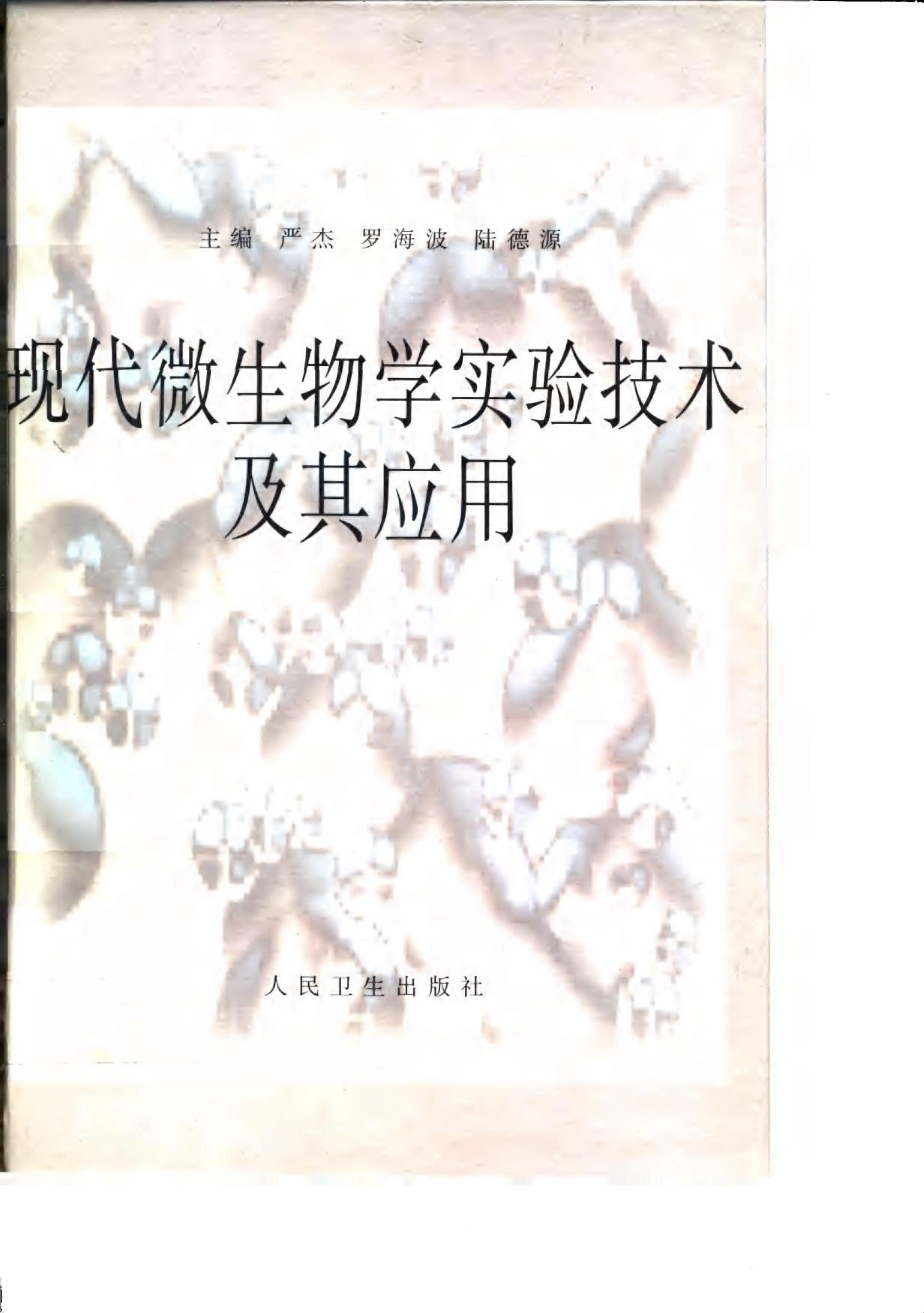




主编 严杰 罗海波 陆德源

现代微生物学实验技术 及其应用

人民卫生出版社

现代微生物学实验技术及其应用

主 编

严 杰 罗海波 陆德源

副主编

陆森泉 陈莉丽 周丽萍 石元和

编 者 (以章节先后为序)

陆森泉	罗海波	严 杰	邵靖宇	应英华
李 巍	周丽萍	包其郁	陈启琪	罗安东
罗耀东	石元和	程 浩	陆德源	项 峭
朱永良	程东庆	林 洁	张丽民	盛 鹏
高 平	朱 平	陈莉丽	仇可夫	林志红
任 恕	潘振业	陈天培		

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

现代微生物学实验技术及其应用/严杰等主编. —北京: 人民
卫生出版社, 1997

ISBN 7-117-02648-0

I. 现… II. 严… III. 微生物学-实验-技术 IV. Q93-33

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (97) 第 06358 号

现代微生物学实验技术及其应用

严 杰 罗海波 陆德源 主编

人民卫生出版社出版发行
(100050 北京市崇文区天坛西里 10 号)

三河市富华印刷厂印刷

新华书店经销

787×1092 16 开本 19 印张 443 千字
1997 年 10 月第 1 版 1997 年 10 月第 1 版第 1 次印刷
印数: 00 001—4 000

ISBN 7-117-02648 -0/R • 2649 定价: 28.50 元

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

前 言

随着现代医学科学的进步,各种新技术、新方法已迅速地各个学科中得到了广泛应用。医学微生物学是一门“古老”的学科,近年来也获得突飞猛进的发展。综观医学微生物学研究工作的现状,对病原体的分类、毒力、鉴定与检测以及致病机理的研究,不再局限于动物实验与细胞水平,已逐步深入至分子与基因水平,各学科的交叉和渗透在现代医学微生物学中也得到了充分的体现。然而,目前,系统地反映这方面的专著在国内尚不多见。

