

PCR 技术

——DNA扩增的原理与应用

[美] HA 艾利希 主编

田 丁 张基增 等译

北京医科大学
中国协和医科大学 联合出版社

Q
LX

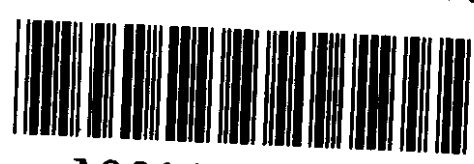
PCR 技术 ^{YX/21/13}

——DNA扩增的原理与应用

主编
H.A.艾利希

译者

田 丁	张基增	俞守义
何玉凯	潘星华	纪立农
朱一川	李 锋	吕厚山
沈 虹	王槐声	



A0011978

北京医科大学联合出版社
中国协和医科大学

Edited by
HENRY A. ERLICH
PCR TECHNOLOGY
Principles and Applications for
DNA Amplification
STOCKTON PRESS
1989

内容介绍

PCR(聚合酶链反应)技术是一项革命性技术。借助于这项技术,痕迹量的遗传物质可以迅速而简便地扩增为百万倍之巨的DNA,可以实现原本无法进行的各种各样分析研究。因此,这项技术即要成为某些生物技术和临床诊断的标准方法。本书是由建立和发展该技术的先驱者们撰写的权威著作,对PCR技术的方法学和包括医学、进化和法医等方面的广泛应用都有详细介绍。

PCR技术——DNA扩增的原理与应用

H. A. 艾利希 主编

田 丁 等译

责任编辑:梁 康

※ ※ ※

北京医科大学
中国协和医科大学联合出版社出版

(社址:北京医科大学院内)

新华书店总店科技发行所发行 各地新华书店经销

北京怀柔燕东印刷厂印刷

※ ※

开本:850×1168 1/32 印张:8.6875 字数:227千字
1991年8月第1版 1991年8月第1次印刷 印数 01-3000册
ISBN7-31034-065-4/R·65 定价:6.50元

前 言

自从1985年第一篇报告使用聚合酶链反应(PCR)扩增特异性DNA以来,随着基本方法的完善,不断涌现各类应用。据称,其增加速度呈指数性—像PCR本身一样。无论如何,详细讨论利用PCR的正在研究的全部生物学问题以及所有各类实验方法乃超越了本书的范围。将本书设想为一个迅速发展领域的“快照”,它所奉献的各章组成3个部分:基础方法学、研究应用和医学应用。我在每一部分之前作了简短的介绍,引用与该部分有关的较为新近的文献,以指点读者寻找本书未包括的题目,“填补空白”。某些章提供了详细的方案、列举所宠爱的“PCR验方”,而另外一些章则给予特殊领域的总观。我希望已有一些方法学上和应用上知识的有志读者即着手搞出与他的研究领域有关的以PCR为基础的方法。

我感激 Cetus 现在的和过去的同事们对本书的奉献,当然,尤其是这些同事对这项技术的贡献,而正是有了这些技术才有本书。我感谢 Kary Mullis 发明了基本的PCR方法,并感激人类遗传系的同事们 (Randall Saiki、Stephen Scharf、Glenn Horn、Fred Faloona、Kary Mullis和Norn Arnheim) 最先用于人类遗传变异的分析从而发展了PCR。感谢 David Gefand 和 Susanne Stoffel 分离并特征出耐热的DNA聚合酶(Taq聚合酶),它在PCR中的使用引致了当今迅速的和自动化程序的出现,并使该方法从最后的手段变为最先选择。编者感激 Corey Levenson、Dragan Spasic和Lauri Goda欣然地满足由PCR产生的对人工合成寡聚核苷酸需求的增加。作者亦感谢 Tom White 作为研究主任,看出PCR的潜力并支持其开发,

