧光化学		一、引言 .....	87
物质 .....	54	二、引物浓度不对称 PCR .....	87
一、引言 .....	54	三、热(引物长度)不对称 PCR .....	89
二、荧光染料 .....	54	四、应用 .....	92
三、水解探针 .....	54	五、小结 .....	93
四、分子信标 .....	55	参考文献 .....	93
五、双杂交探针 .....	56	第二节 PCR 测序法 .....	94
六、复合探针 .....	57	一、直接测序法 .....	94
第三节 实时荧光定量 PCR 的定量方法 .....	57	二、循环测序法 .....	95
一、绝对定量 .....	57	三、全自动 DNA 测序法 .....	96
二、相对定量 .....	58	四、应用 .....	97
第四节 实时荧光定量 PCR 的实验方法 .....	60	参考文献 .....	97
一、实时定量 PCR .....	61	第三节 乳化液 PCR .....	97
二、实时定量 RT-PCR .....	63	一、引言 .....	97
三、实验方案的优化 .....	65	二、原理 .....	97
四、实践中应该注意的问题 .....	67	三、材料和方法 .....	98
第五节 实时荧光定量 PCR 技术的应用 .....	68	四、应用 .....	105
一、在病原体检测中的应用 .....	68	五、小结 .....	105
二、在肿瘤研究中的应用 .....	69	参考文献 .....	105
三、在基因表达研究中的应用 .....	70	第四节 基于 PCR 的大片段 DNA 的	
四、在细胞因子表达分析中的应用 .....	70	合成 .....	106

一、引言 .....	106	参考文献 .....	145
二、基本原理 .....	106	<b>第八章 PCR 芯片</b> .....	146
三、目的序列、寡核苷酸和测序引物的设计 .....	106	第一节 PCR 芯片的结构及其工作原理 .....	146
四、操作步骤 .....	108	一、引言 .....	146
五、DNA 合成时常出现的问题及解决办法 .....	111	二、原理 .....	146
六、小结 .....	112	三、方法 .....	149
参考文献 .....	112	四、应用 .....	149
<b>第七章 免疫 PCR</b> .....	114	五、小结 .....	149
第一节 immuno-PCR .....	114	参考文献 .....	150
一、引言 .....	114	第二节 纳升高通量 PCR .....	150
二、基本原理 .....	114	一、引言 .....	150
三、材料和试剂 .....	116	二、原理 .....	150
四、方法 .....	116	三、材料 .....	151
五、注意事项 .....	121	四、实验方法 .....	151
六、应用 .....	121	五、注意事项 .....	151
七、小结 .....	122	六、应用 .....	152
参考文献 .....	122	七、小结 .....	152
第二节 免疫捕捉 PCR .....	123	参考文献 .....	152
一、引言 .....	123	第三节 微流控 PCR .....	152
二、基本原理 .....	124	一、引言 .....	152
三、材料 .....	124	二、原理 .....	153
四、方法 .....	124	三、材料 .....	153
五、注意事项 .....	126	四、方法 .....	154
六、应用 .....	127	五、应用 .....	154
七、小结 .....	128	六、小结 .....	154
参考文献 .....	129	参考文献 .....	154
第三节 PCR-ELISA .....	130	第四节 连续流热梯度 PCR .....	154
一、引言 .....	130	一、引言 .....	154
二、原理 .....	130	二、原理 .....	155
三、材料 .....	131	三、材料 .....	155
四、方法 .....	131	四、操作方法 .....	155
五、注意事项 .....	132	五、注意事项 .....	155
六、应用 .....	132	六、应用 .....	156
七、小结 .....	134	七、小结 .....	156
参考文献 .....	135	参考文献 .....	156
第四节 原位 PCR .....	135	第五节 PCR 芯片的应用 .....	156
一、引言 .....	135	一、引言 .....	156
二、基本原理 .....	135	二、应用 .....	157
三、原位 PCR 方法分类及其设计方案 .....	136	三、注意事项 .....	158
四、原位 PCR 基本步骤 .....	138	四、小结 .....	159
五、原位 PCR 方法的选择 .....	139	参考文献 .....	159
六、原位 PCR 操作注意事项 .....	140	<b>第九章 电子 PCR 和数字化 PCR</b> .....	160
七、原位 PCR 存在的问题和结果分析 .....	141	第一节 电子 PCR .....	160
八、原位 PCR 的应用 .....	142	一、引言 .....	160
九、原位 PCR 操作程序示例 .....	142	二、e-PCR 概念 .....	160
十、小结 .....	144	三、e-PCR 的基本原理 .....	161
		四、与 e-PCR 相关的数据库 .....	162
		五、e-PCR 的使用方法 .....	162

