

PCR技术操作和 应用指南

PCR JISHU CAOZUO HE
YINGYONG ZHINAN

主编：林万明

副主编：杨瑞馥 黄尚志 秦鄂德



人民军医出版社

Q5-3
104

YH/20/30

PCR 技术操作和应用指南

主 编: 林万明

副主编: 杨瑞馥 黄尚志 秦鄂德

编写者(以章节先后为序)

林万明	杨瑞馥	吴加金	吴卫星	王惠圳	安 新
纪立农	谢 维	李银太	刘纯杰	陶炳根	李建标
舒 泉	祝道成	李 倩	耿黎明	封幼玲	刘明远
杨晓峰	王继德	蒋国桥	宋欣明	梅基铭	李 进
张薇芬	穆士杰	蔡 挺	张远富	李申龙	谷志远
秦鄂德	曹茂开	陈淑云	杜敏杰	夏晓滨	夏霞娟
金 灵	周先碗	吴 滔	蓝细萍	黄尚志	王 玫
许顺滨	云 升	金坤林	刘晓荣	辛德莉	张小为
成卓敏	何小源	陈剑波			



A0098937

人 民 军 医 出 版 社



内 容 简 介

本书较全面地概括了当今 PCR 技术及其应用的各个方面,共 12 章 172 节,主要有 PCR 原理,各种反应条件优化及其他核酸扩增方法,PCR 在人类学研究,医学微生物(细菌、病毒、支原体、衣原体、立克次体)和寄生虫鉴定,人类遗传病诊断,肿瘤检测,法医判定和植物研究等中的应用。每节较详细地介绍了实际应用中各种标本的制备、实验条件选择、引物设计、结果分析、特异性和敏感性评价等。

本书可供从事分子生物学、遗传工程学、医学遗传学、微生物学、法医学、动植物学和计划生育等科研、教学、检验和有关工作者参考。

责任编辑:李春德

PCR 技术操作和应用指南

*

主编:林万明

人民军医出版社出版

(北京复兴路 22 号甲 3 号 邮政编码:100842)

解放军一二〇一工厂印刷

新华书店总店科技发行所发行

*

开本:787×1092mm 1/16·印张:33.5·字数:813 千字

1993 年 9 月第 1 版 1993 年 9 月第 1 次印刷

印数:1~2 800 册 定价:28.80 元

ISBN-7-80020-413-8/R·354

前 言

生物新技术的不断发现、发明和革新极大地推动着生物学的发展，并提供了人们阐明和解决问题的新的构思方法。聚合酶链反应（polymerase chain reaction，简称 PCR）就是一个明显的例子。

PCR 是一种在体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术，即无细胞分子克隆技术。它以待扩增的两条 DNA 链为模板，由一对人工合成的寡核苷酸引物介导，通过 DNA 聚合酶酶促反应，快速体外扩增特异 DNA 序列。由于 PCR 技术经过变性、复性和延伸约 30 个循环就可在 2 小时内将靶 DNA 扩增数百万倍，并具有操作简单、快速、特异和灵敏的特点。所以，该技术自 1985 年问世以来，在国际上引起极大的反响，并以惊人的速度广泛应用于生物科学的各个领域，成为分子生物学发展史上的又一个里程碑。

为了使 PCR 技术在国内尽快推广和发展，我们组织国内最先开展 PCR 技术的有关专家，在参考最新文献的基础上，编写成此书。该书主要介绍了 PCR 和其它核酸扩增等各种方法，以及在微生物学、遗传病学、法医学和植物学等研究中的应用。书中各节详细介绍了实际应用中各种标本的制备、实验条件选择、引物设计、结果分析、特异性和敏感性的评价等，不但使初入此道的新手参照本书能够作出满意的结果，而且对有一定经验的专家也会有所启迪，但由于编写者水平所限，差错之处在所难免，敬请批评指正。

