



生物实验室系列

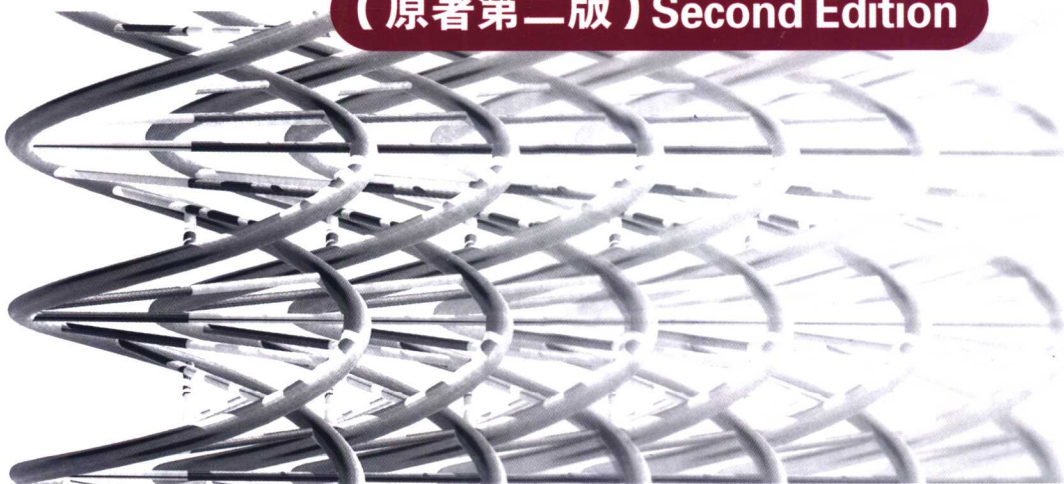
# PCR技术实验指南

## PCR Primer: A Laboratory Manual

[美] C. W. 迪芬巴赫 (Carl W. Dieffenbach) 编  
G. S. 德弗克斯勒 (Gabriela S. Dveksler)

种 康 瞿礼嘉 主译

(原著第二版) Second Edition



Chemical Industry Press



化学工业出版社  
现代生物技术与医药科技出版中心

生物实验室系列

# PCR 技术实验指南

PCR Primer: A Laboratory Manual

(原著第二版)

[美] C. W. 迪芬巴赫 G. S. 德弗克斯勒 编  
种 康 瞿礼嘉 主译



化学工业出版社  
现代生物技术与医药科技出版中心

· 北京 ·

## 图书在版编目 (CIP) 数据

PCR 技术实验指南/[美] 迪芬巴赫 (Dieffenbach, C. W.), [美] 德弗克斯勒 (Dveksler, G. S.) 编; 种康, 瞿礼嘉主译. —北京: 化学工业出版社, 2005. 12 (生物实验室系列)

书名原文: PCR Primer: A Laboratory Manual

ISBN 7-5025-8090-5

I. P… II. ①迪…②德…③种…④瞿… III. 聚合酶-高聚物反应: 链式反应-实验-指南 IV. Q555-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 152841 号

PCR Primer: A Laboratory Manual, Second Edition/by Carl W. Dieffenbach Gabriela S. Dveksler.

ISBN 0-87969-654-0

Copyright © 2003 by Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, All rights reserved. Authorized translation from the English language edition published by Cold Spring Harbor Laboratory Press.

本书中文简体字版由 Cold Spring Harbor Laboratory 出版公司授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2004-1436

生物实验室系列

### PCR 技术实验指南

(原著第二版)

[美] C. W. 迪芬巴赫 G. S. 德弗克斯勒 编

种康 瞿礼嘉 主译

责任编辑: 周旭 郎红旗 傅四周

文字编辑: 周侗

责任校对: 洪雅姝

封面设计: 关飞

\*

化学工业出版社 出版发行  
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

购书咨询: (010)64982530

(010)64918013

购书传真: (010)64982630

<http://www.cip.com.cn>

\*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市东柳装订厂装订

开本 787mm×1092mm 1/16 印张 27 $\frac{1}{4}$  字数 669 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-8090-5