本书旨在介绍与微生物学研究工作有关的、较成熟的新技术、新方法,诸如多聚酶链反应、大分子物质的分离与纯化、色谱技术、核磁共振技术、高速与超速离心、电镜技术、冰冻蚀刻、蛋白质交联技术、细胞免疫功能的检测、微量免疫检测技术、细菌DNA G+C mol%测定、生物传感器以及无菌动物饲养等,书内除介绍具体操作方法外,还阐述了试验的基本原理与注意事项,以供参考。

为了方便从事于医学、兽医学及生物系的微生物学专业教师、研究人员和研究生的研究工作,我们将此等新技术、新方法进行了精选、整理、修改,并掺入作者使用这些新技术、新方法的成功经验与失败教训,编写了《现代微生物学实验技术及其应用》一书。

作者等才疏学浅,在执笔时虽谨慎行事,诚恐舛误仍所难免,深望前辈、同道及广大读者指正。

编者

1995年劳动节于西子湖畔

12/1/23

目 录

第一章 基因克隆与多聚酶链反应.....	(1)
一、基因克隆.....	(1)
二、多聚酶链反应.....	(3)
三、多聚酶链反应在微生物学领域中的应用.....	(8)
第二章 大分子物质的分离与纯化	(17)
一、蛋白质的分离与纯化	(17)
二、核酸的分离与纯化	(28)
三、多糖的分离与纯化	(35)
第三章 细菌的质粒谱	(44)
一、质粒的命名及 InC 分群	(44)
二、毒力相关性质粒、耐药质粒及转座子	(46)
三、F 质粒和 Col 因子	(49)
四、质粒指纹图谱分析	(50)
五、细菌质粒的电镜观察	(56)
六、质粒的转移试验	(57)
七、质粒的消除实验	(60)
八、基因探针技术在质粒检测中的应用	(60)
九、质粒在遗传工程中的应用	(60)
第四章 色谱技术及应用	(63)
一、概述	(63)
二、色谱原理	(64)
三、气相色谱法	(65)
四、应用举例	(74)
五、色谱在微生物学中应用的展望	(77)
第五章 核磁共振技术	(79)
一、概述	(79)
二、基本原理与核磁共振仪的结构	(79)
三、应用	(82)
第六章 高速及超速离心技术	(89)

一、离心机的分类、基本结构及辅助设备	(89)
二、离心过程中的基本力学关系	(92)
三、主要的制备离心技术	(95)
第七章 电子显微镜技术	(101)
一、概述	(101)
二、透射电镜的构造与原理	(101)
三、扫描电镜的构造与成像原理	(104)
四、透射电镜生物样品制备方法	(106)
五、扫描电镜生物样品制备方法	(117)
第八章 冰冻蚀刻技术	(124)
一、冰冻蚀刻技术的原理和特点	(124)
二、冰冻蚀刻仪器	(124)
三、冰冻蚀刻技术的操作程序	(124)
四、冰冻蚀刻膜面的辨认	(126)
五、冰冻蚀刻免疫电镜技术	(127)
第九章 蛋白质交联技术	(128)
一、交联方法的选择	(128)
二、交联反应中可利用的化学基团	(129)
三、交联反应的类型	(130)
四、交联反应的实例	(137)
五、交联物的纯化与鉴定	(140)
第十章 细胞培养及其在微生物学中的应用	(142)
一、实验室设计及设备	(142)
二、细胞培养的基本条件	(144)
三、细胞培养常用器材及液体的准备	(146)
四、细胞培养方法	(148)
五、细胞培养在临床病毒学的应用	(153)
第十一章 细胞免疫功能的检测	(159)
一、T 细胞亚群的测定	(159)
二、K 细胞活性的测定	(161)
三、NK 细胞活性的检测	(164)
四、白细胞介素 1 活性的测定	(166)
五、白细胞介素 2 活性的测定	(168)
六、肿瘤坏死因子活性的测定	(171)

第十二章 免疫酶技术	(173)
一、概述	(173)
二、标记物的制备	(174)
三、酶底物的制备	(179)
四、检测方法	(180)
五、应用实例	(181)
第十三章 放射免疫分析	(184)
一、放射免疫竞争抑制反应的原理、建立放射免疫的条件与常用方法	(184)
二、放射免疫分析类型	(186)
三、放射性标记化合物的概述	(186)
四、放射性化合物的制备	(187)
五、抗体效价及最佳稀释度的选择	(188)
六、应用举例	(189)
第十四章 免疫荧光技术	(191)
一、概述	(191)
二、免疫荧光技术分析的必备条件	(191)
三、荧光抗体的标记	(192)
四、免疫荧光技术的应用举例	(194)
第十五章 免疫电镜技术	(196)
一、免疫电镜的基本原理	(196)
二、免疫电镜技术的操作程序	(197)
三、透射电镜免疫标记技术	(200)
第十六章 化学发光标记及发光免疫测定法	(206)
一、概述	(206)
二、一般化学发光原理	(207)
三、化学发光标记技术	(207)
四、发光免疫分析法	(210)
五、酶标发光增强技术	(213)
六、结束语	(214)
第十七章 免疫胶体金标记技术	(217)
一、概述	(217)
二、胶体金的制备	(217)
三、胶体金标记探针的制备	(220)