我感激 John Sninsky, 他除了应用PCR 於病毒检测之外, 还为发展Taq聚合酶和自动化热循环仪作出了贡献。最后, 如无Kathy Levenson紧密地与我一道工作, 及Dean Grantham的帮助, 把断断续续的草稿汇集成即可拍摄的拷贝, 本书也是不可能出版的。

(田 丁译)

目 次

第一部分 基本方法学	1
1. PCTaqR的设计与优化	7
2. Taq DNA聚合酶.....	18
3. 聚合酶链反应(PCR)自动化	26
4. PCR样本的简单、快速制备法	37
第二部分 研究应用	46
5. 体外扩增DNA的直接测序.....	51
6. 应用PCR操作DNA.....	70
7. PCR、GC-夹子和变性梯度凝胶电泳检测突变	82
8. 基因表达的检测.....	101
9. cDNA库中特异顺序的PCR扩增	113
10. 反向聚合酶链式反应.....	121
11. Alu PCR; 运用重复顺序引物扩增复杂样品中人类 DNA.....	129
12. 一种构建基因图谱的新途径: 单个配子DNA顺序的 PCR分析.....	135
13. 通过PCR方法的进化分析.....	154
第三部分 医学应用	166
14. PCR在单基因病诊断中的应用.....	170
15. 用聚合酶链反应诊断新的基因突变病.....	190
16. HLAⅡ类基因多态性: DNA分型、 进化和疾病易感性的关系	214
17. PCR在生物学证据分析上的应用.....	231

18. 用PCR检测ras癌基因	248
19. PCR 应用于检测人类传染性疾病	259

第一部分 基本方法学

在分子生物学短短的历史中，新技术（如Southern印迹法、分子克隆、脉冲场凝胶电泳）的出现常常改变我们研究基础和应用生物学问题的思路。借助聚合酶链反应（PCR）可扩增DNA特异性片段的能力代表了这种变化。PCR是一种特异性DNA序列的体外酶促合成方法，利用2个寡聚核苷酸引物杂交对应链目的区域的侧翼上。一连串包括模板变性作用、引物退火和由DNA聚合酶酶促退火引物延伸的周期的重复产生特定片段的指数性积聚，该片段的末端由引物的5'末端决定。因一个周期所合成的引物延伸产物可作为一下个周期的模板，所以靶DNA拷贝数目在每个周期中近似呈倍数增加。这样，20个PCR周期可得约百万倍（ 2^{20} ）扩增。Kary Mullis发明的这种方法，^(1,2)最初由Cetus人类遗传系的一个小组应用于 β -珠蛋白的扩增和镰形细胞贫血的产前诊断^(3,4,5)。

最初，PCR采用E Coli DNA聚合酶I的Klenow片段以延伸退火的引物。该酶被每一PCR周期开始时为分开双链DNA所需要的高温所灭活。因此，在每一周期间不得不添加新鲜酶。由Thermus aquaticus（见第2章）分离出的耐热DNA聚合酶（Taq聚合酶）的引入使PCR变为简单又皮实的反应，此反应现已为热循环装置（参看第3章）所自动化。把反应成分（模板、引物、Taq聚合酶、dNTP和缓冲液）全部汇集在一起，仅仅循环温度，扩增反应就在反应管内完成，各种反应参数（例如酶、引物和 Mg^{++} 浓度以及温度循环形式）对扩增特异性和产量的影响在第1章中讨论。虽然对任一给定的寡核苷酸引物对，可以确定一套最适条件，但并无一套最适于所有可能反应的条件。