林万明

1993 年 1 月 16 日

目 录

第一章	核酸体外扩增技术的发展	(1)
第二章	PCR 基本技术	(5)
第一节	PCR 的原理与操作	(5)
第二节	PCR 条件的优化	(7)
第三节	PCR 引物的设计	(15)
第四节	耐热 DNA 聚合酶	(23)
第五节	PCR 污染的对策	(28)
第六节	PCR 标本的制备	(31)
第七节	PCR 扩增产物的分析法	(39)
第八节	引物的 5'端修饰法	(50)
第九节	探针的 PCR 标记法	(56)
第十节	碱基替代 PCR	(59)
第十一节	基因组 DNA 的扩增	(61)
第十二节	RNA 的扩增	(63)
第十三节	古 DNA 的扩增	(65)
第十四节	未知序列的扩增	(68)
第十五节	简并引物与应用	(79)
第十六节	用不对称 PCR 产生单链 DNA	(83)
第十七节	PCR 相关技术	(86)
第三章	其他核酸体外扩增技术	(91)
第一节	转录依赖的扩增系统	(91)
第二节	自主序列复制系统	(94)
第三节	链替代扩增反应	(95)
第四节	连接酶链反应	(98)
第五节	Q β 复制酶系统	(100)
第六节	循环探针反应	(103)
第四章	PCR 技术在分子生物学研究中的应用	(106)
第一节	PCR 克隆技术	(106)
第二节	PCR 直接测序技术	(113)
第三节	定量 PCR	(125)
第四节	PCR 体外定点突变技术	(134)
第五节	突变的分子水平分析	(139)
第六节	cDNA 文库的构建与筛选	(143)

第七节	用 PCR 构建载体	(146)
第八节	同源重组子检测与 PCR 产物	(147)
第九节	DNase I 足迹分析	(151)
第十节	PCR 模板的体外转录	(153)
第十一节	PCR 在染色体区带特异性克隆中的应用	(155)
第十二节	PCR-SSCP 在基因分析中的应用	(160)
第五章	PCR 在医学细菌、支原体、衣原体、立克次体、螺旋体和寄生虫检测中的应用	(163)
第一节	用 PCR 直接检测标本中的大肠杆菌	(163)
第二节	用 PCR 检测痢疾和侵袭性大肠杆菌	(167)
第三节	用 PCR 检测沙门菌属杆菌	(171)
第四节	小肠结肠炎耶尔森菌和假结核耶尔森菌的 PCR 检测法	(172)
第五节	用 PCR 检测霍乱弧菌 CT 操纵子	(173)
第六节	创伤弧菌的 PCR 扩增检测法	(174)
第七节	用 PCR 法检测荧光素酶基因和制备发光菌种特异性杂交探针	(176)
第八节	用 PCR 检测嗜水气单胞菌的 aer 基因	(178)
第九节	用 PCR 结合 DNA 探针检测杀鲑气单胞菌	(180)
第十节	用 PCR 快速诊断脑膜炎双球菌	(181)
第十一节	PCR 在不同血清型脑膜炎奈瑟菌外膜蛋白 1 的比较研究中的应用	(182)
第十二节	淋球菌的 PCR 检测	(185)
第十三节	PCR 在金黄色葡萄球菌各种毒素检测中的应用	(190)
第十四节	用 PCR 检测凝固酶阴性耐甲氧西林葡萄球菌	(193)
第十五节	用 PCR 检测绿脓杆菌	(195)
第十六节	用 PCR 检测肺炎杆菌	(196)
第十七节	用 PCR 检测水中存活的嗜肺军团杆菌	(198)
第十八节	用 PCR 直接检测支气管灌洗液中的军团菌	(201)
第十九节	布鲁菌的 PCR 检测方法	(203)
第二十节	单核增生李斯特菌的 PCR 检测	(206)
第二十一节	结核杆菌的 PCR 检测	(211)
第二十二节	麻风杆菌的 PCR 检测	(215)
第二十三节	用 PCR 检测副结核杆菌	(217)
第二十四节	用 PCR 检测炭疽杆菌芽胞	(220)
第二十五节	用 PCR 预测苏云金杆菌杀虫因子活性	(221)
第二十六节	用 PCR 检测幽门螺杆菌	(224)
第二十七节	PCR 在区别不同莫拉菌纤毛基因倒位区序列中的应用	(226)