定 价: 75.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换

扩增曲线

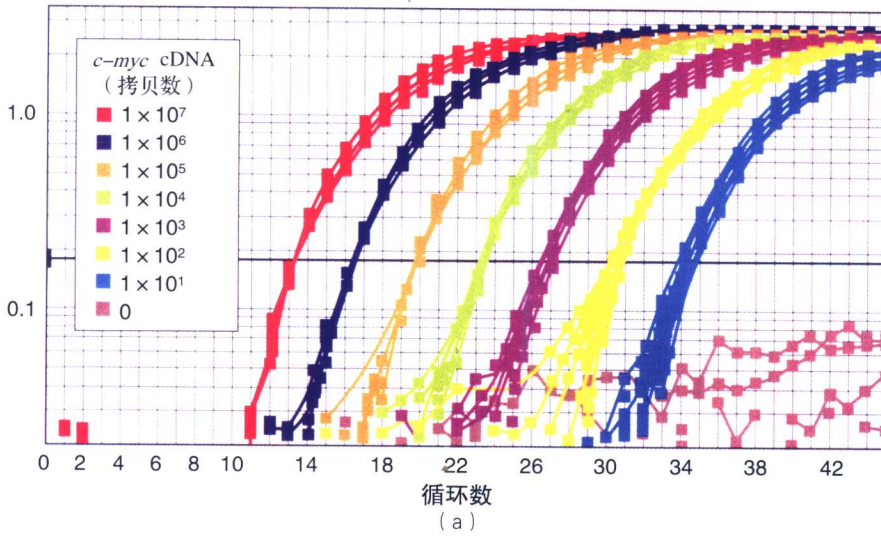


图 15-2 (文见第163页)

实时PCR。先用基因的特异引物以 cDNA 第一链 PCR 扩增基因。用 TOPO-TA 克隆 kit (Invitrogen) 联到 pCR4-TOPO 载体上, 进而获得质粒。用 OD<sub>260</sub> 吸收值对质粒的拷贝数进行定量。转换时, 以  $9.1 \times 10^{11}$  拷贝为  $1 \mu\text{g}$ , 质粒大小(正向插入)以千碱基对进行区分

(a) 用  $200 \text{ nmol/L}$  FAM 标记的 LUX 引物、 $200 \text{ nmol/L}$  未标记的引物对  $10 \sim 10^7$  拷贝的 *c-myc* cDNA 进行实时 PCR, 使用 Platinum 定量 PCR SuperMix-UDG, ROX 染料。反应产物 (每个稀释进行 12 次扩增)  $50^\circ\text{C}$  孵育 2min,  $95^\circ\text{C}$  保持 2min;  $95^\circ\text{C}$  保持 15s,  $60^\circ\text{C}$  保持 30s, 在 ABI Prism 7700 进行 45 个循环 PCR

扩增曲线

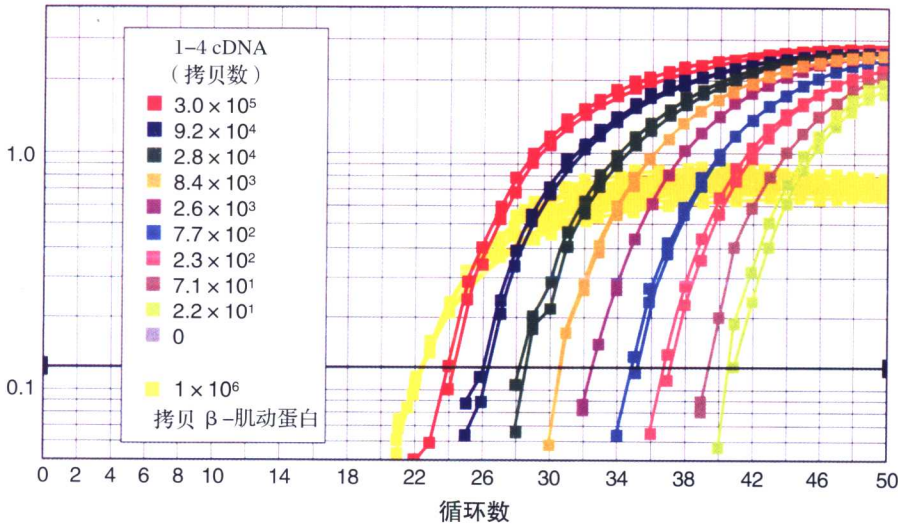


图 15-3 (文见第164页)