PCR的特异性分析通常按凝胶电泳上靶片段产物与其它产物的比例来评估。影响PCR产物均一性的另一个因素是基因组模板中靶序列的浓度^[6]。该效应是从下述实验中发现的：用 β -珠蛋白引物扩增正常基因组DNA（每个细胞具有2个拷贝 β -珠蛋白）和伴有 β -珠蛋白缺失纯合子的基因组DNA。采用正常的基因组模板，该反应生成独特的 β -珠蛋白片段而无可查出的非特异性产物。使用 β -珠蛋白缺失的DNA标本，正如所预期的，并无珠蛋白片段合成；然而却产生了几种非靶片段。这样，在缺乏“正确”的模板时，“错误”的序列被 β -珠蛋白引物扩增，恰如古谚称，“空闲的手，魔鬼的玩具”。这一效应部分地说明了由极稀少序列作模板（象HIV序列仅存於小部分采样的细胞中）时PCR呈不均一的凝胶图形。正如在第1章中讨论的，为优化扩增的特异性而修改各种PCR参数，即使在稀少的模板反应中，也可以生成更为均一的产物。

最初的PCR方法用Klenow酶在37℃条件下合成DNA，特异性不高。虽然特定的靶片段能被扩增到百万倍，但是事实上，在PCR中所合成的大多并非该靶片段。用 β -珠蛋白探针检测靶序列和引物之一检测任何扩增序列以筛选一次 β -珠蛋白扩增反应的各个克隆，估计到PCR的特异性 $\sim 1\%$ ^[7]。其它引物对的特异性或高或低，但，一般说来，Klenow酶PCR并不是很特异的反应，並需要用特异的杂交探针作其后的分析^[3,4]，或在某些情况下，用内部“隐蔽的引物”（“nested primers”）以检测並特征出扩增的靶序列。

采用Taq聚合酶不仅简化了PCR程序（参见上述），而且明显地增加了反应的特异性和总产量。Taq聚合酶的较高的最适温度（ $\sim 75^\circ\text{C}$ ）允许采用较高的引物退火和延伸温度，因而增加了反应的总体严格性，並最大限度地减少了与模板错配引物的延伸。在37℃时很多这些错配引物足够稳定以被Klenow酶延伸，产生非特异的扩增产物。Taq PCR特异性的增加因减低非靶产

物与酶和引物的竞争而提高靶片段扩增的产量。在较后的循环中, 每一个循环周期酶量不再足以延伸所有退火的引物/模板复合物, 导致反应效率减低和扩增反应的“高平台期”。Taq PCR 高平台期出现晚於用Klenow 酶的反应(例如, 以1 μ g基因组DNA开始约30个周期而不是20个周期), 因Taq PCR反应特异性提高之故。其它因素, 象在高产物浓度下模板链再结合等也与高平台期效应有关, 并在第1章予以讨论。采用Taq 聚合酶除使特异性增加和PCR产量增加成为可能之外, 还得以扩增较用Klenow 酶(<400 bp)更长的片段(直到10kb, 虽效率较低)。

虽然PCR被认为主要是一个产生特异序列拷贝的方法, 但它也是改变模板特殊序列的有效而又精细的途径。

由於寡聚核苷酸引物完全掺入为扩增物並且容忍引物5'末端和最初模板间的错配, 这就有可能通过引物把新的序列信息带到靶序列之旁。於是, 人们克隆已知的序列时不再受自然提供的限制性位点所约束而能够把任何限制性内切酶识别序列加到引物的5'末端^[7], 导致双链扩增产物形成新的限制性位点。类似地, 也可加入调节成分, 如T₇启动子, 使T₇RNA聚合酶得以由PCR产物合成RNA。此外, 用适宜引物也可引起扩增产物中的特定核苷酸的取代、插入和删除。

不象这些指导下的突变, 由於核苷酸错误掺入到PCR产物的序列变化可能产生潜在的问题。PCR中Taq聚合酶的忠实性的评价可先用M₁₃克隆某一次扩增反应产物, 然后对M₁₃克隆作序列分析。在最初的研究中^[6], 发现错误频率 $\sim 1/400$, 並由此计算出错误率为 $\sim 2 \times 10^{-4}$ nt/周期。较近期的研究, 使用另一种基因和目前的优化方案(降低Mg⁺⁺和dNTP浓度), 得出的错误率较低^[8]。原始的估计与由Taq聚合酶在试管内复制 β -半乳糖苷酶

