



全国高技术重点图书·生物技术领域

PCR

聚合酶

.....

链式反应

.....

[美] K·B 穆里斯 F·费里 等著
R·吉布斯

科学出版社

内 容 简 介

这是第一本有关聚合酶链式反应 (PCR) 的广谱实用手册。著者之一 K.B.Mullis 是 PCR 的发明人, 1993 年度诺贝尔化学奖得主。本书提供了目前世界先进实验室有关 PCR 的最新研究报告、各种新技术及其最新的应用方法。全书共 35 章。读者可从中了解到如何将 PCR 用于临床诊断、肿瘤研究、遗传学、法医学、植物分子生物学、DNA 测序、基因治疗等方面。即使在 PCR 方面有丰富经验的研究人员在阅读本书的有关章节后也会有所收获, 有助于优化他们的实验结果。此外, 有些专门的章节还涉及定量 PCR、非同位素检测、遗传分析和 PCR 的国际贸易等方面的新进展。

Kary B. Mullis François Ferré Richard A. Gibbs
THE POLYMERASE CHAIN REACTION
Birkhäuser Boston, 1994

图书在版编目 (CIP) 数据

聚合酶链式反应 / (美) 穆里斯 (K.B.Mullis) 等著;
陈受宜等译. - 北京: 科学出版社, 1997
书名原文: The Polymerase Chain Reaction
ISBN 7-03-006056-3

I. 聚… II. ①穆…②陈… III. 聚合酶-链式反应 IV.
Q555

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 07157 号

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

中国科学院印刷厂印刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

*

1997 年 9 月第 一 版	开本: 787×1092 1/16
1997 年 9 月第一次印刷	印张: 27 3/4
印数: 1—1150	字数: 637 000

定价: 68.00 元

序

James D. Watson

1953年3月底,当 Francis Crick 和我在 *Nature* 上发表第一篇关于 DNA 分子双螺旋结构的文章时, Francis 本想包括一段很长的关于 DNA 分子遗传含义的阐述。该分子的结构是我们从很少量的实验数据出发根据物理原理的理论论据推导出来的;那时我们还未能从 King 学院获得详细的证据,因此我认为这可能是冒险。然而我俩折衷了一下,决定包括一句针对该分子关键特征——碱基配对原则的生物学意义的说明, Francis 写道:“我们不能不指出,由我们设想的配对原则直接预示着遗传物质可能的复制机制。”

5月份,当我们在 *Nature* 上发表第二篇文章时,我更自信了,设想的结构至少在实质上是正确的。所以这第二篇文章就包括了 DNA 分子通过模板进行自我复制的讨论。我们指出由于碱基配对使得 DNA 分子有互补的双链。每一条链能作为“一个模板复制产生与其自身互补的链,最终在原来只有一对链的地方获得了两对链,而且碱基对的序列被精确地复制”。DNA 的复制过程使 DNA 链的数量加倍,并且精确复制了 DNA 的序列。当时,我们当然无法提供这一复制过程的生化证据。我们意识到双链必须解旋,但这很难在不搅乱双链本身的前提下实现,不过我们对这一结构的信念使我们有理由相信进化已解决了这一问题。另一个问题是复制是否需要酶参与,当核苷酸在原来的链中找到与其互补的核苷酸时,它就结合上去了,可能模板链本身起到酶的作用。

随后几年中,证实我们理论正确的实验不断充实,于是我们决定在 1956 年召开一个题为“遗传的化学基础”的研讨会。在会上,Max Delbruck 和 Gunther Stent 宣读了在理论上 DNA 解旋是可能的论文,直到 70 年代末解旋蛋白的分离成功才真正解决这一问题。1958 年 Mat Meselson 和 Frank Stahl 在 DNA 解旋和复制的理论基础上令人信服地说明了 DNA 的半保留复制。1956 年的大会上,Arthur Kornberg 首次报道了关于 DNA 复制生化过程的解析。尽管 DNA 聚合酶 I 后来被证实在大肠杆菌中并不负责 DNA 复制,但通过简化的离体系统实现对复杂过程的分析标志着 DNA 复制研究的转折点。

碱基配对除了在 DNA 复制中起重要作用外,也在实验技术中发挥重要的作用,因为碱基配对能使分离的 DNA 分子的链特异地相互作用。Julius Marmur 和 Paul Doty 在 50 年代末通过实验表明 DNA 可被变性,然后在冷的溶液中能缓慢地恢复双链分子的物理学和生物学特性,即复性。当从不同生物体来源的 DNA 链形成杂种 DNA 分子时,复性程度取决于生物体的亲缘程度。不久, Sol Spiegelman 和 Ben Hall 以及 Alex Rich 又分别证明 RNA 和 DNA 也可杂交。随着 70 年代初克隆技术的发展,杂交已成为检测目标序列的一个强有力的方法,特别是简便的 Southern 杂交技术的发展。80 年代,合成的与已知序列互补的寡核苷酸被用作探针,即所谓的位点特异寡核苷酸 (ASO),这充分体现了特异性配对的重要性。1983 年, Savio Woo 实验室报道了用分别与正常和突变的基因配对的不同的寡核苷酸诊断由 α -1 抗胰蛋白酶突变引起的气肿病病例。