四、关于免疫胶体金标记样品的固定.....	(224)
五、免疫胶体金标记的应用方法.....	(225)
第十八章 时间分辨荧光测量技术	(234)
一、概述.....	(234)
二、TRF 的基本原理	(234)
三、Eu ³⁺ 标记化合物的制备	(235)
四、TRF 在微生物学领域的应用实例	(238)
第十九章 电泳技术	(242)
一、凝胶电泳的一些基本理论.....	(242)
二、电泳在微生物学实验中的意义.....	(244)
三、电泳前微生物标本的处理.....	(245)
四、凝胶电泳法.....	(248)
五、电泳中的其它问题.....	(258)
第二十章 细菌 DNA G+C mol% 的测定	(261)
一、原理.....	(261)
二、细菌 DNA 的提取	(261)
三、细菌 DNA 的 G+C mol% 测定	(262)
四、G+C mol% 在细菌分类鉴定中的应用	(266)
第二十一章 生物传感器及其在生物医学中的应用	(269)
一、概述.....	(269)
二、换能器.....	(269)
三、生物传感器.....	(276)
四、几种用于微生物学实验的生物传感器.....	(280)
五、用于微生物测定的新型传感器发展趋势.....	(285)
第二十二章 无菌动物饲养与应用	(288)
一、无菌动物概论.....	(288)
二、无菌动物的维持和生产.....	(289)
三、无菌动物的若干形态学特征.....	(294)
四、无菌动物的应用.....	(295)

第一章 基因克隆与多聚酶链反应

一、基因克隆

基因克隆技术又称 DNA 分子的无性繁殖,是用人工的方法将某一生物的基因与载体 DNA 进行重组,然后引入另一种宿主细胞内。被引入的外源性基因在宿主细胞的 DNA 复制酶系统的催化下复制,从而无性繁殖基因,并在宿主细胞中大量合成由该基因编码的蛋白质或多肽产物。基因克隆技术具有重要的应用价值,如分离和纯化某些特定基因、研究基因的结构、表达和调控,以及用于改造生物,生产对人类有用的新品种或新物种。

DNA 分子克隆的基本过程包括:制备目的基因、体外构建重组 DNA、重组 DNA 分子转入宿主细胞、重组克隆的选择以及基因表达产物的纯化^[1~6]。

(一) 目的基因的制备

主要有三种方法:

1. 人工合成 用化学方法(常用固相磷酸三酯法)在 DNA 连接酶催化下人工合成脱氧寡核苷酸。目前多应用 DNA 人工合成仪,其合成效率极高,平均 4~5 min 便可延长一个核苷酸长度。

2. 逆转录法 鉴于目的基因较长,人工合成工作量过大,同时也不易从组织中分离基因,则可用逆转录法合成。先自组织中制备 mRNA,以此为模板用 oligo(dT) 为引物,在逆转录酶催化下合成互补的单链 DNA(ss-cDNA)。然后用硷水解除去 mRNA,并以 ss-cDNA 为模板,在 DNA 聚合酶催化下合成互补双链 DNA(ds-cDNA)。最后用 S_1 -核酸外切酶切去发夹结构和单链结构。再与载体 DNA 重组,转化细菌制成 cDNA 基因库,并以合适的探针从 cDNA 基因库中分离带有所需要 cDNA 的克隆。

3. 从染色体 DNA 中分离 由于用逆转录法合成 ds-cDNA,其长度受一定限制,因此分子量较大的基因必须从染色体 DNA 中分离获得:首先制备核内大分子的染色体 DNA,用限制性内切酶将其水解,然后选择所需的 DNA 片段与载体 DNA 重组,转化宿主细胞制成基因库,再用合适的探针作分子杂交,从基因库中分离出含目的基因的克隆。

(二) 构建重组 DNA

外源性目的基因必须与合适的载体相连接,否则难以进入受体细胞;即使能进入,一般也不能进行复制和功能表达。因为所分离的外源 DNA 一般不带有复制控制系统和在新的受体细胞中实现功能表达的调控系统。

1. 常用载体 DNA 的形式

(1) 细菌质粒:目前用作基因克隆的质粒载体,通常均由天然质粒经过 DNA 重组改装的,目的是使其具备下述较理想的特点:①具有多个单切口核酸内切酶位点。外来

DNA 片段可以插入此切口形成重组质粒,但不影响重组质粒的复制和转录;②带有药物选择性基因作为遗传标记,从而可以将转化成功的宿主细胞轻而易举地挑选出来;③在细菌内有较多的复制拷贝数。最常用的质粒载体有 pBR322、puc8、puc9、……puls 等,能运载数百个、乃至数千个 bp 的外源性 DNA 片段。

(2) 病毒:λ 噬菌体是最早使用的克隆载体,其基因组是一长度约为 50kb 的双链 DNA 分子。在 λ 噬菌体颗粒中,该 DNA 为线性双链分子,两个 5' 末端均由 12 个碱基组成的单链互补粘性末端。该 12 个碱基组成的末端称为 cos 位点。在 λ 噬菌体基因组中位于左边的基因 (A-J) 编码噬菌体头部和尾部蛋白质。中间的基因 (J-N) 与重组和溶源生长过程有关,但与裂解生长过程无关,因此对裂解生长过程而言,中间区的 DNA 是非必需的,故可被缺失或置换,可以在此区域克隆外源性 DNA。位于右边的基因涉及 λ 基因表达的调节、产生溶源性、DNA 合成、晚期功能调节以及宿主细胞裂解等。当 λ 噬菌体进入宿主细胞后,其粘端通过碱基配对而结合成环状分子,相隔 12bp 有两个交错切口。宿主体内的 DNA 连接酶迅速将切口封闭而成环状 DNA 分子,该 DNA 分子在感染早期充当转录模板。在 λ 噬菌体基因组 DNA 中含有许多常用限制酶的多个酶切位点,这些酶切位点常位于病毒基因组中对病毒裂解性生长必不可少的区域中,且 λ 噬菌体颗粒不能容纳比其本身基因组大得多的 DNA 分子,因此只适合作小片段外源性 DNA 的载体。上述特点似乎限制了 λ 噬菌体作为载体 DNA 的应用前景。但是通过在 λ 噬菌体基因组中改造限制性酶切位点,如去除多数 EcoR I 切口,已在体内筛选出在病毒基因组非必需区带 1~2 个 EcoR I 位点的突变株。当其 DNA 用 EcoR I 处理后,外来 DNA 便可重组于 EcoR I 切口,如重组的 DNA 长度合适,即组装成病毒颗粒。随着病毒的增殖、溶菌,则形成噬斑。当噬菌体 DNA 被切去一段 DNA 后不与外源 DNA 重组,或外来 DNA 片段过大或过小,使重组 DNA 太长或太短,均不能与外壳蛋白质形成病毒颗粒,就不形成噬斑。此外,还用人工方法构建了许多其它 λ 噬菌体载体,可以接纳并增殖用各种内切酶切成的外源性 DNA 片段。只有一个限制酶切位点可供插入外源 DNA 的载体称为插入型载体;在可被外源 DNA 置换的 λ 噬菌体 DNA 非必需区的两侧有一对限制性酶切位点的载体则称为置换型载体。