• 在最初几个循环之后, 几乎所有的模板都是前几轮中合成的, 因此, 含有引物序列。

模板所测定的 10^{-4} nt错误率相当一致^[10]。虽然不同模板可略有不同的“易变性”而不同的反应条件可影响Taq聚合酶的忠实性，但原来估计Taq聚合酶的“高”错误率($\sim 10^{-4}$)并不对大多数应用再成为问题了。在扩增的群体分析中，如用寡核苷酸探针杂交或直接序列分析就查不出单个产物的稀少错误。但是，在来源于PCR的单个克隆的序列分析中，为从模板序列的真正拷贝中错误掺入的核苷酸，必须测定多个克隆的序列。其它具有活性“校对”功能的DNA聚合酶，象T₄ DNA聚合酶，能实行PCR并且在需要很低误差率的研究中会证实是有用的。正如在第2章中讨论的，Taq聚合酶不含有可测出的3'→5'外切核酸酶“校对”活性。

PCR的一个重要特性，特别是在诊断应用方面，是能够从粗DNA制品及由降解的DNA模板中扩增靶序列^[12]。标本中用作模板的DNA不需要化学纯而只要标本内不含有Taq聚合酶的抑制物。在第4章中讨论了用于标本制备的各种快速方案对PCR的影响。能够由粗DNA标本扩增特异性序列对研究应用（例如精液溶解产物^[13]，见第12章）、医学诊断应用（例如漱口水^[14]或存档石蜡包埋的组织标本^[15]）和法医学（例如人发^[16]，参看第17章）均有重要含意。

在扩增反应中污染的可能性对研究和诊断应用都是一个具有广泛含意的问题。已知PCR能够合成以百万计的DNA拷贝，标本反应的污染不论是前次反应产物（产物携带转移）抑或外源性物质都是潜在的问题——特别是在仅以几个模板开始的那些反应。个体精子（见第12章）、单根头发（见第17章）和HIV基因组序列的扩增（见第19章）均需严格的手段最大限度地减少和监测潜在的污染。一般，细致的实验程序、分装试剂、正压移液吸管以及将反应产物分析与反应制备完全分隔开，均为减少污染危险的预防措施。若只进行为分析PCR所需最少周期亦使稀少污染模板被扩增的机会减少到最低限度。为检测潜在的污染需要一组无

DNA 模板的“空白”反应。在遗传分型中，被污染的标本常为有 2 个以上等位基因的基因分型结果所识别出（参见第16章和第17章）。

PCR像重组 DNA 技术一样，对分子生物学的基础和诊断两方面均有巨大影响，因为它能由少量的复杂模板产生大量的特异性DNA 片段。重组DNA 技术，创造了分子克隆（将特异性序列插入载体，再把它导入宿主细胞），而赋予特异性序列复制的能力。PCR 代表一种“试管内克隆”类型，它可在一个简单的自动化反应中生成并修改一定长度和序列的 DNA 片段。

在分子生物学早期，令人兴奋的日子里，Erwin Chargaff 有一次把它描绘为“无执照的生物化学实践”。在过去的30年间，分子生物学奇迹般的成功显示甚至在缺乏确定的理论基础的情况下也可能取得显著的进展。分子生物学迅速发展的一个因素是它容纳新技术而后者的应用却又使得积极的研究新问题成为可能。PCR 已促进了生物学研究很多不同领域的分子分析；由于 PCR 扩增作用的简便易行，可以说：分子生物学的实践毋须执照。可以期望，未来的实践者继续开拓这一有效技术新的应用并不断使之完善。

(田 丁译)

REFERENCES

1. Mullis, K.B., and Faloona, F.(1987)*Meth.Enzymol.*155 : 335.
2. Mullis, K.B., Faloona, F., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., and Erlich, H.A. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51 : 263-273.
3. Saiki, R., Scharf S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H.A., and Arnheim, N(1985) *Science* 230: 1350.
4. Saiki, R. K. , Bugawan, T. L., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A.(1986)*Nature* 324: 163.