多元实时PCR。质粒的制备和定量参照图 15-2 描述的方法进行。  $50 \mu\text{l}$  反应体系, 使用 Platinum 定量 PCR SuperMix-UDG, 系列稀释的人 1L-4 cDNA 和  $1 \times 10^6$  拷贝的  $\beta$ -肌动蛋白 cDNA 为模板。用  $200 \text{ nmol/L}$  FAM 标记的 LUX 引物、 $200 \text{ nmol/L}$  未标记的引物扩增 1L-4 cDNA; 用  $200 \text{ nmol/L}$  JOE 标记的 LUX 引物、 $200 \text{ nmol/L}$  未标记的引物扩增  $\beta$ -肌动蛋白 cDNA。ROX 染料  $50^\circ\text{C}$  孵育 2min,  $95^\circ\text{C}$  保持 2min;  $95^\circ\text{C}$  保持 15s,  $55^\circ\text{C}$  保持 30s,  $72^\circ\text{C}$  保持 30s, 在 ABI Prism 7700 进行 50 个循环 PCR

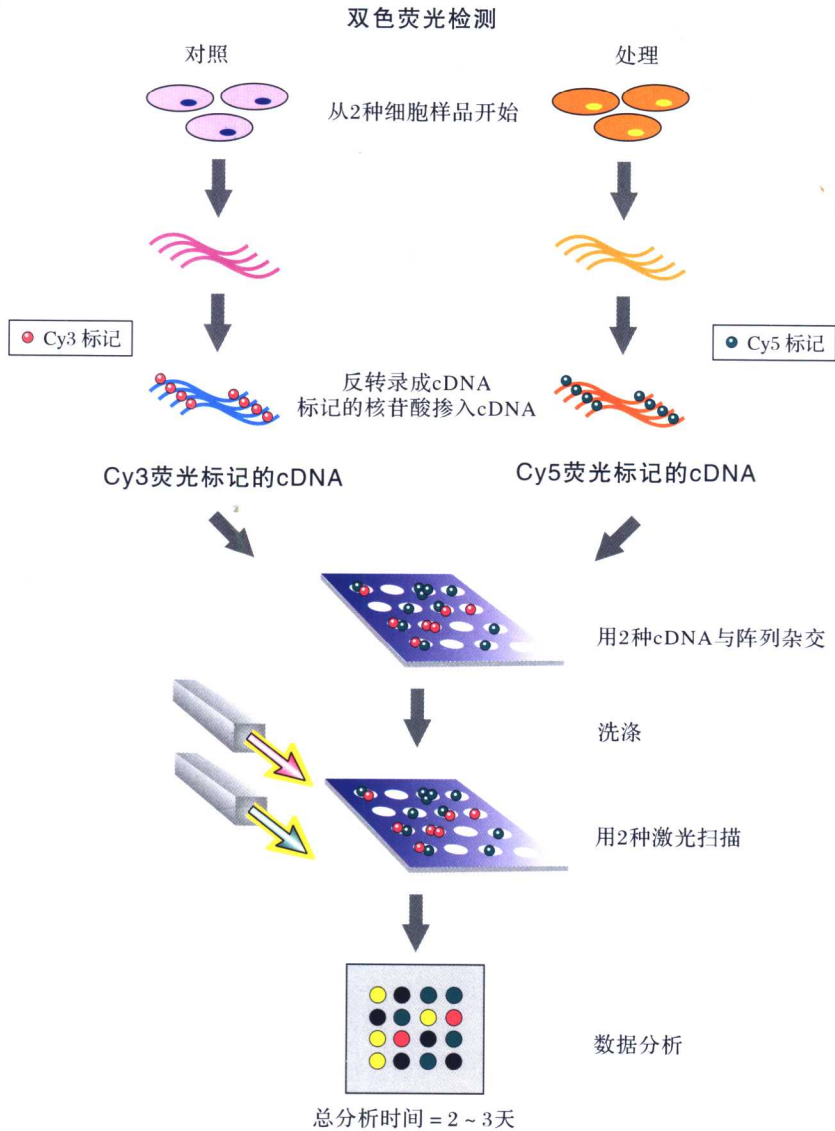


图 21-1 (文见第234页)  
使用微阵列的双色荧光检测方法检测基因表达过程的原理

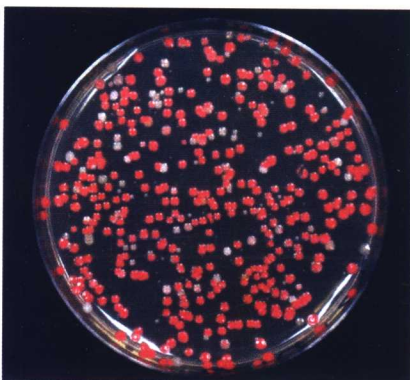


图 29-4 (文见第371页)