六、应用 .....	165	参考文献 .....	202
七、致谢 .....	168	第五节 不依赖连接反应的克隆 PCR .....	203
参考文献 .....	168	一、引言 .....	203
第二节 数字 PCR 和微流体数字 PCR		二、基本原理 .....	203
技术 .....	169	三、材料 .....	204
一、引言 .....	169	四、方法 .....	204
二、数字 PCR 的原理 .....	170	五、注意事项 .....	206
三、数字 PCR 的操作及应用 .....	170	六、应用 .....	206
四、微流体数字 PCR .....	173	参考文献 .....	207
参考文献 .....	177	第六节 菌落 PCR .....	208
<b>第十章 其它 PCR 方法</b> .....	179	一、引言 .....	208
第一节 高 (G+C) 含量 DNA 的 PCR		二、原理 .....	208
扩增 .....	179	三、材料 .....	208
一、使用增强剂改善高 (G+C) 含量 DNA		四、操作方法 .....	208
模板的 PCR 扩增 .....	179	五、注意事项 .....	209
二、NaOH 对模板进行预处理改善高		六、应用 .....	209
(G+C) 含量 DNA 的 PCR 扩增 .....	182	七、小结 .....	209
三、利用高温 PCR 体系改善高 (G+C) 含量		参考文献 .....	209
DNA 模板的 PCR 扩增 .....	183	<b>第十一章 PCR 在基因分型中的应用</b> .....	210
四、应用 .....	183	第一节 任意引物 PCR .....	210
五、小结 .....	184	一、引言 .....	210
参考文献 .....	184	二、任意引物 PCR 的基本原理及技术	
第二节 长片段 PCR .....	185	特点 .....	210
一、引言 .....	185	三、AP-PCR 方法 .....	210
二、原理 .....	185	四、RAP-PCR 方法 .....	211
三、材料 .....	185	五、注意事项 .....	212
四、方法 .....	186	六、应用 .....	213
五、注意事项 .....	187	七、小结 .....	216
六、应用 .....	189	参考文献 .....	216
七、小结 .....	190	第二节 通用 PCR .....	217
参考文献 .....	191	一、引言 .....	217
第三节 利用热激活引物进行热启动 PCR .....	191	二、原理 .....	217
一、引言 .....	191	三、材料 .....	217
二、原理 .....	191	四、方法 .....	217
三、材料 .....	192	五、注意事项 .....	219
四、方法 .....	192	六、应用 .....	219
五、注意事项 .....	194	七、小结 .....	220
六、应用 .....	194	参考文献 .....	220
七、小结 .....	196	第三节 rep-PCR .....	221
参考文献 .....	197	一、引言 .....	221
第四节 融合 PCR .....	197	二、基本原理 .....	221
一、引言 .....	197	三、材料 .....	221
二、融合 PCR 的原理 .....	197	四、方法 .....	223
三、应用于基因插入的融合 PCR 的具体		五、注意事项 .....	224
操作步骤 .....	198	六、应用 .....	225
四、融合 PCR 的应用 .....	198	七、小结 .....	226
五、融合 PCR 操作方法的注意事项 .....	201	参考文献 .....	227
六、小结 .....	202	第四节 序列特异性引物 PCR .....	227