到了 1986 年,我们已能用离体系统高效地合成 DNA,因为这时 DNA 和寡核苷酸

合成都已成为常规手段。我们还知道寡核苷酸可作为引物引导合成特征序列，然而只是在接到 Mike Botchan 的一个电话后，我才知道将这些不同的成分以一种简单的方式组合到一起后会有一个非同寻常的结果。1986 年初，是我酝酿当年的冷泉港实验室定量生物学研讨会——人类的分子生物学的最后阶段。这是第 51 次研讨会，它标志着第二个 50 年的开始，主题是我们感兴趣的在近几年来改变我们传统观点的新问题。Mike 告诉我 Kary Mullis 及其在 Cetus 的令人振奋的工作，我设法邀请 Mullis 在研讨会上作报告。虽然 1985 年 12 月 Kary 在 *Science* 上发表了一篇关于聚合酶链式反应的文章，但这是他第一次在会议上公开汇报这一工作。Kary 的陈述不出我所料，是令人激动的。虽然现在我还能回忆起来的主要是他的建议，即由于“G”和“C”的印刷体难以辨别，应当将“guanosine”改为“wuanosine”，这样“G”和“W”便易于区分。Kary 宣称这一建议还有别的好处，即产生 W-C 碱基配对。

到 1987 年，尽管只有少量应用 PCR 的文章发表，PCR 的应用前景却是明显的。我们决定在 Banbury 中心的会议上专门研讨这一神奇的新方法的应用问题。会议于 1988 年 12 月召开。会议表明 PCR 已与 DNA 克隆和 DNA 测序并驾齐驱成为分子生物学家不可缺少的工具。不仅如此，PCR 还提供了解决问题的新途径。例如，克隆嗅觉感受器基因是用与 G 蛋白偶联的 7 个跨膜受体片段的保守序列作为引物对感受器细胞进行 PCR 反应实现的。据估计，这些感受器基因组成了包括几百个成员的多基因家族。

受 PCR 影响最大的是人类遗传学。其中的一个受惠者就是人类基因组计划，它也致力于完成果蝇、线虫、小鼠、拟南芥等等的作图和测序。假若没有聚合酶链式反应的帮助，所要进行的工作会使我们难以胜任。设想一下如果没有直接测序的方法，不能运用微卫星重复序列作图，也没有顺序标签位点，工作的进展将该多缓慢！也许在基因组作图和测序最初的一次讨论会上同时提出 PCR 并非巧合，但作为一项新奇的技术，PCR 的冲击已远远超出实验室的范围。第一篇关于 PCR 的文章是关于镰刀型细胞贫血症的诊断，现在以 DNA 为依据的诊断的快速方法已得到进一步的发展，这是对检测突变的 PCR 方法的简便性和特异性进一步探讨的结果。简便性将保证诊断试验可用于群体检测，特异性将使在一个反应中同时运用几套引物检测多个突变成成为可能。

这一切的实现并不是没有困难。研究人员可自由使用 PCR，但进行诊断试验的公司却被不确定的使用权所限制，临床遗传学家则被昂贵的专利权税所困扰。我曾指出这一局面对于关心保健开支的议会和寻求改善保健福利的公众来说是不能接受的。一年前，Roche 公司开始严格执行热稳 *Taq* 酶的专利，使得科研人员不可能大量购用 *Taq* 酶。然而最近 Roche 公司决定对大的用户实行降价（对指定的基因组中心降价幅度更大），同时授权另外两个公司出售 *Taq* 酶，这是受人欢迎的举措。但是由于联邦基金的不不断削减，一个高度成功和迫切需要的人类基因组计划及其医学研究的应用有可能被拖延。

最后，我高兴地看到当我写这篇文章时，Kary Mullis 站到了斯德哥尔摩的领奖台上和发展定点突变的 Mike Smith 一起荣获 1993 年度诺贝尔化学奖。这说明 PCR 和定点突变及 DNA 测序技术已使科学家的工作产生了革命性的变化，同时也表明分子生物学的黄金年代远远没有过去。

（于才林译 朱立煌校）

前言

Kary Mullis

DNA 聚合酶链式反应 (PCR) 自纳入冷泉港第 51 次定量生物学讨论会 (Mullis 等, 1986) 以来, 已在医学和生物学中得到了广泛应用, 但是怨言也不绝于耳。首先, 有人认为, PCR 使 DNA 研究令人生厌, 以往研究方案都需要细致的推敲, 精巧的操作, 独到的洞察或幸运的机遇, 而现在不管何人, 只要有点试剂, 有一套循环加热装置即可一蹴而成。

地道的分子生物学家发出的第二个悲叹是如此简单的事居然从手中漏掉, 真是太遗憾了。对于前一种抱怨, 显然, 解决的办法是用 PCR 去做点儿以前几乎不可及而现在并非难以想像的事; 而对于第二种, 我们可以用老 Bob Dylan 的叠句来回答: “若果运气佳, 我能做到吗?”。第三种牢骚则出自医学诊断界, 是需稍加讨论的。

确实, PCR 使分子生物学方法实现了惊人的转变, 它已成为 DNA 实验室不可或缺的组成部分。即使有时仅为做一些小事, 我们仍愿意倚重于它。几年前恰逢 DNA 和蛋白质序列的资料爆炸似的涌现, 令为数有限的研究生穷于招架而埋头于计算技术之时, 电脑开始盛行世界并进入了生物学实验室, 被用以完成整理和分析这类新资料的任务。事情也真是太凑巧, 正当我们对地球生命大分子案卷中令人望而生畏的复杂信息加速攻关的时机已经成熟时, 在门多西诺角 (Mendocino) 128 公路附近的一棵七叶树旁, PCR 也应运而生了 (Mullis, 1990)。