把图 29-3 中已克隆好 *Ds-red* 基因的大肠杆菌转化子涂板 (尽管转化子不是由相同的克隆实验获得的)。这个平板展示了这个方法现存的一个问题: 大约10%的克隆不能够正确表达 *Ds-red* 开放阅读框 (ORF)。这种情况也在其他目标片段 ORF 中发生, 比如 *lacZ* 和 *Taq* DNA 聚合酶的核糖克隆 (没有给出数据)。克隆出错的性质和原因还不清楚



---

谨以本书献给

Sara,  
Rebecca,  
Ethan,  
Ari

---

# 主 译

种 康      瞿礼嘉

## 参加翻译和校阅人员

(以姓氏汉语拼音排序)

|     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|
| 曹光宇 | 邓祝云 | 高兆锋 | 郝友爱 | 蒋甲福 |
| 李 丹 | 李继刚 | 李俊华 | 李林川 | 李 唐 |
| 刘敬婧 | 刘开茂 | 陶佳乙 | 王 雷 | 王 丽 |
| 王 台 | 王 哲 | 王 珍 | 邢立静 | 徐云远 |
| 张亮然 |     |     |     |     |

## 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，理论指导和促进了实验技术”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，化工出版社组织出版了“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  
现代生物技术与医药科技出版中心

# 译者的话

由美国冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press) 出版、C. W. 迪芬巴赫和 G. S. 德弗克斯勒编的《PCR 技术实验指南》(PCR Primer: A Laboratory Manual) 是《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual) 的姊妹篇。作为一本有关 PCR 技术和应用的全面而实用的参考书, 这本实验指南自 1995 年第一版出版以来就受到分子生物学等相关领域的科学家和其他科研人员的热烈欢迎, 成为 PCR 技术的原理和应用方面的权威著作, 也被广大分子生物学实验室列为实验室必备参考书。随着近几年与 PCR 技术相关的应用领域的迅速发展, 这本参考书的第二版于 2003 年问世了。第二版在第一版的基础上对内容进行了全面的更新和升级, 除了提供 PCR 技术的实验原理和详尽的操作程序以外, 还对每个操作配有疑难解析和相应的参考文献, 这也成了该版本的一个重要特点。今天, 这本著名实验指南第二版的中文版正式出版了, 作为这项翻译工作的参与人员, 我们心里感到由衷的高兴。

本书的出版是集体努力与合作的结果, 中国科学院和北京大学的科研人员和部分研究生参加了翻译和校阅工作, 他们分别是: 第 1 章 (刘开茂), 第 2、3、4、5、6 章 (邢立静和王丽), 第 7、8 章 (邢立静和李俊华), 第 9 章 (李俊华和王珍), 第 10 章 (李俊华和蒋甲福), 第 11 章 (王雷), 第 12 章 (王雷和王珍), 第 13 章 (李丹和王丽), 第 14 章 (李丹和李俊华), 第 15、16 章 (蒋甲福), 第 17 章 (张亮然), 第 18 章 (邓祝云), 第 19 章 (陶佳乙), 第 20 章 (李唐), 第 21、22、23 章 (曹光宇和高兆锋), 第 24、25、26 章 (郝友爱和高兆锋), 第 27、28、29 章 (刘敬婧、李林川和李继刚), 第 30、31、32、33 章和附录 (王哲和李继刚)。中国科学院植物研究所王台研究员校阅了第 1、17、18、19、20 章, 徐云远研究员校阅了第 2、3、5、10、11、15、16 章, 徐云远和王台还在统稿和协调中做了大量工作; 中国科学院植物研究所种康研究员校阅了第 4、6、7、8、9、12、13、14 章并负责前 20 章的统稿工作; 北京大学生命科学学院的瞿礼嘉教授对 21 章至 33 章进行了校阅和统稿。在此我们对所有付出辛勤劳动和汗水的人员谨致衷心的感谢! 我们也非常感谢化学工业出版社为本书的出版付出的努力。

由于时间短促, 加上 PCR 新技术发展迅速, 在新名词翻译等方面难免有不妥之处, 敬请读者指正。我们期望《PCR 技术实验指南》中文版的推出能够为我国分子生物学研究的发展贡献一点力量。