M₁₃ 是一种丝状噬菌体,有长为 6407 个核苷酸的闭合环状 DNA 基因组。当噬菌体感染大肠杆菌后单链 DNA 能转变成双链的复制型 DNA。M₁₃ 并不杀死所感染的宿主细胞,每个细胞的拷贝数可达 100~200 个。M₁₃ 基因组中有一 507 个核苷酸的非必需区,称为 IS 区,该区可接受外源性 DNA 的插入而不影响噬菌体的增殖。由 M₁₃ 噬菌体改造而成的重组载体有 M₁₃mP7、M₁₃mP8、M₁₃mP9 至 M₁₃mP18、M₁₃mP19 等一系列。它们感染大肠杆菌后,可在细菌内复制,形成双链复制型 DNA,约含 7230bp,在细菌内复制拷贝数可达 200 以上。改造后的 M₁₃ 含有 EcoR I、BamH I、Sal I、Acc I、Pst I、Hind III、Hinc II 等多个单切口核酸内切酶位点,该区域位于 β-半乳糖苷酶基因中。由于 β-半乳糖苷酶可以由异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导产生,使生色底物 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷 (x-gal) 形成蓝色化合物,故 M₁₃ 噬菌体在含有 IPTG 和 x-gal 的培养基上形成蓝色噬斑。当外来 DNA 插入上述任何一个位点后,感染细菌就不能产生半乳糖苷酶,在培养基中形成无色噬斑。故可根据噬斑颜色来挑选重组噬菌体。由上述方法构建的重组 DNA 并不能在真核细胞中无性繁殖。外源基因在真核细胞中无性繁殖的病毒载体有

SV₄₀病毒、人类腺病毒、牛乳头瘤病毒、痘苗病毒等。

(3) 考斯质粒：是 λ 噬菌体 cos 部位约 20 至几百碱基的序列与质粒的重组体。其中还组合了多种单一的限制性核酸内切酶的位点。其优点是：①可以插入含 20-45kb 的大片段外源 DNA，有利于研究真核细胞基因；②如同 λ 噬菌体，能在体内进行组装，感染大肠杆菌后能大量复制增殖。在有氯霉素存在时，重组 DNA 扩增量可达到细菌总 DNA 量的 50% 左右。

2. 基因片段与载体的连接方法

(1) 粘性末端连接法：以相同的内切酶切割的基因片段和 DNA 载体线性片段具有相同的粘端，各粘端的碱基互补，可以形成氢键而粘合。同时在连接酶作用下，由 ATP 供给能量可形成 3'-5' 磷酸二酯键。为了避免基因片段或线性 DNA 载体自身的 3' 端与 5' 端之间形成磷酸二酯键，应该用两种不同内切酶切割 DNA，使 DNA 两端带有不同的粘性末端。或使用细菌或小肠粘膜的硷性磷酸酶切除载体 5' 端磷酸，并掌握 DNA 的克分子浓度，以避免或减少线性载体 DNA 分子自身环化。

(2) 钝性末端连接法：无论目的基因片段的钝性末端与载体 DNA 的钝性末端是否相同，均可在连接酶作用下形成磷酸二酯键而进行重组。但钝性末端连接时所需的 DNA 片段的克分子浓度及所消耗的 ATP 均高于粘性末端连接法。而且此法的连接效率也较低。由于钝性末端内切酶常不能形成真正的平头末端，故可用 S₁-核酸外切酶修整钝性末端，或以 DNA 多聚酶修补钝性末端，使形成平头后再行连接，则可提高重组率。

(3) 钝性末端连接人工合成的接头：例如在 DNA 片段分别连接人工合成的 EcoR I 接头和 Hind III 接头，以 EcoR I 和 Hind III 切割后，再与具有相同末端的载体 DNA 连接。

(4) 同聚物末端连接法：在 DNA 多聚酶末端转移酶的催化下，于 DNA 片段的 3' 羟基末端接上 dc—同聚物或 dA—同聚物，于载体 DNA 3' 羟基末端接上 dG—同聚物或 dT—同聚物。使末端均已同聚物化的 DNA 片段与载体之间通过碱基配对而发生重组，重组时并不需要连接酶参与。

(三) 重组 DNA 分子转入宿主细胞

根据不同的载体，选择不同的宿主细胞和不同的转入途径。分子克隆时常用的宿主细胞有大肠杆菌、酵母菌，乃至动物细胞。采用的转入途径有转化、转染或转导，如果选用较大的动植物细胞作宿主，也可用注射的方法。将重组质粒 DNA 转入受体细胞称转化，将重组噬菌体或重组病毒 DNA 转入受体细胞称为转染。在低温条件下用 Ca⁺⁺ 处理宿主细胞使细胞膜通透性改变，或在细胞膜上电打孔等，促使重组 DNA 分子进入宿主细胞，并在细胞内复制、转录和翻译。且可以稳定地传给新的下一代细菌，即重组 DNA 分子在宿主细胞内定居，并达到无性繁殖的目的，至此克隆方算完成。