Roger Penrose 在《皇帝的新见解》(Penrose, 1989) 中提示, 就某些发明而言, “从该发明体系的产出远胜于对它的投入”, 或者在“完美无缺的技术创新”中, “一些平淡无奇的想法却出乎人们的意料而成就大事, 这时将它们称之为发现比称为发明更恰当”。

PCR 又何尝不是游弋于发现与发明之间, 它的使用和变化形式难以捉摸, 就我所知, 它已家喻户晓。PCR 不仅是一个常用名词也是一个常用动词, 其使用和难以捉摸的变化多端, 我将其视为发现。我玩味着 Penrose 书中有关论述数学真理的思想: 有些事物介于能与不能发现之间, 另有一些则已瓜熟蒂落, 发现只是假以时日的事。

另一方面, 我不时读到这样的说法: PCR 引起了一场分子生物学的革命。具体说来, 分子生物学中的两种革命我是知道的, 一种革命说的是一帮子怒气填膺、全副武装的年轻的分子生物学家在 UCLA 冬季讨论会凛冽严肃的氛围下酝酿他们的计划, 上午报告会时在山坡上, 后来墙报会闭幕时在酒吧灰暗的角落密谋; 来春又在贝塞斯达 (Bethesda) 集会, 手里攥着步枪和毫无爱国心的丑恶幻灯片, 聚集在一起企图一劳永逸地摆平 NIH 博士后的薪金。

另一种革命, 说的是令人扫兴的资料再不屑隐藏, 或不能再用旧观点去解释, 而是来个战略转移或从头开始。论文和申请书都要加顿时髦的新玩艺儿, 重要岗位上往往有许多老权威没赶上新潮流就退休或死去, 比如像 Maddox, 和别人一样要衰老, 而 Dan,

则可能迟一些，事情均如此。

就 PCR 而言，哪一种革命都不曾发生过，新的玩艺儿和拨款？要刀弄棒？战略转移？我看都没有，不过像探索基因这样的平常事，办得快了些，轻松了些，可能的范围也拓宽了些。没人因接受 PCR 而弄得死去活来，它只不过是一种新工具，不过出自一个生物工程公司的有机化学实验室倒是有点耐人寻味，但也不令人惊奇。事物开始从企业向学术环境流动，整整一个世纪以来，化学一直在为生物学效劳。

PCR 所成就的简单小事被用于许多领域的研究工作当中，每个人都琢磨点窍门来用它解决自己的特定问题。纵然有什么滞碍，那也是 PCR 的不同寻常。作为一个发明者，我乐于因这诸多改头换面的运用而获殊荣，这似乎有些可笑。别人已做了太多太多的工作，现在很难想像有什么人，即使像本书作者这类勇夫，如 Francois，特别是 Richard 和我，能予以清晰地描述。已经有太多的文章摆在那里，特别是偏于技术性的文章连篇累牍、层出不穷，尽毕生时间也别想能读得过来，唯愿本书在这方面能为读者减轻一些负担。

我们试图物色到一些博览群书、精于此道又能传经送宝的佼佼者作为本书的作者，至少他们对所撰写的章节是有经验的，可以说我们如愿以偿了，颇感欣慰。

我们试图将本书编得更有条理些。因为聚合酶链式反应有两件事是泾渭分明的，它可从无到有地生成某一特定分子，也可以选择性地扩增 DNA 分子。第一个作用包括搜寻、剪贴和增补，在此方面，PCR 与文字处理颇为类似。

扩增作用则是另一码事，我们尝试过按这一条将本书分成几块，但是谈何容易！它们之间你中有我，我中又有你，几乎在每一应用中两者都不可或缺。这就是 PCR 的魔力所在。

因此，我们打算在一部分章节中专门讨论方法学，另一部分则集中在 PCR 应用的特定领域，而彼此又互有重叠。

专搞方法学的人较少与 DNA 打交道，但 Carl Wittwer 则是令人耳目一新的例外。颇让人纳闷的是他是犹他州（Utah）医学院病理系的，我本以为他是加州理工学院的，竟然错了。我若是读者，非读他那一章不可，抑或请内行人讲解讲解。Carl 以一种别人少有的方式来思考 PCR，他的思想明快清晰又很实际。我一直认为，用物理化学去阐释 PCR 会很有益，但很少有人成功过。

Gavin Dollinger 写了篇清雅文字，他说起码可举出三条理由要给一种商品贴上亚显微的标签。他没去勾起读者直接想起《走私纨绔》所描述的一个场面：Harrison Ford 在一个“复制物”的公寓发现了一种鱼秤的秘密：一个中国鱼贩子在收款机旁的柜台上有一种类似扫描电子显微镜（SEM）之类的玩意儿，“不，Dekker 先生，这不是鱼，这是爬行动物，人造的”。PCR 仪比 SEM 要便宜得多，标签也要小些。Gavin 这一章写得好，但没有引用这一关键文献，也未推敲这秤要是鉴定 DNA 需花多少时间。随着扫描探针显微镜的出现，这可就不再是一个戏剧性的情节了。