种康 瞿礼嘉

2006 年 2 月 12 日于北京

# 前 言

聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是应用最广泛的分子生物学技术之一, PCR 仪已经成为分子生物学实验室的常用设备。该技术在传统的基因克隆实验中发挥着重要作用, 同时它也解决了过去在某些条件下因无法获得足够量核酸所遇到的实验技术难题。基于基因组序列信息合成所需要的引物, 我们利用 PCR 技术可以解决分子生物学中的几乎每个问题。《PCR 技术实验指南》第一版出版之后, PCR 技术与方法学有了新的进展。第二版整合了这些进展, 并对第一版相应内容进行了更新。

我们衷心感谢为本书提供手稿以及对编辑工作付出劳动的各位先生。我们感谢冷泉港实验室出版社的所有同仁, 他们的杰出工作使本书得以顺利出版。Inez Sialiano 为本书的编辑制定了详细的计划并进行了有效的协调, Patricia Barker 对出版工作给予了大力支持。如第一版一样, 若没有 Judy Cuddihy 的帮助与指导, 本书就不可能顺利出版。本书的价值只能通过各位的使用才能体现出来, 希望对科学发展有所贡献。

C. W. 迪芬巴赫

G. S. 德弗克斯勒

# 目 录

|     |                                                                                          |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | <b>第 1 篇 PCR 导论</b>                                                                      |
| 4   | 1 建立一个 PCR 实验室                                                                           |
| 12  | 2 PCR 残留污染的处理: 一种酶学策略                                                                    |
| 17  | 3 高保真 PCR 酶                                                                              |
| 29  | 4 PCR 的最优化和常见问题解析                                                                        |
| 35  | 5 富含 GC 片段的 PCR 扩增                                                                       |
| 43  | 6 精确扩增大片段的技术                                                                             |
| 49  | 7 PCR 引物设计                                                                               |
| 60  | 8 PCR 扩增 DNA 的非放射性循环测序                                                                   |
| 67  | <b>第 2 篇 样品的制备</b>                                                                       |
| 70  | 9 DNA 的纯化                                                                                |
| 93  | 10 RNA 的纯化                                                                               |
| 107 | 11 激光捕获微分离技术原位定位基因表达                                                                     |
| 119 | 12 克服 PCR 受抑制的策略                                                                         |
| 131 | <b>第 3 篇 RT-PCR 方法</b>                                                                   |
| 133 | 13 相对定量 RT-PCR 和竞争定量 RT-PCR 内对照的使用                                                       |
| 150 | 14 四种实时 PCR 检测系统的比较: Bio-Rad I-Cycler、ABI 7700、Roche LightCycler、the Cepheid Smartcycler |
| 159 | 15 定量 PCR 的新技术                                                                           |
| 167 | 16 RNA 的扩增: 用镁激活的热稳定 DNA 聚合酶进行高温反转录和 DNA 扩增                                              |
| 175 | <b>第 4 篇 PCR 产物的检测: 专门应用</b>                                                             |
| 177 | 17 杂合性的丢失: 一种鉴定肿瘤基因组上染色体区段缺失的多重 PCR 方法                                                   |
| 189 | 18 单链构象多态性分析                                                                             |
| 201 | 19 逆转录酶原位 PCR                                                                            |
| 213 | 20 灵敏快速的突变检测方法——错配位点的固相化学切割法                                                             |
| 225 | <b>第 5 篇 用 PCR 分析基因的差异表达</b>                                                             |
| 227 | 21 PCR 在基于微阵列的基因表达分析中的应用                                                                 |

|     |                          |                                          |
|-----|--------------------------|------------------------------------------|
| 240 | 22                       | 利用抑制性消减杂交技术鉴定差异表达的基因                     |
| 266 | 23                       | 基因表达分析中的荧光 mRNA 差异显示技术                   |
| 285 | <b>第 6 篇 用 PCR 进行克隆</b>  |                                          |
| 287 | 24                       | 以 PCR 为基础的文库筛选方法                         |
| 293 | 25                       | 经典 RACE (cDNA 末端快速扩增) 法的改进               |
| 321 | 26                       | 用 PCR 合成和分析 DNA 文库                       |
| 333 | <b>第 7 篇 PCR 产物的克隆</b>   |                                          |
| 335 | 27                       | 克隆 PCR 产物的策略                             |
| 349 | 28                       | PCR 产物双向和定向克隆                            |
| 365 | 29                       | 核糖克隆: 用含有一个核糖核苷酸末端的 PCR 引物进行 DNA 克隆和基因构建 |
| 373 | <b>第 8 篇 利用 PCR 进行诱变</b> |                                          |
| 375 | 30                       | 诱变 PCR                                   |
| 381 | 31                       | 快速 PCR 定点突变                              |
| 388 | 32                       | 利用 PCR 来突变和合成新的重组基因                      |
| 395 | 33                       | 流线型基因装配 PCR                              |
| 402 | 附录 1 专利                  |                                          |
| 404 | 附录 2 在 PCR 中使用的寡核苷酸的修饰   |                                          |
| 407 | 附录 3 注意事项                |                                          |
| 416 | 附录 4 供应商                 |                                          |
| 417 | 索引                       |                                          |