(四) 重组体克隆的筛选与鉴定

以遗传学方法、免疫学方法或核酸分子杂交方法从大量携带重组体 DNA 分子的宿主细胞中分离出携带目的基因的细胞并鉴定之。

二、多聚酶链反应

多聚酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 是一种模拟天然 DNA 复制过程，在

体外扩增特异性 DNA (或 RNA) 片段的新技术, 又称为无细胞分子克隆技术。本技术以待扩增的两条 DNA 链作为模板, 由一对人工合成的寡核苷酸引物介导, 以 dNTP 为底物, 通过 DNA 多聚酶酶促反应, 于体外快速扩增特异性 DNA 序列。一般样品经 2~4 h (20~30 周期) 后, DNA 片段可扩增百万倍以上。然后采用其它的核酸分子检测手段, 从极微量的样品中获得足够 DNA 供分析研究之用, 检出灵敏度可达 10^{-5} pg, 是最灵敏、可靠的现代分子生物学技术之一, 其重要性不亚于限制性核酸内切酶的发现和 Southern 印迹的建立。目前, PCR 技术已被广泛用于以下实验: ①直接扩增检测目的 DNA, 或通过逆转录酶反应检测目的 RNA; ②扩增特定的 DNA 片段进行基因重组或产生特异性核酸探针; ③进行 DNA 测序及基因定位分析; ④通过诱变寡核苷酸引物产生各种突变体; ⑤分析基因组 DNA 的多态性; ⑥从少量 mRNA 或基因组 DNA 中构建 cDNA 文库或基因组文库等^[2,7~9]。

(一) 基本条件

PCR 操作必需具备以下基本条件:

1. 模板核酸 (DNA 或 RNA, 但 RNA 的扩增需先逆转录成 cDNA 后才能进行)。
2. 特异性寡核苷酸引物。
3. 耐热 DNA 聚合酶。
4. 4 种三磷酸脱氧核苷酸 (dNTPs)。
5. 合适的缓冲体系。
6. 镁离子 (Mg^{++})。
7. 温度循环参数 (变性、复性和延伸时的温度与时间, 以及循环数)。

PCR 的特异性是由两条人工合成的寡核苷酸引物所决定。所谓引物即为与待扩增的 DNA 片段两翼互补的寡核苷酸, 本质系 ss DNA 片段。

(二) 主要步骤

PCR 过程大致可分下列步骤:

1. 模板 DNA 变性 在 $90^{\circ}\text{C} \sim 95^{\circ}\text{C}$ 的高温加热下, 靶 DNA 变性, 双链解离成为两条单链, 这两条链均可成为杂交的模板。

2. 模板 DNA 分子与互补引物结合 在确定了模板 DNA 的特异顺序之后, 按照 DNA 双链间碱基互补配对原则, 设计并合成两段与各自 DNA 双链 3' 端互补的寡核苷酸作为引物。在反应体系中, 如上所述温度升高时模板 DNA 解链, 当温度降低时, 两种引物分别与变性后的正、负股 DNA 链互补结合, 称为复性或退火。

3. 引物的延伸 结合于模板上的引物, 在 DNA 聚合酶催化下, 利用反应体系中的 4 种 dNTPs 为原料, 按碱基对互补的方式延伸, 分别合成两条新的 DNA 链。由于新扩增的 DNA 片段的长度被与模板结合的两个引端之间的距离所限定, 故新扩增的产物为“短片段”, 并非完整的靶 DNA 模板。但具有所扩增模板 DNA 的特异性序列, 并与靶 DNA 一样参与下一个反应循环。

上述反应过程是由温度所控制, 这种热变性—复性—延伸的过程就是一个 PCR 循环。从理论上讲, DNA 扩增产量呈指数上升, 即 n 个循环后产物产量应为 2^n 拷贝, 经过

30 个循环后,靶 DNA 可增加 100 万倍。但实际反应中由于受多种因素影响,不可能达到理论值。PCR 扩增产物,根据检测目的需要,可选用琼脂糖凝胶电泳法以溴化乙锭直接染色,或用核酸分子杂交技术加以检测。

(三) PCR 的优化

一般 PCR 的操作程序基本相同,只是根据引物与靶序列的不同,应选择不同的反应体系与循环参数。故在每一具体反应操作前必须对 PCR 各种参数进行优化。

1. 引物 PCR 扩增产物的大小由特异性引物所限定,因此引物的设计和合成至关重要。引物浓度一般以 $0.2 \sim 0.5 \mu\text{mol/L}$ 较理想。当浓度低于 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 时产量明显降低。但引物浓度太高可促使错误引导及非特异性产物积累,并增加形成引物二聚体的机会。非特异性产物和引物二聚体也是 PCR 反应的底物,可以与靶序列竞争 DNA 聚合酶和 dNTPs 等,从而减少特异性扩增产物。按照下述简单法则有助于设计有效引物:

(1) 典型的引物应该是 G+C 含量为 50%~60% 的长度为 18bp~28bp 的寡核苷酸序列。 T_m 值是寡核苷酸的解链温度,即在一定盐浓度下 50% 寡核苷酸双链解链的温度,按公式 $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ 计算,有效引物的 T_m 值应为 $55 \sim 80^\circ\text{C}$,一般以 T_m 值接近 72°C 为最佳复性条件;

(2) 引物中 4 种硷基应随机分布,避免出现单一硷基重复序列。尤其在 3' 端不应有超过 3 个连续的 G 或 C,否则会使引物在富含 G+C 序列区段发生错误引导;

(3) 引物自身不应存在互补序列,以免引物自身折叠成发夹状结构或引物本身复性;

(4) 两个引物之间也不应该有互补性序列,尤其要避免 3' 的互补重叠以免形成引物二聚体;