5. Embury, S. H., Scharf, S. J., Saiki, R. K., Gholson, M. A., Golbus, M., Arnheim, N., and Erlich, H. A. (1987) *New Engl. J. Med.* 316: 656.
6. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S., Higuchi, R. H., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) *Science* 239: 487.
7. Scharf, S. J., Horn, G. T., and Erlich, H. A. (1986) *Science* 223: 1076.
8. Jeffreys, A. J., Wilson, V., Neumann, R., and Keyte, J. (1988) *Nucl. Acids Res.* 16: 10953-10971.
9. Goodnow, M., Huet, T., Saurin, W., Kwok, S., Sninsky, J., and Wain-Hobson, S. (1989) *J. Acquired Immune Deficiency Syndromes*, in press.
10. Tindall, K. R., and Kunkel, T. A., (1988) *Biochem.* 27: 6008-6013
11. Keoharong, P., Kat, A., Cariello, N. F., and Thilly, W. G. (1988) *DNA* 7: 63-70.
12. Bugawan, T. L., Saiki, R. K., Levenson, C. H., Watson, R. M., and Erlich, H. A. (1988) *BioTechnology* 6: 943.
13. Li, H., Gyllenstein, U. B., Cul, X., Saiki, R. K., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1988) *Nature* 335: 414.
14. Lench, N., Stanier, P., and Williamson, R. (1987) *Lancet* 11: 1356-1358.
15. Shibata, D. K., Martin, J. W., and Arnheim, N. (1988) *Cancer Res.* 48: 4564-4566.
16. Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F., and Erlich, H. A. (1988) *Nature* 332: 543

1 PCR的设计与优化

R K Saiki

引言

聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)建立几年来就已成为应用非常广泛的研究技术^[1-3]。象PCR技术本身一样,应用该技术从事研究的人数也呈指数性增长,而且,随着PCR技术应用到分子生物学以外的领域,应用该技术的人数在近期仍将不断增加。PCR技术迅速普及的主要原因是该技术简单易学,成功率高。简单说来,PCR技术仅仅涉及到以下几个过程:DNA样品,寡核苷酸引物、4种脱氧核苷三磷酸以及耐热的Taq DNA聚合酶在合适的缓冲体系中混匀;然后反复的加热和冷却该反应液数小时直到得到所需要的扩增量。

实际上,PCR技术是比较复杂的、而且,迄今还没有完全了解的生化过程。反应体系中几种成份的反应不断变化着的相互作用动力学决定扩增产物的质量。尽管在大多数情况下,PCR可以得到好的结果,但是为了得到更好的扩增效果或当扩增完全失败时,有一些参数仍可研究改进。本章将对其中一些参数进行讨论,也包括对PCR的设计和执行方面的某些规则。

“标准”反应体系

由于PCR已应用到许多方面,因此,不可能提供一套保证所有情况下都可成功的。尽管这样,下面描述的反应条件将会对大多数PCR扩增都有效,而且即使在某些情况下该反应条件无效,也可以作为进行其他改进的起点。

标准PCR反应体积为50或100 μ l。除了DNA样品外，反应体系还包含50mM KCl, 10mM Tris·HCl (室温下pH为8.4), 1.5mM MgCl₂, 100 μ g/ml白明胶, 每种引物0.25 μ M, 每种脱氧核苷三磷酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 0.2mM, TaqDNA聚合酶2.5u。当然, DNA样品可以是各种各样的, 但通常模板DNA应当为10²到10⁵拷贝(如0.1 μ g的人基因组DNA)。反应液表面加几滴矿物油以封闭反应体系和防止液体蒸发。