# 第 1 篇 PCR 导论

PCR 是一种看起来简单的技术，其基本原理是以一段特定的核酸分子为模板通过引物延伸重复性地合成双链 DNA。这种简单的技术设计使 PCR 技术在生命科学以及相关的科学领域得到了广泛的应用，极大地推动了科学进步，并将发挥重要的作用。PCR 涉及如下几个关键过程：①靶 DNA 必须是单链，应有适当的能保证引物与靶 DNA 退火的条件；②随着引物延伸，将单链的靶 DNA 转变成双链；③双链 DNA 的再次变性，开始新一轮循环。

利用 PCR 仪可以编辑所需程序，可以完全自动化地进行 PCR 反应。DNA 变性温度通常是 92~96℃。变性所需时间依据靶 DNA 的复杂度、PCR 试管的几何特征、PCR 仪型号和反应体积。对于富含 GC 的 DNA 序列，可以按“富含 GC 片段的 PCR 扩增”一章所述，通过在反应液中增加甜菜碱提高 PCR 产物的产量。

变性后，寡核苷酸引物退火到与之互补的单链靶序列上。退火温度依赖于引物长度与碱基组成。“PCR 引物设计”一章描述了如何在最大限度内保证实验成功的引物的方法。由于在适宜的退火温度下，所有引物几乎同时与靶序列杂交，通过对退火温度的调整可以提高 PCR 的产量和特异性，具体操作请参考“PCR 的最优化和常见问题解析”一章。

最后一步是热稳定性聚合酶催化的寡核苷酸引物延伸反应。一般地，延伸温度是 72℃，反应时间取决于 PCR 产物的长度，可根据“精确扩增大片段的技巧”一章所提供原则考虑相应实验的延伸时间。

PCR 技术的优越性在于它能够特异性地检测微量的或在含有过量其他核酸混合物中的微量靶核酸序列。但是正是由于它的高效扩增能力，无论是初学者或是专家在应用 PCR 技术过程中不可避免地会遇到由其引发的诸多问题。

## 污染问题

在 PCR 实验中遇到的严重问题是已完成反应的扩增产物或者靶核酸对新进行反应的污染，这主要发生在扩增反应之前的几个步骤中。“PCR 残留污染的处理：一种酶学策略”和“建立一个 PCR 实验室”提供了减低污染的实验方案，而且后者还讨论了如何将这些方法整合成好的实验室设计和工作流程。

对于任何实验室而言，重新设计实验室是不现实的。但在实验室现有条件下，完全可以作一些基本的改进措施，以减少污染。这些措施包括：①将 PCR 试剂与 PCR 产物分开放置；②将 PCR 试剂与其他的分子生物学试剂分开放置；③提供 PCR 专用的仪器和试剂；④使用正、负对照。

防止污染的另一个重要措施是安全、合理使用 PCR 试剂。在 PCR 实验室，应该遵循如下原则确保 PCR 试剂的安全性。



① 配制的所有溶液应无核酸和 / 或核酸酶 (DNA 酶和 RNA 酶) 污染。

② 使用最高质量的水配制 PCR 实验的所有反应试剂。所用的水应是新蒸馏的、去离子水, 并经  $0.22\mu\text{m}$  滤膜过滤和高温灭菌。USP 认证的水已经过滤和高温灭菌, 可满足 PCR 实验的要求。水应分装成不同的小份储存, 每份仅用于一批实验。

③ 对于在室温下保存的试剂, 应加入 0.025% 的叠氮钠。这不会影响扩增反应。

④ 为了保证实验结果的一致性和可重复性, 所有的试剂应该按较大的体积配制, 然后对试剂进行测试。如果能获得理想的 PCR 结果, 应将试剂分装成小包装储存, 每个包装仅用于单次实验, 避免重复使用。