第二十八节	PCR 在艰难梭菌研究中的应用	(229)
第二十九节	据 16S rDNA PCR 产物的限制性酶切位点差异 对梭状芽孢杆菌分类	(231)
第三十节	用 PCR 特异检测 B 型肉毒杆菌	(232)
第三十一节	PCR 在拟杆菌研究中的应用	(233)
第三十二节	用 PCR 结合特异的 DNA 探针鉴定嗜常温乳酸细菌	(235)
第三十三节	用 PCR-RFLP 鉴定乳腺链球菌与副乳腺链球菌	(236)
第三十四节	用 PCR 检测胸膜肺炎放线杆菌	(237)
第三十五节	PCR 在莱姆病研究中的应用	(238)
第三十六节	用 PCR 检测临床标本中的钩端螺旋体	(242)
第三十七节	用 PCR 检测梅毒螺旋体	(244)
第三十八节	肺炎支原体的 PCR 检测	(249)
第三十九节	用 PCR 鉴定肺炎支原体和生殖器支原体	(252)
第四十节	用 PCR 从脓毒性关节炎病人的标本中检测解脲脲原体	(254)
第四十一节	用 PCR 检测发酵支原体	(255)
第四十二节	用 PCR 检测衣原体 DNA	(256)
第四十三节	两步 PCR 检测和鉴别鸚鵡热衣原体菌株	(258)
第四十四节	用 PCR 直接检测印度客蚤体内的莫氏立克次体	(261)
第四十五节	用 PCR 诊断流行性斑疹伤寒	(264)
第四十六节	用 PCR 检测恙虫病立克次体	(266)
第四十七节	用 PCR 检测洛矶山斑点热临床标本	(267)
第四十八节	PCR 在 Q 热立克次体检测及鉴定中的应用	(269)
第四十九节	用 PCR 检测感染马标本中的埃里希体	(273)
第五十节	用 PCR 检测人埃氏菌病的致病因子	(274)
第五十一节	PCR 在弗兰克菌遗传种系亲缘关系研究中的应用	(276)
第五十二节	用 PCR 检测临床标本中的疟原虫	(278)
第五十三节	用 PCR 检测致病性阿米巴	(280)
第五十四节	用 PCR 检测鼠弓形虫	(282)
第五十五节	卡氏肺孢子虫肺炎的 PCR 诊断	(284)
第五十六节	用 PCR 检测利什曼原虫	(286)
第五十七节	用 PCR 检测锥虫	(288)
第六章	病毒学	(291)
第一节	应用通用引物 PCR 方法检测生殖道人乳头瘤病毒	(291)
第二节	人类巨细胞病毒的 PCR 检测	(296)
第三节	用 PCR 分型检测单纯疱疹病毒	(300)
第四节	用套式 PCR 检测单纯疱疹病毒	(304)

第五节	用 PCR-EC 分型检测疱疹病毒	(306)
第六节	用 RAN-PCR 检测单纯疱疹病毒	(308)
第七节	EB 病毒基因组的 PCR 检测	(310)
第八节	水痘-带状疱疹病毒的 PCR 检测	(314)
第九节	用 PCR 检测人 B19 病毒	(316)
第十节	PCR 在婴幼儿腺病毒性腹泻检测中的应用	(319)
第十一节	乙型肝炎病毒的 PCR 检测	(322)
第十二节	丙型肝炎病毒的 PCR 检测	(327)
第十三节	丙型肝炎病毒的 RT/PCR 诊断	(334)
第十四节	人粪便标本中戊型肝炎病毒的 RT/PCR 直接检测	(336)
第十五节	PCR 在人类免疫缺陷病毒中的应用	(339)
第十六节	用 PCR 检测人血标本中 HTLV 前病毒序列	(352)
第十七节	PCR 在黄病毒检测和研究中的应用	(355)
第十八节	风疹病毒的 PCR 检测	(360)
第十九节	人细小 RNA 病毒基因组的 PCR 扩增	(362)
第二十节	PCR 在流行性出血热研究中的应用	(367)
第二十一节	PCR 应用于粪便标本中轮状病毒的检测	(368)
第二十二节	用 PCR 检测蓝舌病毒	(370)
第二十三节	PCR 在新病毒鉴定中的应用	(373)
第七章	PCR 技术在遗传病基因分析及诊断中的应用	(378)
第一节	地中海贫血的基因诊断	(378)
第二节	苯丙酮尿症	(381)
第三节	杜氏/贝氏进行性肌营养不良	(385)
第四节	血友病	(392)
第五节	性别发育异常	(397)
第六节	脆-X 综合征	(401)
第七节	$\alpha 1$ 抗胰蛋白酶缺陷症	(403)
第八节	马凡综合征	(406)
第九节	PCR 技术在线粒体病诊断中的应用	(407)
第八章	PCR 在白血病检测中的应用	(417)
第一节	用 PCR 检测白血病时 T 细胞受体 β 链基因重排	(417)
第二节	用 PCR 检测白血病时 TCR γ 链基因重排	(419)
第三节	用 PCR 检测白血病时 TCR δ 链基因重排	(422)
第四节	用 PCR 检测白血病时免疫球蛋白重链基因 CDR-III 序列重排	(424)
第五节	用 PCR 检测白血病时免疫球蛋白重链基因重排	(426)
第六节	用 PCR 检测白血病时 t(1; 19)(q ²³ ; p ¹³) 染色体易位	