(5) 引物的 3' 不能进行任何修饰。一般在引物 3' 端最好选 T,不要选 A、G 和 C。

2. 酶浓度 当其它参数均已优化时,PE-Cetue 公司出品的 Taq DNA 聚合酶的浓度以 $100 \mu\text{l}$ 反应物中加 $1 \text{ u} \sim 2.5 \text{ u}$ (比活性为 20 u/p mol) 为佳。但根据靶模板 DNA 或引物的不同,所需酶浓度也可适当增减,故在优化 PCR 时,最好在 $100 \mu\text{l}$ 反应物中加入 $0.5 \text{ u} \sim 5 \text{ u}$ 范围的酶量,以试验出最佳酶浓度。酶量过量可在凝胶电泳中出现非特异性扩增带;而酶量过少,则可使目的产物产量过低。不同厂家出品的 Taq DNA 聚合酶活性有一定差别,一般以采用厂家所推荐的用量。

3. 三磷酸脱氧核苷酸 (dNTP) 贮备的 dNTP 溶液应以 NaOH 调整 pH 至 7.0,并用分光光度计测定其浓度。贮备原液浓度应稀释至 10 mmol/L ,分装后于 -20°C 保存。工作时的贮备液浓度以每种 dNTP 为 1 mmol/L 为宜。在 PCR 重复循环过程中,dNTP 的稳定性应在 50 个循环后仍保留有 50% 的 dNTP 形式。当 PCR 中各种 dNTP 的终浓度为 $20 \mu\text{mol/L} \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 时,PCR 的产物量、特异性和忠实性处于最佳平衡状态。反应中 4 种 dNTP 的当量数应该相同,以减低错误掺入率。低浓度的 dNTP 可减少在非靶位点的错误引导及减少延伸时 dNTP 的错误掺入,从而提高扩增准确性。通常可根据靶序列的长度和硷基组成来确定最低的 dNTP 合适浓度。一般在 $100 \mu\text{l}$ 反应体积中,各种 dNTP 浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 时,理论上足以合成 $2.6 \mu\text{g}$ DNA,或 1 pmol 的 400bp 序列。

4. 镁离子 在 PCR 中优化镁离子浓度非常有益,因为它可影响引物退火程度、模板与 PCR 产物链的解离温度、产物的特异性、引物二聚体的形成、以及酶的活性和忠实性

等。 Mg^{2+} 浓度过低时,酶活力显著降低;过高时则酶可催化非特异性扩增。Taq DNA 聚合酶所需要的是游离 Mg^{2+} 。由于反应物中的 DNA 模板、引物以及 dNTP 的磷酸基团均能与 Mg^{2+} 结合而使实际 Mg^{2+} 浓度下降,故在 PCR 中加入的 Mg^{2+} 应该比 dNTP 浓度高 0.2 mmol/L~2.5 mmol/L。对每种 DNA 模板与每种引物均应进行 Mg^{2+} 浓度的优化。在引物贮备液或 DNA 模板中若有 EDTA 或其他螯合物存在,均可以影响游离 Mg^{2+} 浓度。

5. 其它反应成分 目前常用的缓冲体系为 pH8.3~8.8 (20℃) 的 10 mmol/L~50 mmol/L 的 Tris—HCl。Tris 是一种双极性离子缓冲液,其 pKa 值在 20℃ 时为 8.3, ΔpKa 值为 $-0.021/^\circ C$ 。因此在典型 PCR 热循环条件中,20 mmol/L Tris (pH8.3, 20℃) 的实际 pH 值变化于 6.8~7.8 之间。

反应混合物中,KCl 浓度保持在 50 mmol/L 以下有利于引物退火。50 mmol/L 的 NaCl 或超过 50 mmol/L 浓度的 KCl 均可抑制 Taq DNA 聚合酶的活性。以往使用大肠杆菌 DNA 聚合酶 klenow 片段进行 PCR 时,加入二甲基亚砜 (DMSO) 可防止聚合酶提前从合成链上脱落。但 10% 浓度的 DMSO 可使 Taq DNA 聚合酶的活性 50% 遭到抑制,故目前在大多数 PCR 中不推荐使用 DMSO。在反应物中加入小牛血清白蛋白 (100 $\mu g/ml$)、明胶 (0.01%) 或吐温 20 (0.05%~0.1%) 可增加酶的稳定性,但许多 PCR 中不加入附加蛋白质也可获得良好效果。

6. 温度循环参数

(1) 变性温度和时间:PCR 失败的最主要原因可能是靶基因模板和 (或) PCR 产物变性不完全。典型的变性条件是 95℃ 30 s,或 97℃ 15 s。更高的温度也许更有效,特别是对于富含 G+C 的靶基因。当处于链解离温度时 (TSS),DNA 变性只需几秒钟,但是要使反应管内 DNA 真正达到 TSS 尚需一段附加时间。变性不完全可使 DNA 链重新复合 (Snap back),从而降低产物产量。而变性温度太高或时间太长可导致 DNA 聚合酶活性无谓丧失。Taq DNA 聚合酶的半寿期在 92.5℃、95℃ 和 97℃ 时分别为 22 h、40 min 和 5 min。

(2) 引物退火温度和时间:引物退火所需温度、时间取决于扩增引物的碱基组成、长度及浓度。一般所采用的退火温度应该比扩增引物在 PCR 条件下的真实 T_m 值低 5℃。退火温度在 55℃~72℃ 间可产生最佳结果。在典型的引物浓度 (0.2 $\mu mol/L$) 时,退火时间仅需数秒钟。增加退火温度可提高对不正确退火的引物的辨别力,并减少在引物 3' 端错误掺入的不正确核苷酸的错误延伸,因此严格掌握退火温度 (尤其在起始的几个循环中) 有助于提高反应特异性。为了达到最初循环的最高特异性,可于第一步变性后的引物退火阶段方加入 Taq DNA 聚合酶。典型的退火温度和时间是 50℃ 2 min。