Craig Tuerk 写的是 SELEX 的事，在创制高亲和结合剂的最合理过程的竞赛中，他可能是赢家。在此领域中竞争纷纭，因为其性能不仅对诊断学而且对治疗学都是极重要的问题。Craig 着手解决的方法连进化理论学家也感兴趣。他操持着 Affymax、Selectide 等诸如此类，还试图在 λ 噬菌体表面上表达抗原决定簇。

编者认为, Svaute Pääbo 写的一章是上乘妙文。他已迁到慕尼黑, 他宁愿啃老骨头也不咬嫩骨头, 保持新潮、活跃的脑子, 经常在电视上露面。我们不知道他现在怎么样, 他曾信誓旦旦要与那位美丽的德国女郎结婚, 不知是否已成连理。

编者认为短小精悍奖应属于 Skip Garner。有好几个月我都耿耿于怀, 我们向他预约本书的一章, 同一时间预约的还有 Perucho、McClelland、Heller 和 Tullis, 还有 Francois, 他住在拉·约拉 (La Jolla), 是我的常客。Skip 迟迟不动手, 我不知道这当中是谁的错, Skip 是我认得的人当中最为洒脱的。刚工作时, 他想搞核聚变, 有人提示他, 他说没问题, 后来又有人问他干生物学如何, 还是一句话: 没问题。Skip 做事举重若轻。周末到乡下他可是个活宝。我打算拜读他那一章。

Manuel Perucho 是拉曼查 (La Mancha) 人, 也应得到奖励, 因为他列出的 200 多篇参考文献中署他名字的有两篇, 本书三个编者中至少有两位各引用一次以上。这是 Manuel, 而 Gibbs 呢? 他用 McClelland 的 Ap-PCR 方法对结肠和直肠肿瘤的样品不厌其烦地观察其实验结果, 而不管其结果是什么。该文确立了作者的学术根基, 尽管有人会认为他对习俗感觉迟钝, 他的文章值得一读, 甚至可介绍给朋友阅读。

一两年后, 我去路易斯安那 (Louisiana) 参加 Jeff Chamberlain 的婚礼, Jeff 当时在贝拉 (Baylor), 在 Tom Caskey 的系里。60 年代, Tom 和我, 还有他夫人, 在南卡罗利纳的哥伦比亚 (Columbia) 的同一所学校念高中。那时我还不认识 Tom, 我进 Dreher 高中时, 他刚好离开, 20 年后去冷泉港。我们相遇是 1986 年, 我一见面就喜欢他, 也许是他的嗓音, 不过也可能是他出类拔萃的品格。一两年后彼此才谈到自己的出身, 原来我俩的母亲是邻居。Tom 在他的文章中提到, 为了母亲的缘故, 他在得克萨斯 (Texas) 工作, 从未离开过。Terry Lewis 为此很赞赏, Hower Hughes 也是。Tom 的母亲担心他离家太远, 但是 Tom 认为, 凡有益于公众健康的事应快马加鞭地干, 应该在博士后期间干。听起来蛮可笑, 他工作的时间总比歇的时候多。现在, 他在休斯顿也是通宵达旦地干。

在 Tom 的实验室中, 我最喜欢 Jeff Chamberlain, 他的婚礼在查尔斯湖举行, 新人是个绝色佳人, 名字像是小男孩 Joel。她爹绝对是南部的一个出色的医生, 在查尔斯湖长沼上养马, 养孔雀。一个姑娘跟一个爱她父亲的人结成伉俪, 肯定会倍受呵护, 于是当岳父的常去找那个丈夫。若去掉这毛病, 当女婿的一定会受益匪浅。主持婚礼的天主教神父不明咎里, 像对着一般市井之辈, 大谈“此婚姻能否保得住”的信条, 弄得我大打瞌睡, 许多现代牧师都大受此惑, 引用家庭破裂的统计材料和事实真相。

话说回来, Jeff 看来干得蛮不错, 目前在密执安 (Michigan) 与 Joel 依然相敬如宾。本书中他写的那一章是关于用 PCR 同时作 9 种不同扩增得到令人满意的结果。但供货商可不满意, 他们的哲学是一个反应、一个试管、一次聚合酶; 然而对梦寐以求地在新生儿或胎儿中检测出不同基因的人以及 Jerry Lewis 就不同了, 当高兴地获知那些狂热的科学家已经找到一种在婴儿未出生之前即可查出 Dunchnne 肌营养不良症的方法时, 复式 PCR 简直就如一张王牌。Jeff 将在他那一章中娓娓道其端倪。

我们都祝愿他与 Joel 幸福美满。不止如此, 喜欢此书的我们都巴望着 Joel 和 Jeff 邀 Richard 和我去查尔斯湖一道度周末。事实上我与 Richard Gibbs 在参加一次更为热烈的婚宴后回家的路上, 在车子后座上, 说到他同意为 Birkhäuser 出版社编一本书时, 我想

他恭维了我，并叫我帮忙，我居然幼稚地答应了他。

把写书当儿戏是不可饶恕的，你会永远对未按时完成你负责的那部分，而完成时又因耽误了时间而感到内疚；可一旦感到从容不迫地做了一件好事时又喜形于色，良久沉醉于美好的感觉中。当你在自己的书架上看到这本书时，自然会翻开你那一章。

数月后回到了拉·约拉，有了 Richard 让我那样上当之后，一天晚上，我好意恭维 Francois Ferré 一番，说服他作为第三个编者。用出版商的行话，到此时，Richard、我和 Francois 都成了责任编辑。Francois 是名符其实的。另一方面 Gibbs 是从大洋洲来的，在那里的人对什么事情都不会很上心，尽管他做了承诺，但是离兑现的时间还很远哩，没关系。因为无济于事，烦恼常常涌上心头。