	产生的 E2A/PBX 1 融合 mRNA	(427)
第七节	用 PCR 检测白血病时 t(10; 14)(q ²⁴ ; q ¹¹) 染色体易位	(429)
第八节	用 PCR 检测 B 细胞肿瘤时 t(14; 18) 染色体易位	(430)
第九节	用 PCR 检测白血病时 bcr-abl 融合基因的 mRNA 序列	(432)
第十节	用 PCR 检测白血病时 ras 癌基因突变	(433)
第十一节	用 PCR 检测人类 T 淋巴细胞白血病病毒	(438)
第十二节	用 PCR 检测 AML 和 MDS 人 FMS 基因突变	(440)
第十三节	用 PCR 检测急性早幼粒细胞白血病 RAR α /myl 融合基因的 mRNA 序列	(442)
第十四节	用 PCR-RFLP 法测定 ras 突变	(443)
第十五节	用 PCR 检测急性白血病 p53 基因突变	(444)
第九章	PCR 在骨髓移植 HLA-D 位点配型中的应用	(446)
第一节	骨髓移植与 HLA	(446)
第二节	用 PCR/SSOPH 法进行骨髓移植 HLA-D 位点配型	(447)
第三节	PCR/SSOPH 反向杂交在骨髓移植配型中的应用	(450)
第四节	用 PCR-指纹图法进行骨髓移植 HLA-DR β 快速配型	(453)
第十章	PCR 技术在法庭科学中的应用	(454)
第一节	法医学生物样品中 DNA 的制备	(454)
第二节	PCR 在 HLA-DQ α 分型中的应用	(458)
第三节	载脂蛋白 B(Apo B) 基因高变区的扩增及其在法庭科学中的应用 ...	(461)
第四节	随机引物在 DNA 扩增及多态性分析中的应用	(462)
第五节	基因组中简单重复 DNA 序列多态性在法医学斑迹检验中的应用 ...	(464)
第六节	小卫星重组编码序列在 DNA 多态性分析中的应用	(467)
第七节	等位基因特异的 DNA 扩增技术在性交混合分泌物分析中的应用 ...	(472)
第八节	人类 SRY 基因的检测及其在法庭科学性别鉴定中的应用	(475)
第九节	用 PCR 技术扩增 DYZ1 DNA 进行性别鉴定	(476)
第十一章	PCR 在组织与群体生物学研究中的应用	(479)
第一节	PCR 在生物分类学中的应用	(479)
第二节	PCR 在群体生物学中的应用	(482)
第三节	PCR 在动物保护中的应用	(483)
第四节	PCR 在生态学研究中的应用	(484)
第十二章	PCR 在植物学中的应用	(486)
第一节	PCR 在大麦黄矮病毒外壳蛋白基因克隆中的应用	(486)
第二节	PCR 在大麦黄矮病毒基因序列分析中的应用	(488)
第三节	用 PCR 检测蚜虫中的大麦黄矮病毒	(491)
第四节	用 PCR 检测大麦黄矮病毒组中的病毒	(493)

第五节	用 PCR 检测甜菜西方黄化病毒	(495)
第六节	用 PCR 检测菜豆黄色花叶病毒	(497)
第七节	用 PCR 检测李痘病毒	(499)
第八节	用简并引物 PCR 法鉴定马铃薯 Y 组病毒	(501)
第九节	用 PCR 检测和鉴定玉米条斑及相关双联病毒	(503)
第十节	PCR 用于黄瓜花叶病毒 RNA 体外转录的侵染性研究	(506)
第十一节	PCR 在类病毒检测中的应用	(509)
第十二节	PCR 在土传真菌病害检测中的应用	(513)
第十三节	用 PCR 构建 cDNA 基因文库研究线虫侵染的植物 根基因的表达	(515)
第十四节	用 PCR 和含有脱氧肌苷简并引物研究蕃茄中抗根 节线虫的分子标记酸性磷酸酶	(518)
第十五节	用反向 PCR 快速估计转基因植物在转化早期的 T-DNA 复制数	(521)
第十六节	用 PCR 鉴定玉米叶绿体 tRNA 的加工 中间产物和剪接位点	(523)