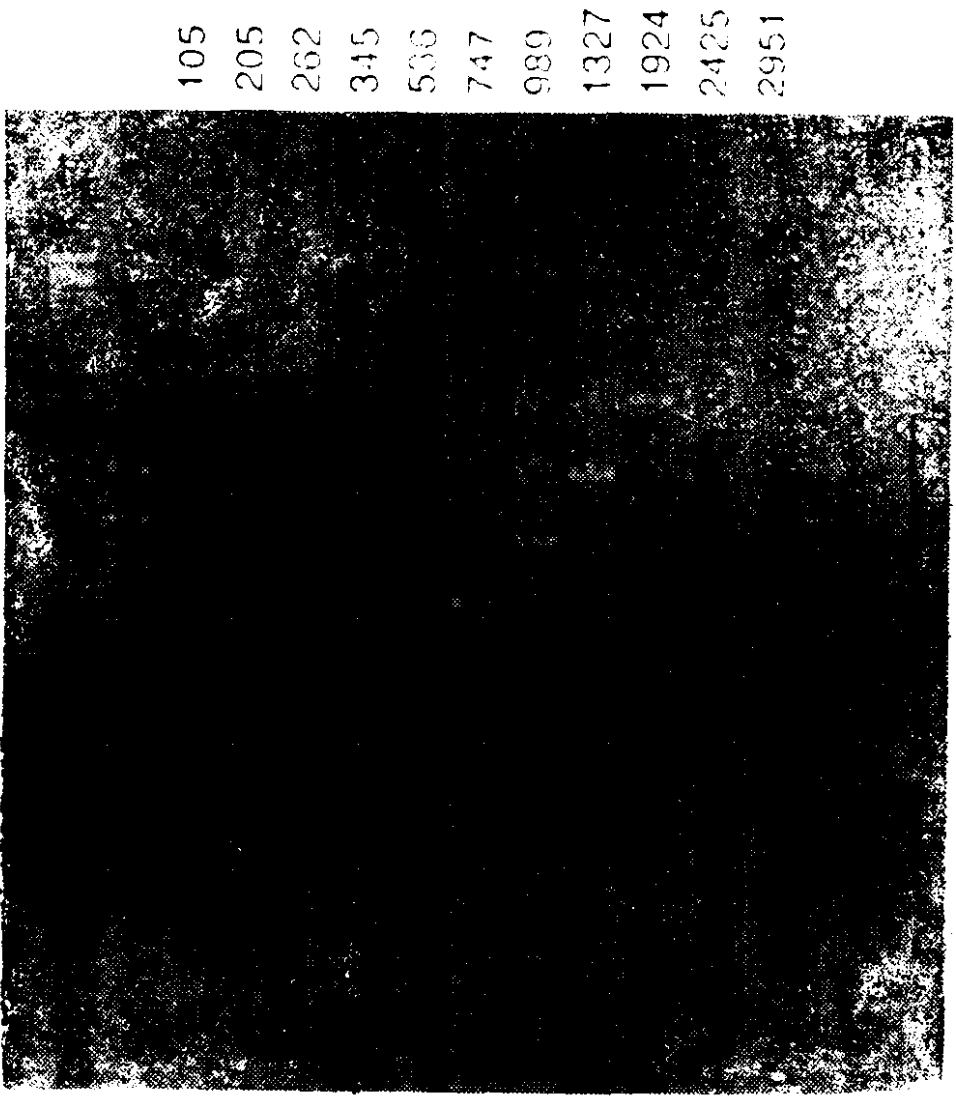


图1-1.150—2951 bp β -珠蛋白基因片段的扩增。100 μ l反应液中含有标准缓冲液, 每种 dNTP 200 μ M, 每种引物250nM, 100ng 的人基因组DNA, 和 2.5 μ l的Taq聚合酶 (Perkin Elmer/Cetus)。将该反应体系进行30次循环扩增。取2 μ l样品作1.6%琼脂糖凝胶电泳, EB染色后观察结果。产物的长度在上方注明。分子量标志是BstE I 水解的入噬菌体(500ng)和Hae I 水解的 ϕ × 174-RF(250ng)。