因为忙，对本书我没有尽责。

所以本书得以出版都仰仗 Francois，唯独他不应对错漏之处负责。Gibbs 和我都相信他已察觉。我曾见过他的父亲，他穿着漂亮的靴子，在普里莱尔斯 (Poitiers) 附近统领着一帮法兰西人酿制葡萄酒。那里还保留着 13 世纪城堡的颓垣，其家族在那里也有年头了。这汉子无论是从哪个世纪看似都是活在一个错误的世纪。不过人是可爱的，其子也如此。当你作为朋友要将他介绍给你的未婚妻或令堂时，Francois 是何感觉，难表其详。他不是不晓得需要变通，那是一种内向的性格，而 Francois 的热心肠则如同一个火炉，一个圣诞节连大狗都愿躺在上面的火炉。但他并不激昂，从最好处说，他是高尚的，请阅读他与他的免疫反应公司的同事们写的关于定量化的那章佳作，他那一章中可没有这些，他是个专家。

Michael McClelland 是位业余鸟类观赏家，他聪明地提出了 AP-PCR 技术，名字是他起的，即任意引物 PCR。在实验室里做出来容易，可说起来却难。Michael 却是个宁愿坐办公室而不在实验室的理论家，这与 Michael 风格很相称，并被其勇敢地升华了。这一技术吸引了许多实践者，并有一大堆新名称，其他命名的人得知 Michael 已给起了名后都自愿放弃了，这对第二、第三个命名者的名誉没有影响，虽然这似乎与这类技术未曾发现过两次这一合理推断的逻辑不相符合。不过提出第四、第五个名称则有些问题了。Michael 的实验室以外的 AP-PCR 走向绝对荒谬的 PCR (absolutely preposterous PCR)，因此人们可以认为它可能仅被发现一次。

Rich Tullis 酷似圣诞老人，其名字也很悦耳。他写的那一章很吸引人，若我没循错其思路，相信他的开头一段所说的“放射活性”也属于非放射活性检测，留心一下谁都看得出，他那引经据典的才能挥洒得淋漓尽致。

他教我滑雪，教我如何玩 Donkey Kong，那全是 1981 年在斯克华山谷 (Squaw Valley) 的一次 UCLA 讨论会上。我们两人去参加各种小组会议，去听 Michael Bishop、Harold Varmus 及其他癌症研究前沿的人发表的研究报告。当时，有一场大风雪，滑雪道就要关闭，一些人的生命面临雪崩的威胁，Jennifer Barnett 则顶着风雪在由伯克利 (Berkeley) 赶来的路上。只学过一个星期滑雪的我差点没成了地质探险家。那样该死的场面，Tullis 还在那儿乐，让他自炫博学去吧。

本书最后两章是关于非学术问题的，一章是 Ellen Daniel 的，一章是我的，前者从 Cetus 到 Roche 一直跟踪着 PCR 技术，而我是“先越狱逃跑再回来受审”。

这样就转到了前言一开始提到的第三种牢骚上来。在 1986 年到 1992 年间，那时

Cetus 公司感到对 PCR 广泛的实际应用有加以限制的必要, 就搞了个限制性商业政策, 医学诊断界牢骚满腹。Jim Watson 当时由于社会上议论纷纷而保持沉默, 国际声誉受到动摇而颇令人惋惜 (见序言), 在 UCLA 一次热衷基因研究的学者聚会上, 他私下里对我直言了对此事的看法, 我当时就很同意, 也很想直接引用他的原话, 但又限于读者的想像力, 在此只好把他的意思变成我的观点。这一切中肯之言都已成为历史, 因为 Cetus 已经从这一领域退出了。1991 年 7 月, Hoffmann-La Roche 买下了 Cetus 的 PCR 分部, 使人想起老 Whale 被 Chiron 兼并。Hoffmann-La Roche 将如何操纵 PCR 的经纪和商业开发尚需拭目以待。

认识到聚合酶链式反应在 DNA 诊断上使用的普遍适用性和它的及时应用所带来的世界范围的利益, 在制定一种开明的商业特许政策时, 应认识到对这一新技术不分青红皂白实行种种限制是有悖于长远目标的。

依我的观点, 在将 PCR 推向诊断市场时, 投资者从公司的总收入中提取适当的利润会是可接受的理想方案, Cetus 公司藉此合作达到持股人合作的目的。Cetus 公司对将 PCR 用于检测传染性疾病方面所采取的限制性政策直接招来的是诊断界的敌对情绪、Jim Watson 的劝戒及政府机构和私人公司为寻找 PCR 替代方法而白白支付的研究经费, 这些资金本应用以支持 PCR 实用化开发的, 而 Cetus 公司在这方面也会独占鳌头。可是事情的发展不无讽刺, Cetus 站到了相反的位置。