第一章 核酸体外扩增技术的发展

核酸研究已有 100 多年的历史。早在 1869 年瑞士年青医生 Miescher 就开始了核酸的研究，到 1930 年人们才正式提出两种核酸(RNA 和 DNA)的概念。从此人们对其化学组成、结构及其功能进行了深入研究。1953 年 Watson 和 Crick 提出了 DNA 双螺旋结构及其半保留复制模型，继而得到了证明。之后，对基因的表达和调控等方面的研究取得了长足进步。60 年代中期开始的从细胞中分离基因的工作拉开了基因工程的序幕。本世纪 60 年代末和 70 年代初，人们主要致力于研究基因的体外分离技术。Khorana 及其同事于 1971 年曾发表文章指出：“经过 DNA 变性，与合适引物杂交，用 DNA 聚合酶延伸引物，并不断重复该过程便可克隆 tRNA 基因”。这是核酸体外扩增最早的设想。但由于当时很难进行测序和合成寡核苷酸引物，且当时(1970 年)由于 Smith 等发现了 DNA 限制性内切酶，使体外克隆基因成为可能，所以，使 Khorana 等的早期设想被人们遗忘。直到 1985 年，美国 PE-Cetus 公司的人类遗传研究室 Mullis 等人才发明了具有划时代意义的聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)。使人们梦寐以求的体外无限扩增核酸片段的愿望成为现实。其原理类似于 DNA 的体内复制，只是在试管中给 DNA 的体外合成提供一种合适条件——模板 DNA，寡核苷酸引物，DNA 聚合酶，合适的缓冲液系统和 DNA 变性、复性及延伸的温度与时间等。这些条件其实早于发明该技术的 10 年前就具备了，但历经如此之久人们才发现 PCR 的重要意义。这是对当今飞速发展的生物学的挑战，也是科学发展促使人们去寻找解决问题新途径的必然，是值得每位分子生物学家反思的。

Mullis 本人在发明 PCR 后，曾撰文描述了他是如何发明该技术的。他在题为“偶然想出的聚合酶链反应”一文中写到：“这种简单得令人惊奇，可以无限地拷贝 DNA 片段的方法是在不可想象的情况下，即驾车行驶在月色下的加利福尼亚山间公路上时想出来的”。此后，Mullis 对其设想进行了大量试验，终于在几个月后在实验室内成功地完成了 PCR。开始是使用大肠杆菌 DNA 聚合酶 Klenow 片段来扩增人基因组中的特异片段。由于该酶不耐热，因此，每次加热变性 DNA 后都要重新补加 Klenow 酶。在操作多份标本时，这一过程耗时，费力，且易出错。而耐热 DNA 聚合酶的应用使得 PCR 反应更易于自动化，继而 PE-Cetus 公司推出了第一台 PCR 热循环仪，使该技术的自动化成为现实。

PCR 于 1987 年得到了美国专利局的专利授权。两年(1989 年)后，美国 Dupont 公司对该专利提出了异议。其理由是，早于 1971 年 PCR 的雏形已由 Khorana 实验室的一系列文章阐明，并公布于众，PCR 技术应当是公共产权。斯坦福大学因研究 DNA 聚合酶而获得诺贝尔奖的 Kornberg 也认为，任何具备生物技术知识的人都可以从 Khorana 等的文章中推知如何操作 PCR。但美国专利局驳回了 Dupont 公司的异议。不管 PCR 专利归属如何，它毕竟是一项伟大的发明，有关 PCR 相关技术的发展和运用也像 PCR 扩增本身一样迅速成倍增长，并渗透于生物学科的各分支(表 1-1 和表 1-3)。

表 1-1 PCR 相关技术的发展

名 称	主 要 用 途
简并引物扩增法	扩增未知基因片段
巢居 PCR	提高 PCR 敏感性、特异性, 分析突变
复合 PCR	同时检测多个突变或病原
反向 PCR	扩增已知序列两侧的未知序列, 致产物突变
单一特异引物 PCR	扩增未知基因组 DNA
单侧引物 PCR	通过已知序列扩增未知 cDNA
锚定 PCR	分析具备不同末端的序列
增效 PCR	减少引物二聚体, 提高 PCR 特异性
固着 PCR	有利于产物的分离
膜结合 PCR	去除污染的杂质或 PCR 产物残留
表达盒 PCR	产生合成或突变蛋白质的 DNA 片段
连接介导 PCR	DNA 甲基化分析、突变和克隆等
RACE-PCR	扩增 cDNA 末端
定量 PCR	定量 mRNA 或染色体基因
原位 PCR	研究表达基因的细胞比例等
臆断 PCR	鉴定细菌或遗传作用
通用引物 PCR	扩增相关基因或检测相关病原
信使扩增表型分型(mapping)	同时分析少量细胞的 mRNA

PCR 及其相关技术的发展速度是惊人的, 没有一种技术的发展与应用之快能与 PCR 相比。国际上分别于 1988 年和 1990 年在美国和英国召开了第一届和第二届 PCR 技术专题研讨会。第一届会议主要讨论了 PCR 的应用与技术本身的优化问题; 第二届会议的主要议题是人类基因组计划与 PCR 的最新进展。这充分体现了生物学家对 PCR 的重视。一些分析家预言, 今后五年内 PCR 市场将达到 4×10^8 美元。