一、引言 .....	227	参考文献 .....	246
二、原理 .....	228	第三节 降落 PCR .....	246
三、材料 .....	228	一、引言 .....	246
四、方法 .....	228	二、原理 .....	246
五、注意事项 .....	230	三、材料 .....	246
六、应用与小结 .....	231	四、方法 .....	246
参考文献 .....	231	五、降落 PCR 与常规 PCR 的比较 .....	247
第五节 简单序列重复区间 PCR .....	231	六、应用 .....	248
一、引言 .....	231	七、小结 .....	249
二、原理 .....	231	参考文献 .....	249
三、材料 .....	232	第四节 16SrRNA PCR .....	250
四、方法 .....	232	一、引言 .....	250
五、注意事项 .....	233	二、原理 .....	250
六、应用 .....	233	三、材料及设备 .....	251
七、小结 .....	234	四、方法 .....	251
参考文献 .....	234	五、注意事项 .....	252
第六节 钳制 PCR .....	235	六、应用 .....	252
一、引言 .....	235	七、小结 .....	253
二、原理 .....	235	参考文献 .....	254
三、材料 .....	235	第五节 PCR 偶联连接酶链式反应 .....	255
四、方法 .....	236	一、原理 .....	255
五、注意事项 .....	236	二、材料 .....	255
六、应用 .....	236	三、方法 .....	255
参考文献 .....	236	四、注意事项 .....	257
第七节 序列特异性寡核苷酸多态性 PCR .....	237	五、应用 .....	258
一、原理 .....	237	参考文献 .....	259
二、试剂 .....	237	第六节 快速 PCR .....	259
三、方法 .....	238	一、引言 .....	259
四、注意事项 .....	241	二、原理 .....	259
五、应用 .....	242	三、材料 .....	260
参考文献 .....	242	四、方法 .....	260
<b>第十二章 PCR 在临床诊断及流行病学调</b>		五、注意事项 .....	264
<b>查中的应用 .....</b>	<b>243</b>	六、小结 .....	266
第一节 表位特异 PCR .....	243	参考文献 .....	266
一、引言 .....	243	第七节 稀有限制性位点 PCR .....	267
二、原理 .....	243	一、引言 .....	267
三、材料 .....	243	二、原理 .....	267
四、方法 .....	243	三、材料 .....	267
五、应用 .....	244	四、方法 .....	269
六、小结 .....	244	五、注意事项 .....	270
参考文献 .....	244	六、应用 .....	270
第二节 双标记 PCR .....	245	七、小结 .....	271
一、引言 .....	245	参考文献 .....	271
二、原理 .....	245	<b>第十三章 PCR 在法医学中的应用 .....</b>	<b>273</b>
三、材料 .....	245	第一节 小卫星可变重复序列 PCR .....	273
四、方法 .....	245	一、引言 .....	273
五、应用 .....	245	二、原理 .....	273
六、注意事项 .....	245	三、方法 .....	274

四、应用 .....	277	参考文献 .....	322
五、小结 .....	278	第二节 常用的等位基因特异性 PCR .....	325
参考文献 .....	279	一、引言 .....	325
第二节 短串联重复序列的 PCR .....	280	二、原理 .....	325
一、引言 .....	280	三、材料 .....	325
二、原理 .....	280	四、方法 .....	325
三、材料 .....	281	五、注意事项 .....	327
四、方法 .....	282	六、对等位基因特异 PCR 的改进 .....	327
五、注意事项 .....	286	七、应用与小结 .....	328
六、应用 .....	286	参考文献 .....	329
七、小结 .....	288	第三节 简单等位基因辨别 PCR .....	329
参考文献 .....	288	一、引言 .....	329
第三节 单核苷酸多态性 PCR .....	289	二、原理 .....	329
一、引言 .....	289	三、材料 .....	331
二、原理 .....	289	四、方法 .....	331
三、材料及方法 .....	292	五、注意事项 .....	331
四、SNP-PCR 检测方法 .....	293	六、应用与小结 .....	332
五、数据库 .....	295	参考文献 .....	332
六、应用 .....	296	第四节 L-DNA 标记的等位基因特异性 PCR .....	332
七、小结 .....	298	一、引言 .....	332
参考文献 .....	298	二、原理 .....	332
第四节 全基因组 PCR .....	300	三、材料 .....	332
一、引言 .....	300	四、方法 .....	333
二、全基因组 PCR 的种类 .....	300	五、注意事项 .....	334
三、基因组 DNA 模板的制备 .....	304	六、应用与小结 .....	334
四、不同 WGA 方法的比较 .....	305	参考文献 .....	334
五、WGA 的产物分析及应用 .....	305	第五节 同源一步荧光等位基因特异性 PCR .....	334
六、小结 .....	307	一、引言 .....	334
参考文献 .....	308	二、原理 .....	335
第五节 单分子 PCR .....	309	三、材料 .....	335
一、引言 .....	309	四、方法 .....	335
二、原理 .....	309	五、注意事项 .....	337
三、材料 .....	309	六、应用与小结 .....	337
四、方法 .....	309	参考文献 .....	337
五、注意事项 .....	310	第六节 低温变性共扩增 PCR .....	337
六、SM-PCR 的应用 .....	310	一、引言 .....	337
七、小结 .....	311	二、原理 .....	338
参考文献 .....	311	三、材料 .....	339
<b>第十四章 PCR 在遗传病诊断中的 应用 .....</b>	<b>312</b>	四、方法 .....	339
第一节 多重 PCR .....	312	五、小结 .....	339
一、引言 .....	312	参考文献 .....	339
二、原理 .....	312	第七节 限制性片段长度多态性 PCR .....	340
三、材料 .....	313	一、原理 .....	340
四、方法 .....	313	二、材料 .....	341
五、常见问题的解决 .....	316	三、操作方法 .....	341
六、应用 .....	317	四、注意事项 .....	342
七、小结 .....	322		