1989 年夏, 针对 Cetus 公司在 PCR 应用的问题上一方面对 Roche 作了全部承诺, 而另一方面在市场又持否定态度, Dupont 公司对 Cetus 公司的两个专利的有效性提出了挑战, 在北加州地区联邦法院的一项民事诉讼案中裁定原始专利 US 4, 868, 202 (Mullis, 1987), 专利与商标局对该专利附审也归了档, 这一切使 Cetus 公司付出了数百万美元的代价, 其经理、律师和科学家也纷纷分道扬镳。一经诉讼, 尘埃落定, 裁定 4, 868, 202 充分有效, 那场在联邦法院上发生的舌战的场面使得 PCR 的身价大大提高了, 因此 Cetus 公司能够为那几张专利的薄纸开出比以前任何一个美国专利都要高的价格。Hoffmann-La Roche 就付给 Cetus 公司 30 000 000 美元, 给 Cetus 帮了个忙, 本书最后一章就是这一审判的小结。

(陈受宜译 朱立煌校)

参 考 文 献

- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Snikl R, Horn G, Erlich H (1986): Specific amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 260.
- Mullis K (1987): US Patent 4, 683, 202 Process for amplifying nucleic acid sequences.
- Mullis K (1990): The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262: 56.
- Penrose R (1989): *The Emperor's New Mind: Concerning Computers, Minds, and the Laws of Physics*. Oxford: Oxford University Press.

目 录

序

前言

第一部分 方法学	(1)
第一篇 基础方法学	(3)
第 1 章 用 PCR 方法进行 DNA 操作	(3)
第 2 章 PCR 产物的克隆	(15)
第 3 章 多重 PCR 的优化设计	(37)
第 4 章 标本材料中核酸的制备	(45)
第 5 章 病毒 DNA 及病毒宿主细胞 mRNA 原位 PCR 扩增	(53)
第二篇 定量	(63)
第 6 章 定量 PCR: 概述	(63)
第 7 章 内对照 PCR 定量 DNA	(86)
第 8 章 PT-PCR 和 mRNA 定量	(93)
第 9 章 人类 T 细胞库的 PCR 分析	(104)
第三篇 非同位素检测	(115)
第 10 章 PCR 反应超灵敏的非放射性检测: 概论	(115)
第 11 章 PCR 分析的荧光检测	(126)
第 12 章 酶标记寡核苷酸	(133)
第 13 章 分子杂交保护试验法 (HPA) 在 PCR 扩增产物检测中的应用	(142)
第四篇 仪器	(153)
第 14 章 PCR 的仪器配置: 我们选择的立足点是什么?	(153)
第 15 章 快循环 DNA 扩增	(162)
第 16 章 PCR 反应的自动化	(169)
第五篇 测序	(185)
第 17 章 PCR 和 DNA 测序	(185)
第 18 章 以噬菌体启动子为基础的测序和筛选突变的方法	(198)
第 19 章 俘获 PCR: 一种进行染色体 DNA 和 cDNA 步查的有效方法	(207)
第二部分 应用	(215)
第一篇 一般应用	(217)
第 20 章 功能核酸的体外进化: HIV-1 <i>rev</i> 蛋白的高亲和力 RNA 配体	(217)
第 21 章 PCR 在法医学上的应用	(228)
第 22 章 通过 PCR 重建过去	(241)
第 23 章 非生物学方面的应用	(249)

第二篇 遗传分析	(258)
第 24 章 RT-PCR 与基因表达	(258)
第 25 章 AP-PCR 的指纹图谱：在遗传作图、群体生物学、流行病学 和 RNA 差异表达检测中的应用	(276)
第 26 章 遗传、植物与聚合酶链式反应 (PCR)	(285)
第三篇 治疗效果评估	(301)
第 27 章 费城染色体阳性白血病治疗效应的 PCR 评定	(301)
第 28 章 用直接针对 V(D)J 连接序列的克隆特异性探针检测急性淋巴 母细胞白血病中的轻微后遗症 (MRD)	(312)
第 29 章 疗效评估：传染病	(320)
第 30 章 基因治疗	(332)
第四篇 诊断	(342)
第 31 章 PCR 与癌症诊断：癌基因和抗癌基因中点突变的检测和鉴定	(342)
第 32 章 PCR 的临床应用	(369)
第 33 章 传染性疾病	(380)
第三部分 PCR 和商海	(393)
第 34 章 商海中的 PCR	(395)
第 35 章 PCR 与科学发明：DuPont 与 Cetus 对簿公堂	(400)
内容索引	(415)

第一部分 方法学

第一篇 基础方法学

第1章 用PCR方法进行DNA操作

Kenshi Hayashi

一、引言

聚合酶链式反应(PCR)的问世大大加快了各种生物基因组结构研究的进程。即使是高度复杂的基因组,如果已知其任一区域侧翼的核苷酸序列,即可应用此技术在数小时内完成对该区域序列的特异性扩增(Saiki等,1988)。实际上,应用PCR技术通过“拷贝和连接”可以对任何DNA进行操作,这是一种传统重组DNA技术的替代方式,传统重组DNA技术是应用限制性内切核酸酶和连接酶通过“切割和连接”对DNA进行操作(Frohman和Martin,1989)。因此,PCR方法克服了限制酶酶切位点有限这样一个难题。即使只有单个DNA分子,也可以进行PCR,结果使许多常规的分析分离技术的灵敏度比过去提高了许多倍。