与 PCR 及其相关技术发展的同时, 新的扩增技术也不断诞生(表 1-2)。这些技术各有利弊, 与 PCR 互为补充, 有的可结合应用, 共同构成了核酸体外扩增技术的大家族。我们相信, 随着分子生物学技术的发展, 这一家族一定会再涌现出新成员。

表 1-2 其它体外核酸扩增技术

技 术	应 用
转录依赖的扩增系统(TAS)	检测 HIV
连接酶链反应(LCR)	检测点突变
自主序列复制(3SR)系统	研究 RNA, 临床应用、法医学等
链替代扩增(SDA)	检测、鉴定基因
Q_{β} 复制酶系统	增加探针检测敏感性
循环探针反应	增加探针检测敏感性

表 1-3 PCR 技术的应用

应用范围举例

研究

基因克隆；DNA测序；分析突变；基因重组与融合；鉴定与调控蛋白质结合的DNA序列；转座子插入位点的绘图；检测基因的修饰；合成基因的构建；构建克隆或表达载体；检测某基因的内切酶多态性

诊断

细菌(螺旋体、支原体、衣原体、分支杆菌、立克次氏体、白喉杆菌、致病大肠杆菌、痢疾杆菌、嗜水气单胞菌和艰难梭菌等)；病毒(HTLV、HIV、HBV、HCV、HPVS、EV、CMV、EBV、HSV，麻疹病毒、轮状病毒、细小病毒 B19 和拉萨病毒等)；寄生虫(疟疾等)；人遗传病(Lesh-Nyhan 综合征、地贫、血友病、BMD、DMD、囊性纤维化等)

免疫学

HLA分型；T细胞受体或抗体多样化的定性；自身免疫病基因作图；淋巴因子定量

人类基因组工程

用散布重复序列产生DNA标志；遗传图谱的构建(检测DNA、多态性或精子绘图)；物理图谱的构建；测序，表达图谱

法医

犯罪现场标本分析；HLA-DQ_α分型

肿瘤

胰癌、结肠癌、肺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、血液恶性肿瘤

组织和群体生物学

遗传聚类研究；进化研究；动物保护研究；生态学；环境科学；实验遗传学。

古生物学

考古与博物馆标本分析

动物学

动物传染病的诊断等

植物学

检测植物病原等

(林万明 杨瑞馥)

参考文献

1. Bei AK. Crit Rev Biochem Mol Biol 1991; 26: 301
2. Cox PT, et al. Lab Animal 1991; 5: 22
3. Reynolds R, et al. Anal Chem 1991; 63: 2
4. Arnheim N, et al. Bioscience 1990; 40: 174
5. Cox RD, et al. Bioessays 1991; 13: 193

6. Rose EA. FASEB J 1991; 5: 46
7. Mullis KB. Sci Am 1990; 4: 56
8. Barinaga M. Science 1991; 251: 739
9. Duck P, et al. BioTechniques 1990; 9: 142

第二章 PCR 基本技术

第一节 PCR 的原理与操作

一、基本原理

PCR 是一种选择性体外扩增 DNA 或 RNA 片段的方法。其特异性是由两个人工合成的引物序列决定的。所谓引物就是与待扩增 DNA 片段两翼互补的寡核苷酸，其本质是 ssDNA 片段。待扩增 DNA 模板加热变性后，两引物分别与两条 DNA 的两翼序列特异复性。此时，两引物的 3'端相对，5'端相背。在合适条件下，由 Taq(或其它)DNA 聚合酶催化引物引导的 DNA 合成，即引物的延伸。上述过程是由温度控制的。这种热变性-复性-延伸的过程就是一个 PCR 循环(图 2-1)。PCR 就是在合适条件下的这种循环的不