(3) 引物延伸温度和时间:延伸时间应取决于靶序列的长度、浓度和温度。引物延伸在 72℃ 进行。不合适的延伸温度不仅影响扩增产物的特异性与产量。72℃ 时,核苷酸的掺入率约为 30~100 核苷酸/s,主要取决于缓冲系统、pH 值、盐浓度和 DNA 模板的性质。一般延伸 1 min 足以扩增 2 kb 的 DNA 片段。延伸时间过长可导致非特异性扩增带的出现。如果早期循环中底物浓度过低,或晚期循环中产物浓度超过酶浓度,可采用较长的延伸时间。典型的延伸反应温度和时间是 72℃ 1~3 min。在扩增反应完成后,通常尚需要有一步长时间的 (10~30 min) 延伸反应,以获得尽可能完整的产物。

7. 循环数 循环数的多少与扩增程度有密切关系。在其它参数均已优化的条件下,

PCR 的最适循环数主要取决于靶序列的初始浓度。实验中常犯的错误是循环数过多,结果增加了非特异性扩增带的积累和复杂性。如果循环数太少,则 PCR 产量就很低。常用的循环数与初始靶浓度之间的关系为:

靶分子数	循环数
3×10^5	20~30
1.5×10^4	30~35
1×10^3	35~40
5	40~45

(四) 平台效应

在扩增反应后期,合成产物量达 $0.3 \sim 1 \text{ pmol}$ 时,由于产物趋于饱和,使原来以指数扩增的反应变成平坦曲线,产物不再随循环次数增加而明显上升,称为平台效应。平台效应与下列因素有关:①底物(dNTP 或引物)已被利用的情况;②反应物(dNTP 或酶)的稳定性;③终末产物(焦磷酸盐、双链 DNA)的反馈抑制;④非特异性产物或引物二聚体对反应模板的竞争;⑤特异性产物浓度超过 10^{-8} mol/L 以上时发生重新退火(可降低延伸率或引起产物链的分支迁移和引物转换);⑥在高浓度产物存在时,产物的变性或链分离不完全。

(五) PCR 操作程序

由于 PCR 方法非常方便而灵敏,应用十分广泛。迄今已发明了许多种利用 PCR 进行的分子生物学研究方法,如基因组 DNA 扩增、RNA 扩增、cDNA 末端快速扩增、反向 PCR、简并引物扩增 cDNA、定量 PCR 及不对称 PCR 等等。因为 PCR 方法灵敏度极高,故在操作中必须采取有效措施以确保反应混合物不被极微量的外来 DNA 所污染,以免出现假阳性结果。根据 Michael 等介绍,标准的 PCR 扩增程序为:

1. 于 0.5 ml 容量的微量离心管中设置 $100 \mu\text{l}$ 的反应混合物体系,充分混匀,上面复盖 $75 \mu\text{l}$ 矿物油。反应体系包括:

模板 DNA ($10^5 \sim 10^6$ 靶分子)

引物 各 20 p mol/L

dNTPs 各 $50 \mu\text{mol/L}$

Taq DNA 聚合酶 2 u

Tris-HCl (pH8.3, 20°C) 20 mmol/L

MgCl_2 1.5 mmol/L

KCl 25 mmol/L

吐温 20, 0.05%

高压灭菌明胶(或不含核酸酶牛血清白蛋白) $100 \mu\text{g/ml}$

2. 使用以下温度和时间,进行 $25 \sim 35$ 个循环扩增:

变性 $96^\circ\text{C} \times 15 \text{ s}$;

引物退火 $55^\circ\text{C} \times 30 \text{ s}$;

引物延伸 $72^\circ\text{C} \times 1 \frac{1}{2} \text{ min}$ 。

3. 循环结束时最后一次延伸反应为 72°C 持续 5 min 。然后将温度降至 4°C 和(或)加入 EDTA 达 10 mmol/L 浓度使反应终止。

国内学者杨瑞馥等推荐以下 PCR 程序,认为可最大程度地增加反应成功率。

1. 在 1 只微量离心管中依次加入: 10×PCR 缓冲液 (1/10 体积)、dNTPs 各 200 μmol/L、引物各 1 μmol/L、DNA 模板 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝、ddH₂O 补至终体积 (50~100 μl)。混匀后离心 15 s, 使反应成分集于管底。

2. 加石蜡油 50~100 μl 覆盖于反应物表面以防蒸发。置反应管于 97℃ 变性 7 min (染色体 DNA) 或 5 min (质粒 DNA)。

3. 冷却至延伸温度, 加入 1~5 U 的 Taq DNA 聚合酶, 在此温度下作用 1 min。

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。

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。

三、多聚酶链反应在微生物学领域中的应用

PCR 技术是 80 年代中期出现的一种新的分子生物学技术。应用这种技术可在数小时内将所研究的基因或片段扩增百万倍, 近年来采用套式 [巢式或双重 PCR (nested PCR)] 更为理想。PCR 技术具有快速、敏感、简便、特异等优点, 迅速成为研究现代生物学最有力工具之一, 并在感染性与遗传性疾病的诊断中得到日益广泛的应用^[10~32]。

(一) 对细菌的检测

1. 脑膜炎奈瑟菌 朱沛轩等 (1993) 以多聚酶链反应—限制性长度多形态 (PCR-RFLP) 分析法对 100 株 B 群脑膜炎奈瑟菌进行了分型研究。被检菌株包括: 63 株病人分离株、35 株带菌者菌株和 2 株分群参考株。根据 Por A 基因扩增产物的 Msp I 酶切图谱的差异, 共分为 33 种 RFLP 型 ($b_1 \sim b_{33}$), 其中 b_{20} 型为我国 B 群奈瑟菌主要谱型, 与 b_{20} 型关系密切的常见谱型为 b_{21-24} 。PCR-RFLP 法分群率高, 是奈瑟菌分类学和分子流行病学研究的一种有效手段, b_{20} 型为重点监测和选择菌苗菌株的首选菌型。

2. 淋病奈瑟菌 郭兆彪等 (1993) 以自行设计合成的寡核苷酸序列作为引物, 通过 PCR 扩增淋病奈瑟菌 ORF-1 基因后, 仅淋病奈瑟菌产生 461bp 的单一 DNA 扩增区带, 其它奈瑟菌未见任何扩增反应。