本章对PCR的一些基本原理进行简明的综述,并对最近依据PCR原理所发展形成的一些技术予以详细的考察。

二、总的考虑

1. 引物设计的灵活性

PCR技术最广泛的应用是从高度复杂的模板(例如哺乳动物基因组DNA)中选择性地扩增特异序列,扩增的特异性依赖于引物序列的设计。最经常使用的引物含有20~24个核苷酸,因为这一长度足以在高度复杂的基因组,如人类基因组中,特异性选择单一位点。然而,较长的引物和较高的退火温度能增大PCR扩增的选择性。据估计含有40个核苷酸的寡核苷酸,其解链温度(T_m)要比具有相同碱基组成,含有20个核苷酸的寡核苷酸高15℃(Sambrook等,1989)。因此就引物的长度而言,可使用含有40~45个核苷酸的引物,将退火温度定为72℃,即TaqDNA聚合酶进行链延伸反应的最适温度,在通常使用的缓冲液条件下,PCR扩增的特异性将达到最高。

现在有商品化的或免费的计算机软件程序,可用来在确定的区域中选择引物序列。在对所研究基因组全部序列并不完全知道的情况下,这些程序既方便又实用,但是即使是最好的程序也并非完美无缺。

在引物-模板序列并不完全匹配时,扩增反应可起始于含有部分不配对碱基的位点,其产物的末端序列被引物序列取代了,这种引物设计的灵活性大大增加了PCR的

用途。

2. 扩增的忠实性

DNA 聚合酶会以低而限定的速率产生错误，该速率随酶、反应条件及序列不同而异 (Eckert 和 Kunkel, 1991)。例如，*Taq* DNA 聚合酶产生的错误主要是单碱基替换，在高 Mg^{2+} 和高核苷酸浓度的条件下，该速率高于 10^{-3} /核苷酸，而在另外一些条件下，该速率则低于 10^{-6} /核苷酸。一般认为具有校正活性的酶，如 *Vent* 聚合酶产生错误的频率要比 *Taq* DNA 聚合酶低得多 (Eckert 和 Kunkel, 1991)。

PCR 过程中，扩增产物作为后续循环反应的模板。因此，由 DNA 聚合酶产生复制错误而引起的序列的改变具有“遗传性”。由于不存在根据序列的功能含义对序列进行选择，这些序列中的变化因而得以积累，结果相当一部分扩增片段携带了“突变”。

假设 PCR 扩增出现的错误随机分布，而且突变的和正确的序列以等同的效率扩增，那么就可以精确地估算 PCR 扩增后所产生的正确序列片段的比例 (Krawczak 等, 1989; Hayashi, 1991)。如果扩增效率为 k ，那么每次循环结束时，旧链含量 (O ，表示循环开始时的含量) 和新链含量 (N ，表示循环过程中合成的量) 符合下列关系：

$$O = 1 / (k + 1)$$

$$N = k / (k + 1)$$

$$O < k < 1$$

经过一次循环，扩增产生正确序列片段的概率 (p) 决定于泊松分布的未击中事件的概率：

$$p = \exp(-mL)$$

此处 m 表示聚合酶单核苷酸的错误率， L 表示扩增片段的核苷酸数目。

只有新合成的链才会有新的突变。第一次循环结束时，正确序列链的比例 f 为

$$\begin{aligned} f &= O + pN \\ &= [1 + k \exp(-mL)] / (k + 1) \end{aligned}$$

因此， n 次循环后，正确序列链的比例 $F(n)$ ，可由下式估出

$$F(n) = f^n = [1 + k \exp(-mL)]^n / (k + 1)^n$$

如果扩增反应的起始 DNA 含量很低 (如少于 10^3 分子)，由于此情况下首次出现突变的时间能显著改变错误率，那么这样的估算可能就不合适。然而这一情况很少出现，因为 10^3 个分子相当于低于 3ng 的人类基因组 DNA 或低于 0.01pg 的 10kb 质粒 DNA。

表 1.1 表示经过 20 次和 30 次循环扩增后，由上面的方程估算出的正确序列链的比例。在该计算中，聚合酶的错误率分别假定为每核苷酸 10^{-4} 和 10^{-5} 。

PCR 过程中产生的错误均匀地分布于片段中，含有某一突变的序列均不可能形成较大的数目。在这种情况下，产物中含量最高的仍为起始序列片段，对混合产物直接进行序列测定是确定起始 DNA 片段序列的合适方法 (Pääbo 和 Wilson, 1988)。当 PCR 产物作为克隆底物时，情况就不同了。每个克隆来自 PCR 扩增产物的单一分子，因此它可能是扩增过程中出现错误的链的克隆。

虽然突变位点经常分布于整个扩增片段 (引物区域除外)，但是扩增片段中碱基替换的热点或冷点却显然决定于片段序列本身。这种现象的机制还不清楚 (Eckert 和

Kunkel, 1991)。

表 1.1 PCR 后正确序列片段的比例^a

kb	$m = 10^{-4}$		$m = 10^{-5}$	
	20 循环	30 循环	20 循环	30 循环
0.1	0.91	0.87	0.99	0.98
0.2	0.83	0.75	0.98	0.97
0.5	0.63	0.50	0.95	0.93
1.0	0.40	0.25	0.91	0.87
2.0	0.17	0.07	0.83	0.75
4.0	0.03	0.01	0.69	0.57