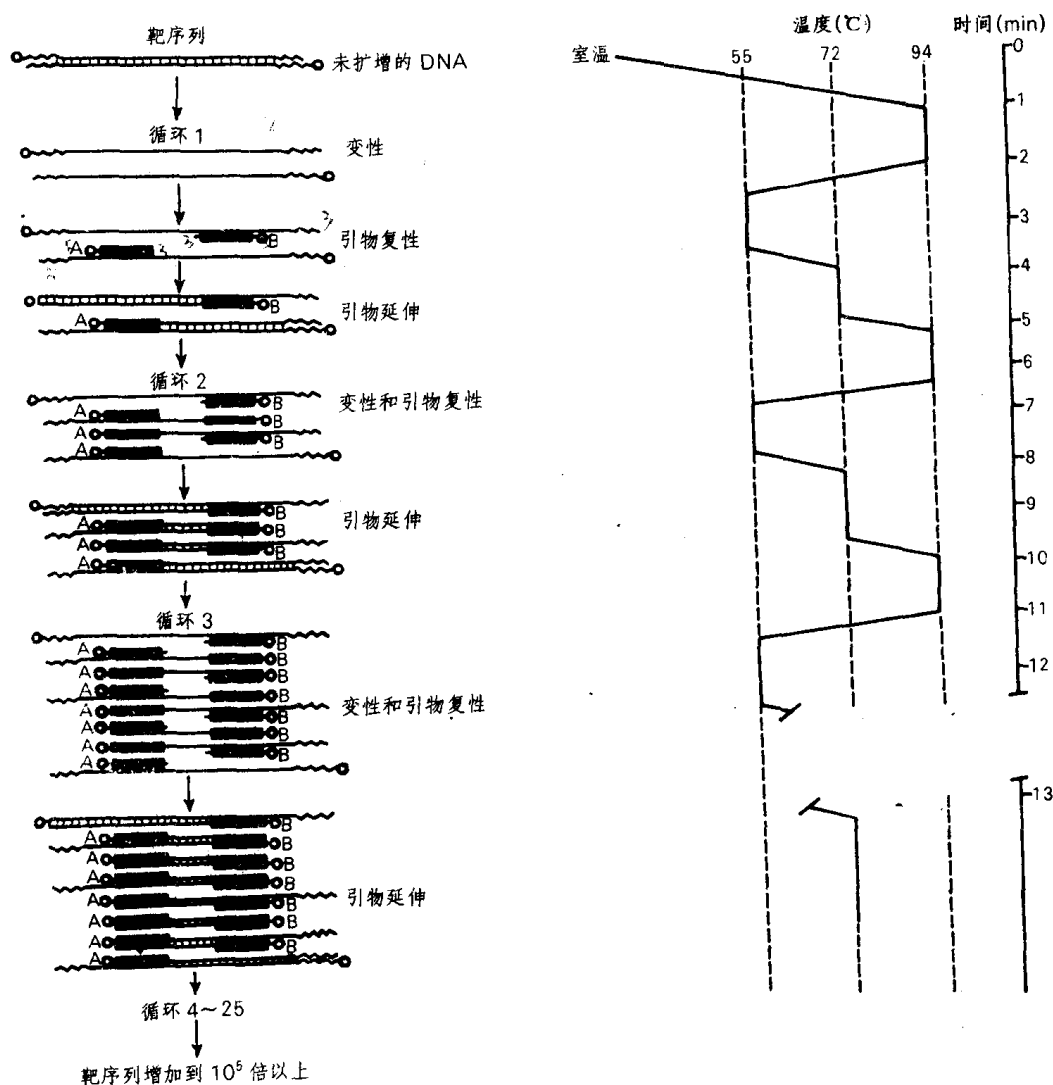


图 2-1 PCR 反应的基本原理

图右侧曲线为变性、复性和延伸的温度与时间

断重复。延伸的产物经第二循环变性后，亦与引物互补，作为引物引导 DNA 合成的新模板。因此，第二循环后，延伸的模板由第一循环的 4 条增为 8 条(包括原始模板在内)，依次类推，以后每一循环后的模板均比前一循环增加 1 倍。理论上讲，扩增 DNA 产量是指数上升的，即 n 个循环后，产量为 2^n 拷贝。图 2-1 明显指明了扩增片段的末端是由两引物 5' 端限定的。

图 2-1 所示的前 3 个循环是完整的。从第 4 个循环开始，图中未示出原始模板 DNA 的归宿。需注意的是，较两引物限定区长的延伸产物仅能发生在以原始模板 DNA 为模板的扩增产物中，所以，这种扩增产物每一循环后仅增加 2 条，其扩增量为 $2n$ ，即 30 个循环后才增加至 60 条单链，电泳时根本无法发现如此微量的 DNA。相反，较短的引物限定的 DNA 扩增片段出现于第二循环，以后每一循环都比前一循环增加 1 倍，并很快成为主要的扩增产物。30 个循环后，扩增量为 2^{30} 拷贝，约 10^9 个拷贝。

二、典型的 PCR 操作

在此处仅列出一般 PCR 操作过程，具体各种影响因素的优化将在本章第二节讨论，每一具体操作前都需进行必要的优化。

(一) 试剂

(1)引物：根据待扩增 DNA 不同，引物亦不同，引物的设计见本章第三节。

(2)耐热 DNA 聚合酶：此酶是从耐热细菌中分离出来的，能耐受高温(93~100℃)，不同耐热 DNA 聚合酶的特性详见本章第 4 节。Perkin-Elmer-Cetus 公司、N.F.Biolab、Pharmacia 公司、国内华美公司、复旦大学和中国医学科学院友谊公司等均有商品供应。