五、应用 .....	342	<b>第十六章 PCR 在动物学中的应用</b> .....	370
参考文献 .....	343	第一节 微卫星 PCR 在动物分类和进化	
<b>第八节 PCR-变性梯度凝胶电泳</b> .....	343	中的应用 .....	370
一、原理 .....	343	一、引言 .....	370
二、材料 .....	343	二、基本原理 .....	370
三、操作方法 .....	344	三、材料 .....	371
四、注意事项 .....	345	四、方法 .....	371
五、应用 .....	345	五、注意事项 .....	371
参考文献 .....	346	六、应用 .....	372
<b>第十五章 PCR 在癌症诊断中的应用</b> ...	347	七、小结 .....	372
第一节 甲基化特异 PCR .....	347	参考文献 .....	372
一、引言 .....	347	第二节 巢式 PCR 在动物疾病诊断中的	
二、基本原理 .....	347	应用 .....	373
三、材料 .....	347	一、引言 .....	373
四、方法 .....	348	二、基本原理 .....	373
五、注意事项 .....	349	三、材料 .....	373
六、应用 .....	350	四、方法 .....	373
七、小结 .....	351	五、注意事项 .....	374
参考文献 .....	351	六、应用 .....	374
第二节 差异显示 PCR .....	352	七、小结 .....	375
一、引言 .....	352	参考文献 .....	375
二、原理 .....	352	第三节 T 接头介导 PCR 在转基因动物	
三、方法 .....	353	外源基因定位中的应用 .....	375
四、应用 .....	356	一、引言 .....	375
五、小结 .....	358	二、原理 .....	376
参考文献 .....	358	三、材料 .....	376
第三节 PCR-单链构象多态性 .....	359	四、方法 .....	376
一、原理 .....	359	五、注意事项 .....	377
二、材料 .....	360	六、应用 .....	378
三、方法 .....	360	七、小结 .....	378
四、注意事项 .....	362	参考文献 .....	378
五、应用 .....	363	第四节 等温扩增技术在动物学中的应用 .....	378
参考文献 .....	363	一、引言 .....	378
第四节 单细胞 PCR .....	364	二、基本原理 .....	378
一、引言 .....	364	三、材料 .....	379
二、基本原理 .....	364	四、方法 .....	379
三、材料和方法 .....	364	五、注意事项 .....	381
四、注意事项 .....	367	六、应用 .....	382
五、应用 .....	368	七、小结 .....	383
六、小结 .....	368	参考文献 .....	383
参考文献 .....	369	<b>索引</b> .....	384