^a 根据文中方程进行计算，并假定扩增效率 (k) 为 0.9, m 为 DNA 聚合酶每核苷酸的错误率。

简单重复序列，例如同聚物分子和二核苷酸重复序列是 PCR 变异特别显著的位点，这些突变可能是由于聚合酶“打滑”所致。所有的聚合酶都存在这一问题，特别是在对基因组中的这些重复片段进行长度多态性分析时，这一问题更加突出。分析人类基因组图谱时，CA 重复经常用作 DNA 多态性标记，因为它们在基因组中含量十分丰富 (Stallings 等, 1991)，呈现高度多态性，而且容易进行 PCR 分析 (Weber 和 May, 1989)。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳，分离含有这种重复序列的 PCR 产物，就能观察到梯状电泳带，从而揭示这种打滑现象。在区分纯合子和杂合子以及仅差一个单一重复单位的等位基因时，打滑现象引起的问题非常麻烦。

三、序列操作

1.5' 末端标记的引物

在引物的 5' 端增加额外的核苷酸，通常并不影响引物-模板的退火过程。因此为了达到不同的目的，就可以将不同的序列添加到 PCR 引物上，这些序列包括为以后克隆而在 PCR 引物上添加的限制性酶切位点序列，第二次 PCR 扩增的引物序列以及 RNA 聚合酶体外转录 PCR 产物的启动子序列 (Higuchi, 1989)。使用末端重叠的引物，经第二次 PCR 扩增，两种或多种 PCR 产物可以按任何预想的顺序连接 (Higuchi 等, 1988)。PCR 的这种“拷贝和连接”能力使 DNA 序列嵌合体的构建发生了本质性变化，因为连接位点不再依赖于限制性酶切位点的存在。

2. 简并性引物

只有知道有限蛋白质的氨基酸顺序有关信息时，应用简并性引物通过 PCR 分离 cDNA 克隆是一种行之有效的方法 (Lee 等, 1988)。以 mRNA 混合物的逆转录产物为模板，通过翻译的逆过程由氨基酸顺序推知的核苷酸序列作引物，经 PCR 就可以扩增目标序列。由于遗传密码的简并性，不可能推知唯一的引物序列，只能应用与所有可能的密码子兼容的寡核苷酸混合物作引物。PCR 产物通常包括靶序列和另外的非特异产物。经过适当的富集过程，例如通过凝胶电泳进行长度选择，一些片段经亚克隆而获得。选用编码预期氨基酸顺序的适当片段的克隆作探针，就可以通过相应的杂交方法筛

选 cDNA 文库。

3. 反向 PCR, 载体盒 PCR

一般的 PCR 技术要求预先知道包含欲扩增目标区域的引物序列, 这就意味着扩增片段不可能延伸至已知序列的外侧, 然而目前已有一些方法可以扩增与已知序列相邻的未知序列, 一种策略是自身环化。通过这一过程, 已知的 (自身) 序列被带至相邻的未知序列的远端。用一对从已知区域双向延伸的引物, 夹在中间的未知序列就可以经 PCR 而扩增, 这一技术称为“反向 PCR” (Ochman 等, 1988; Triglia 等, 1988; Silver 和 Keerikatte, 1989)。另一种策略是通过双链寡核苷酸片段的连接 (Mueller 和 Wald, 1989) 或通过末端转移酶加尾 (Frohman 等, 1988; Loh 等, 1989; Ohara 等, 1989) 将标签序列连接至与已知序列相邻近的未知序列片段上, 位于已知序列和标签序列之间的未知序列通过 PCR 而得以扩增, 该反应为半特异性的。在有些情况下, 标签序列的部分区域为非同源性的, 以避免在两个标签序列间扩增 (载体盒 PCR) (Arnold 和 Hodgson, 1991)。这些程序被用来克隆 cDNA 5' 末端, 与逆转录病毒插入位点相邻的染色体区域 (Silver 和 Keerikatte, 1989) 以及获得酵母人工染色体插入片段的末端序列 (Ochman 等, 1989)。

4. 扩增所有序列的成对引物

通过 PCR, 与一对引物序列邻接的各种 DNA 片段都会被不加区别地扩增。如果对某一特殊序列施以选择压力而且重复进行 PCR, 就会在扩增产物中富集这一特殊序列。通过简单地重复扩增-选择循环, 可以分离被选择性扩增的序列。分析产物特性可确定选择压力所针对的序列。通过对几种与 DNA 结合的核蛋白识别序列的研究, 证实了这一策略的可行性 (Kinzler 和 Vogelstein, 1989; Blackwell 和 Weintraub, 1990; Bickmore 等, 1992)。在这些研究中, 用化学方法合成 DNA, 或者是通过将引物连接在基因组 DNA 片段末端, 再经 PCR 扩增其中间区域的序列具有广泛差异的 DNA 片段, 并用凝胶滞留进行选择。从随机序列混合物中通过选择-扩增循环可富集某些特殊序列, 对其效率的分析已经有人较全面地从数学角度进行过了 (Irvine 等, 1991, 也可以参见本书第 20 章)。

5. 定向突变

使用不匹配的引物, 可在扩增产物的引物区引入突变, 包括碱基替换、插入和缺失 (Higuchi, 1989)。使用足够长的引物, 可在一次扩增反应中, 在多个位点引入突变 (Clackson 等, 1991)。用于癌症治疗的人源化鼠单克隆抗体的构建 (Carter 等, 1992) 或者用于体外抗体筛选的重组抗体文库的构建 (Huse 等, 1989) 可以最好地证明通过 PCR 产生定向突变的能力。

6. 非定向突变

Taq DNA 聚合酶产生的错误主要是碱基置换, 而产生插入和缺失错误的机率是很小的 (Eckert 和 Kunkel, 1991)。如果 PCR 循环次数足够, 累积产生碱基替换的频率就