应用 Perkin Elmer/Cetus 公司生产的DNA温度循环装置 (DNA Thermal Cycler) 进行PCR扩增非常方便。应用机器上的“Step-Cycle”程序使反应体系在94℃下变性20秒, 55℃下退火20秒, 72℃下聚合延伸30秒, 共循环30次。(Step-Cycle 程序可以使机器尽快升到或降到所需要的温度, 目前市售机器每秒可升高0.3℃或降低到1℃, 这样, 每次循环所需要的总时间大约3.75分钟)。

上述条件对大多数目的序列的扩增都有很好的特异性(图1-1)。对于用上述条件扩增不理想的情况, 下面要讨论的是提高PCR扩增的一些方法。

引物的选择

不幸的是, 有效和特异的引物的选择仍然凭经验。还没有一套规则可以保证合成一对有效的引物。然而, 正是引物比其他条件更决定扩增反应的成功与否。有幸的是, 大多数引物都能有效地进行扩增。下面几点将有助于进行引物设计。

1. 如果可能的话, 尽量选择碱基随机分布和GC含量与要扩增的片段相似的引物。避免含有一段多聚嘌呤, 多聚嘧啶或其他不寻常序列的引物。

2. 避免在引物中有明显的二级结构, 尤其在引物的3'端。威斯康辛大学的Squiggles 或Circles 计算机程序对于揭示这种结构很有用。

3. 避免引物之间存在互补性, 特别是应避免引物在3'端有互补现象, 这样可以减少引物二聚体的形成(见下文)。

有时, 引物的选择受到限制, 譬如, 只有有限的序列是已知的。在这种情况下, 就用这已知序列相应的引物尝试也是很值得的。上述几点只是增加任何一对引物能正常起作用的机会, 但不是绝对必需的。

大多数引物长20-30个碱基，PCR扩增反应中引物的最适量不是固定的。较长的引物也可以合成但常不需要。引物的5'端可以加上与模板不互补的序列，这段外源序列便参入双股PCR产物中，这样，就可以将限制性内切酶位点或调节序列(如启动子)接在扩增的靶序列的两端^[4,5]。如果需要的话，可以用较短的引物或简并性引物，但是，这要调整反应时的温度，因为短引物与模板配对更为不稳定。(对于高简并性的引物，最好将肯定无疑的序列放在引物的3'端，甚至可以合成一系列引物，这些引物的3'端序列都是不变的)。一般说来，每种引物的浓度在0.05~0.5 μ M之间都是可以的。

“引物二聚体 (Primer Dimer)”是在PCR产物中经常见到的扩增产物，特别是在模板的原始拷贝数很低，而扩增循环次数又较多时。这是一种双链DNA片断，其长度很接近两种引物之和。它的产生像是一引物被DNA聚合酶在另一引物上延伸所致。这样形成的多联体是非常有效的PCR模板，如果发生在早期PCR循环的话，可以很快成为主要的PCR产物。

引物二聚体形成的确切机制还没有完全搞清。已经观察到两种引物如果3'端互补的话，便容易出现引物二聚体，这表明两种引物的暂时相互作用将其末端带到一起可能是二聚体形成的起因^[6]。几种聚合酶，包括Taq，已证明具有比较弱的非模板指导的聚合作用，这种作用可以将核苷酸添加到DNA双链的平端^[7,8]。如果酶的这种活性对单链寡核苷酸也起作用的话，很有可能，一引物的这种延伸便在3'端和另一引物形成短的重迭，这样便足以促成二聚体的形成。无论怎样，如果引物二聚体成为PCR反应的障碍，它们可因应用最低量的引物和酶而来减少些。

最后，尽管大多数引物都能进行不同程度的扩增，偶尔有些合成的引物完全不能放大其靶序列。这种现象的原因尚不清楚，但是，在许多情况下，只要将引物的位置左右移动几个碱基便可解决问题。