# 第一章 绪 论

聚合酶链(式)反应(polymerase chain reaction, PCR)是体外扩增 DNA 序列的技术。它与分子克隆和 DNA 序列分析方法几乎构成了整个现代分子生物学实验的工作基础。在这三种实验技术中,PCR 方法在理论上出现最早,也是目前在实践中应用得最广泛的。PCR 技术使微量的核酸(DNA 或 RNA)操作变得简单易行,同时还可使核酸研究脱离于活体生物。PCR 技术的发明是分子生物学的一项革命,极大地推动了分子生物学以及生物技术产业的发展。

## 第一节 PCR 发展简史

核酸研究已有 100 多年的历史,20 世纪 60 年代末、70 年代初,人们致力于研究基因的体外分离技术,但由于核酸的含量较少,在一定程度上是限制了 DNA 的体外操作。Khorana 于 1971 年最早提出核酸体外扩增的设想:“经过 DNA 变性,与合适的引物杂交,用 DNA 聚合酶延伸引物,并不断重复该过程便可合成 tRNA 基因”。但由于基因序列分析方法尚未成熟,热稳定的 DNA 聚合酶尚未报道,以及寡聚核苷酸引物合成还处在手工及半自动合成阶段,这种想法似乎没有实际意义。

1983 年美国科学家 Kary Mullis 驱车在蜿蜒的州际高速公路上行驶时,孕育出了 PCR 的雏形。经过两年的努力,在实验上证实了 PCR 的构想,并于 1985 年申请了有关 PCR 的第一个专利,在“science”杂志上发表了第一篇 PCR 的学术论文。从此 PCR 技术得到了生命科学界的普遍认同。Kary Mullis 也因此获得了 1993 年的诺贝尔化学奖。但 Mullis 最初使用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段,这虽然较传统的基因扩增具备许多突出的优点,但由于 Klenow 酶不耐热,在 DNA 模板进行热变性时,会导致此酶钝化,每加入一次酶只能完成一个扩增反应周期,给 PCR 技术操作程序添了不少困难。这使得 PCR 技术成了一种笨拙的中看不中用的实验室方法。

1988 年初,Keohanog 改用 T4 DNA 聚合酶进行 PCR,其扩增的 DNA 片段很均一,真实性也较高,只有所期望的一种 DNA 片段。但每循环一次,仍需加入新酶。

1988 年 Saiki 等从温泉中分离的一株水生嗜热杆菌(*Thermus aquaticus*)中提取到一种耐热 DNA 聚合酶。此酶耐高温,在热变性时不会被钝化,不必在每次扩增反应后再加新酶,从而极大地提高了 PCR 扩增的效率。为与大肠杆菌聚合酶 I Klenow 片段区别,将此酶命名为 *Taq* DNA 聚合酶(*Taq* DNA polymerase)。此酶的发现使 PCR 方法得到了广泛的应用,也使 PCR 成为遗传与分子分析的根本性基石。

在以后的 10 多年里,PCR 方法不断地被改进。例如,应用具有 3'-5'修复合性的热稳定 DNA 聚合酶代替不具 3'-5'修复合性的 *Taq* DNA 聚合酶,减少了在扩增过程中产生的错误配对,大大提高了在复制过程中的真实性。后来发现了几种具有高保真性的 *Taq* DNA 聚合酶,在常规 PCR 成熟之后,又衍生出很多适用于其它目的的 PCR 方法。原来的 PCR 只能扩增两段已知序列之间的 DNA,现在可以扩增到已知序列两侧的未知序列(染色体步移法)<sup>[1]</sup>,甚至可以扩增到序列未知的新基因<sup>[2]</sup>。PCR 的模板也从原来要用的 DNA 发展到直接用 RNA 作为模板,即反转录 PCR,这就使得从真核生物中扩增目的基因变得很容易。PCR 原本是一种定性的方法,只能回答样品中有无目的基因存在,现在已经可以用来定量<sup>[3]</sup>,即回答样品中原始模板的确切数目,这就是所谓的实时定量 PCR。基于完整的基因组 DNA PCR 扩增的片段也从原先只能扩增几个 kb 的基因到目前已能扩增长达几十个 kb 的 DNA 片段<sup>[4]</sup>。PCR 也从单纯用来扩增基因到能将两个