(3)10× PCR 缓冲液：500mmol/L KCl；100mmol/L Tris-HCl(pH8.4, 20℃)，150mmol/L MgCl₂，1mg/ml 明胶。

(4)5mmol/L dNTP 贮备液：将 dATP，dCTP，dGTPT 和 dTTP 钠盐各 100mg 合并，加 3ml 灭菌去离子水溶解，用 NaOH 调 pH 至中性，分装每份 300μl，-20℃ 保存。dNTP 浓度最好用 UV 吸收法精确测定。另外，现在已有中性 dNTP 溶液商品供应(Sigma 公司和 Pharmacia 公司等)。

(5)标本处理试剂：不同标本所需试剂不同，根据具体情况而定(见本章第 6 节)。

(二) 操作程序

利用 PCR 扩增的操作程序基本相同，只是根据引物与靶序列的不同，选择不同的反应体系与循环参数(见本章第二节)。基本的操作是将 PCR 必需反应成分加入一微量离心管中，然后置于一定的循环参数条件下进行循环扩增。每个实验室或每个人都有不同的操作习惯，但需遵守一定的操作规范。我们推荐下述操作程序，因这样操作可最大程度地增加反应的成功率。

(1)向一微量离心管中依次加入：

ddH ₂ O	补至终体积(终体积 50~100μl)
10×PCR 缓冲液	1/10 体积
dNTP	各 200μmol/L
引物	各 1μmol/L
DNA 模板	10 ² ~10 ⁵ 拷贝

混匀后,离心 15s 使反应成分集于管底。

(2)加石蜡油 50~100 μ l 于反应液表面以防蒸发。置反应管于 97 $^{\circ}$ C 变性 7min(染色体 DNA)或 5min(质粒 DNA)。

(3)冷至延伸温度时,加入 1~5U Taq DNA 聚合酶,在此温度下作用 1min。

(4)于变性温度下使模板 DNA 变性适当时间。

(5)在复性温度下使引物与模板杂交一定时间。

(6)在延伸温度下使复性的引物延伸合适的时间。

(7)重复(4)~(6)步 25~30 次。每次即为一个 PCR 循环。

(8)微量琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物(见本章第 7 节)。

上述过程可以用 PCR 自动热循环仪进行,也可以设定 3 个恒温水浴锅手工操作(本章第 11 节)。

(杨瑞馥 林万明)

参 考 文 献

1. White H, et al. TIG 1989; 5: 167
2. D'Aquila RT, et al. Nucleic Acids Res 1991; 19: 3749
3. George PM. N Z Med J 1990; 103: 39
4. Cox PT, et al. Lab Anim 1991; 5: 22

第二节 PCR 条件的优化

PCR 必需具备下述基本条件:①模板核酸(DNA 或 RNA);②人工合成的寡核苷酸引物;③合适的缓冲体系;④ Mg^{2+} ;⑤三磷酸脱氧核苷酸;⑥耐热 NDA 聚合酶;⑦温度循环参数(变性、复性和延伸的温度与时间以及循环数)。另外,还有一些其它因素,如二甲基亚砷、甘油、石蜡油、明胶或小牛血清白蛋白等也影响某些特定 PCR。下面分别讨论这些因素在 PCR 反应中的作用及其对 PCR 的影响。

一、模板核酸

PCR 可以以 DNA 或 RNA 为模板进行核酸的体外扩增。不过 RNA 的扩增需首先逆转录成 cDNA 后才能进行正常 PCR 循环。核酸标本来源广泛,可以从纯培养的细胞或微生物中提取,也可以从临床标本(血、尿、粪便、体腔积液、嗽口水等)、犯罪现场标本(血斑、毛发、精斑等)和病理解剖标本(新鲜的或经甲醛固定石蜡包埋组织)以及考古标本中直接提取。无论标本来源如何,待扩增核酸都需部分纯化,使核酸标本中不含 DNA 聚合酶抑制剂。关于核酸的具体处理方法详见本章第六节。

PCR 反应中模板加入量一般为 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的靶序列。 1μ g 人基因组 DNA 相当于 3×10^5 个单拷贝的靶分子;10ng 酵母 DNA 相当于 3×10^5 靶分子;1ng 大肠杆菌 DNA 相当于 3×10^5 靶分子;1%的 M_{13} 噬菌斑相当于 10^6 靶分子。因此,扩增不同拷贝数的靶序列时,加入的含靶序列的 DNA 量亦不同。如真核 rRNA 基因有 200~500 拷贝,反应中仅