⑤ 应使用一次性的无菌试剂瓶和试管准备样品或配制试剂。

⑥ 分析新的、重要的样品前, 要检测所有新配制的试剂。

⑦ 细心地保存取样器, 避免污染。一种可推荐的保存方法是使用 Ziploc 袋子。

⑧ 在制备样品、配制试剂以及配制 PCR 反应液时, 必须戴手套。应使用与前者不同的实验室空间分析 PCR 扩增产物。

⑨ 在 PCR 工作区和 PCR 产物分析区使用防尘罩也是防止污染的措施之一。应保持样品制备、PCR 反应液配制与 PCR 产物分析三个工作区的独立性, 以保证实验的顺利进行。

## 标准 PCR

在 PCR 技术不断完善的情况下, 什么条件下的 PCR 被视为标准 PCR? 利用 PCR 对一个模板进行扩增需要 2 个寡核苷酸引物、4 种脱氧核苷酸三磷酸 (dNTP)、物质的量过量的  $\text{Mg}^{2+}$  和催化 DNA 合成的热稳定性 DNA 聚合酶。待扩增的目的片段的大小 (区域) 应该在 150~400nt 之间。寡核苷酸引物、dNTP 和  $\text{Mg}^{2+}$  的用量以及反应体积的大小随特定的实验而变化。

使用 Taq DNA 聚合酶的标准 PCR 实验应包含如下组分。

10×酶特异性的缓冲液:

10~50mmol/L Tris-HCl, pH7.5~9.0

6~50mmol/L KCl 或  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

1.5~5.0mmol/L  $\text{MgCl}_2$  或  $\text{MgSO}_4$

dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 各 0.2mmol/L

0.1~1.0 $\mu\text{mol/L}$  每种寡核苷酸引物

2.0~2.5U 的热稳定 DNA 聚合酶

核酸模板,  $10^2\sim10^5$  拷贝

加无菌的双蒸水至 50 $\mu\text{l}$

## 试剂和程序的选择

根据实际运用, Taq 聚合酶或许不是最好的选择。在“高保真 PCR 酶”和“精确扩增大片段的技巧”两章中, 给出了利用其他来源的酶或者酶混合物获得没有突变的扩增产物的实验实例。利用 Barnes 在“精确扩增大片段的技巧”一章中提出的方法可以容易地扩增出 300nt 到数千个核苷酸长的目标序列。

对于 PCR 中的每一步反应, 需要确定适当的条件使之能选择性地扩增靶序列。每步反应所使用的温度和引物延伸的时间取决于靶序列的碱基组成、扩增子长度以及引物的退火温

度。“PCR的最优化和常见问题解析”一章详细讨论了建立这些条件的方法。

另一种有用的优化 PCR 条件的方法是热启动。热启动 PCR 被定义为一种可以防止非特异性退火位点结合引物延伸的方法。虽然通过细心地设计引物和严格选择正确的退火温度,在多数情况下可以避免错配,但在 PCR 反应的任何环节中避免使用低于退火温度的温度是非常必要的。利用热启动方法可以有效地避免错配。已有许多用于热启动 PCR 的方法,包括使用尿嘧啶-N-糖基化酶和 dUTP、蜡屏障、被镁浸泡的蜡颗粒、抗 *Taq* DNA 聚合酶的单克隆抗体或者使用与热不稳定抑制剂混合的酶。使用这些方法,当第一次加热到 92℃ 后,混合所有的反应试剂, DNA 将从精确杂交的引物开始合成。热启动方法将在“PCR 残留污染的处理:一种酶学策略”、“高保真 PCR 酶”、“PCR 的最优化和常见问题解析”和“RNA 的扩增:用镁激活的热稳定 DNA 聚合酶进行高温反转录和 DNA 扩增”等章节中讨论。PCR 条件优化实验必须考虑的另一个重要问题是靶 DNA 的 GC 含量,因为 PCR 反应依赖于每个循环中靶 DNA 的完全变性。“富含 GC 片段的 PCR 扩增”一章讨论了成功扩增这些特定的 DNA 片段需要使用的一些特殊的实验方法。

此外,即使有了合适的酶和缓冲液,如果没有质量好的模板和 PCR 引物, PCR 同样不能成功。核酸纯化是分子生物学研究领域中一个非常重要的课题,已有一些专著关注此课题,在此不作讨论。有关引物设计的技术问题包括用于实时 PCR 的 *TaqMan* 和 *Scorpion* 探针的构建等,参阅“PCR 引物设计”一章。