3. 福氏志贺菌 Frankel 等 (1989, 1990) 证实质粒中与侵袭性有关的部位 (iae) 在 2.5 Kbp Hind III 片段, 应用一对合成的、与 iae 基因顺序相对应的引物, 通过 PCR 技术, 可特异地扩增 iae 片段, 其敏感性为探针的 10 倍, 为常规生化检测的 10^5 倍, 标本中至少 10 个福氏志贺菌即可检出。孙长柱等 (1993) 选择福氏志贺菌 5 型毒力大质粒上编码侵袭质粒抗原 H (ipa H) 基因同源区两个各加碱基序列作为引物, 通过 PCR 扩增一个 498bp ipa H 基因片段, 用以检测腹泻病人分离的 64 株病菌, 结果全部阳性。而检测鼠伤寒沙门菌、伤寒杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、产气肠杆菌、类志贺邻单胞菌、粘质沙雷菌以及小肠结肠炎耶菌皆为阴性。

4. 结核杆菌 Shanker 等 (1991) 将 34 例疑似结核性脑膜炎病人的脑脊液作 PCR 扩

增,同时与培养及抗结核抗体 ELISA 比较。结果 PCR 阳性 22 例 (65%), 培养 4 例阳性 (11.7%), ELISA 15 例阳性 (44%)。蔡建斌等 (1993) 用 PCR 技术扩增人型结核杆菌特异的 158 bp DNA 片段靶基因, 检测 60 例肺结核患者痰标本。结果阳性率为 58.3%, 而常规培养法阳性率仅有 11.7%。20 例非结核病患者标本, 均为阴性。最近 Noordhoek (1994) 在严格控制条件下进行双盲试验, 以比较 PCR 技术检测结核菌的敏感性与特异性。研究结果表明, 用 PCR 技术检测临床标本中的结核杆菌, 尽管在理论上讲具有灵敏、快速等优点, 但由于假阳性率高 (即特异性差), 敏感性也低于理论值, 故尚有待在技术上进一步完善与改进, 方能成为临床常规应用方法。

5. 麻风杆菌 迄今麻风杆菌仍不能作人工培养, 故麻风病的病原诊断仅能从组织活检中取材作抗酸染色镜检, 阳性率不高。Hartkeerl 等 (1989) 建立了扩增麻风杆菌 36 kDa 蛋白抗原基因 530 bp 特异性序列的 PCR 技术, 其敏感度为 20 个细菌的纯 DNA 量, 用于检测猴肝组织中的麻风杆菌, 其敏感度为 1000 个细菌 DNA 量。Bornie 等 (1990) 以麻风杆菌 groEL 基因的专一 DNA 片段合成一对引物, 用套式 PCR 法对 4 株麻风杆菌、19 株其它分枝杆菌以及 19 株非分枝杆菌进行扩增。结果仅 4 株麻风杆菌 PCR 扩增阳性, 其余菌株均为阴性, 特异性 100%。

6. 流感嗜血杆菌 Ketel 等 (1990) 从流感嗜血杆菌荚膜相关 Bey A 蛋白基因的已知序列中去除与大肠杆菌、伤寒杆菌序列同源性部份, 设计了引物 I, 用以扩增 +277~+619 的 343 bp 特异性片段, 能特异地检测有荚膜的流感杆菌 a-f 型; 根据外膜蛋白 P6 的已知序列设计引物 II, 用于扩增 +103~+375 之间的 272 bp 特异性核苷酸序列, 则能检测所有流感杆菌、溶血性嗜血杆菌和埃及嗜血杆菌。用此两套引物对 200 份患者脑脊液进行检测, 所得结果与细菌培养相似, 但 2 份经抗生素治疗后的标本, 细菌培养阴性, 而 PCR 仍为阳性。

7. 军团菌 Atarnbach (1989) 对嗜肺军团菌染色体的 Eco RI 和 Hind III 双酶切图谱中具种特异性的 800~1200 bp 片段两端进行序列分析。他设计的一对引物能特异地扩增嗜肺军团菌 1~14 型菌株中 700 bp 的种特异性片段, 可用以检测水环境中的军团菌, 敏感度为 35 CFU。翌年, Mabubani 等根据嗜肺军团菌巨噬细胞感染性增强因子 (mip) 基因设计的引物, 能检测所有血清型的嗜肺军团菌。李崇辉等 (1993) 通过扩增嗜肺军团菌 mip 基因的 207 bp 片段, 应用 PCR 技术以检测和鉴定嗜肺军团菌。结果嗜肺军团菌 1~10 型标准株和 3 株国内分离株, 经 PCR 扩增后均能产生特异的单一 DNA 电泳带, 而军团菌属中 17 个非嗜肺军团菌的标准株以及 20 株非军团菌菌株, PCR 扩增后均为阴性。

8. 炭疽杆菌 蒋国桥等 (1993) 自行设计了一对扩增炭疽杆菌保护性抗原 (PA) 基因中 394 bp 片段的引物, 建立了菌细胞直接进行 PCR 检测法, 其敏感性为 ≤ 75 CFU。同年, Makino 等应用 Cap A 基因中的 288 bp DNA 片段为引物。扩增的 DNA 序列对炭疽杆菌 DNA 呈特异杂交, 但对其它细菌则否。应用 PCR 技术能在小鼠感染活炭疽菌 8 h 后, 从血液及肝脏中检出细菌的 Cap A 序列。

9. 绿脓杆菌 Saint-Onge 等 (1992) 以绿脓杆菌脂蛋白 I 基因为靶基因序列, 设计了一对由 25 个核苷酸组成的引物, 对假单胞菌属、卡他布兰汉菌、大肠杆菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌及微小链球菌进行 PCR 检测。结果显示绿脓杆菌及其 rRNA 同