## 对照

即使使用最好的试剂、引物和相应的物品,设置检测 PCR 运行状态和是否存在 DNA 污染的对照是非常必要的。作为一个基本规则,应该设置一组对照,包括负对照、弱的和强的正对照,以检测样品和 PCR 反应液是否有污染以及 PCR 的效率。负对照应该与样品同时进行电泳分析,以检测样品间是否有交叉污染或样品是否受 PCR 产物污染。除模板 DNA 外,负对照应包含所有的反应试剂。

正对照中靶 DNA 的用量应该最小化,其原因有二。首先,当检测高效的扩增效果时,使用  $10 \sim 10^4$  拷贝的靶序列完全可以作为一个有效的对照。其次,使用尽可能低量的靶 DNA 可以降低正对照造成污染的概率。此外,在配制 PCR 反应混合物时,通常在最后向阳性对照的试管中加模板。

## 基于 PCR 的序列分析

PCR 技术极大地推动了 DNA 序列分析工作。无论 DNA 模板是否被克隆, PCR 能够选择性地扩增并在无同位素的情况下测定微量 DNA 模板的序列。基于 PCR 的序列分析技术在人类基因组项目中发挥了重要作用,相应的方法在“PCR 扩增 DNA 的非放射性循环测序”一章进行了详细的描述。

本书所讨论的内容为开展 PCR 工作奠定了基础。相信在实验室的工作实践中,如果能细心设置预防污染的对照实验, PCR 技术将会成为各个实验室不可缺少的有用技术。

# 1 建立一个 PCR 实验室

Theodore E. Mifflin

Department of Pathology, University of Virginia, Charlottesville, Virginia 22908

作为分子细胞生物学实验室的一个基本构成, PCR 自 1985 年出现后得到了非常迅速的发展。至今, 应用该技术发表的论文已超过 15500 篇, 有关 PCR 信息的国际互联网地址见表 1-1。随着 PCR 被越来越广泛地使用, 科学家们对其有了更多的了解, 包括它的优点与不足。在较短的时间内, PCR 证明了它具备的扩增非常微量核酸模板(如单拷贝)和扩增不同的核酸(如 DNA 和 RNA)的卓越能力。同时由于这个生化反应固有的缺陷, 即对污染高度敏感, 早期工作实践已经显示操作者使用 PCR 必须加倍细心(Lo et al. 1988; Kwok and Higuch 1989)。本章讨论了如何建立一个可以获得可信的、无污染的 PCR 结果的 PCR 实验室。

表 1-1 有关 PCR 信息的国际互联网地址

| 站 点(URL)                                                                                                                              | 内 容                    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------|
| 1 <a href="http://highveld.com/pcr.html">http://highveld.com/pcr.html</a>                                                             | PCR 宣传网站(网络入口)         |
| 2 <a href="http://www.dnalc.org/resources/BiologyAnimationLibrary.htm">http://www.dnalc.org/resources/BiologyAnimationLibrary.htm</a> | 可下载 PCR 动画录像(PC 或 MAC) |
| 3 <a href="http://ncbi.nlm.nih.gov">http://ncbi.nlm.nih.gov</a>                                                                       | GenBank 网址, 可验证引物序列    |
| 4 <a href="http://www.mbpinc.com">http://www.mbpinc.com</a> (then select "Tech Reports" for monograph)                                | PCR 污染专论               |
| 5 <a href="http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html">http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html</a>             | 多重 PCR 向导              |

## 1.1 污染问题

对于司法鉴定和感染源检测的实验室而言, PCR 污染一直是一个令人苦恼的问题(Pellett et al. 1999; Scherczinger et al. 1999)。实际上, 一系列的方法可以控制污染。一个实验室控制污染的严格程度随所要解决的问题而定。

### 1.1.1 扩增子浮质

PCR 产物污染的重要污染源是扩增子形成的浮质(微小的雾化状物质), 其主要发生在 PCR 产物的分析阶段。从设计上对实验室改造, 利用特殊的移液器以及借助不同的化学和酶学方法, 都可以有效地消除浮质。具体措施的选择常常取决于目标扩增子的扩增频率以及 PCR 扩增的扩增子的相对量与浓度。

### 1.1.2 靶模板污染物

除了 PCR 产物分析过程所造成的污染外, 靶模板本身也可能是一个污染源。例如, DNA 模板由于比 RNA 稳定, 更可能成为潜在的污染源。因实验目的不同, 通常控制污染的标准也不同。检测感染源的实验就要求严格地控制污染, 而其他靶分子, 如遗传疾病的检