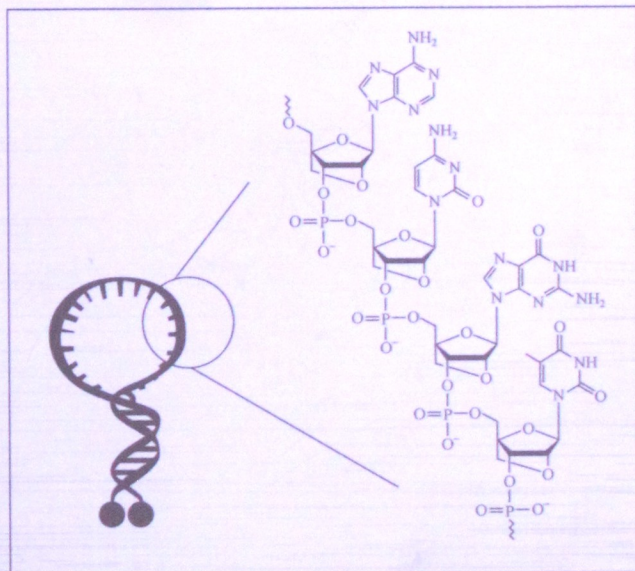


核酸扩增技术原理及应用



郑文杰 赵祥平 主编



科学出版社

. 014009723

Q52
05

核酸扩增技术原理及应用

郑文杰 赵祥平 主编



科学出版社

北京



北航

C1695962

Q52
05

内 容 简 介

核酸扩增是一大类技术方法的总称,目前包括常规 PCR、实时荧光 PCR、等温核酸扩增技术等。本书对核酸扩增所涵盖的各种技术从原理、操作要求及注意事项等方面进行了阐述,比较系统地反映了核酸扩增的全貌,并整理了各种核酸扩增技术在动植物检疫、食品安全及转基因检测等领域的标准方法,及各种仪器的使用、保养与维护,相信会在一定程度上给广大同行提供便利。

本书的作者是一些长年与分子生物学打交道的研究与检测人员,编写时,对每种核酸扩增技术注重理论与实际相结合,既有简明的原理又有应用的实例,更有工作经验的总结,使得本书具体而实用。希望本书成为分子生物学研究和从事检验行业人员案头或实验台前的一本好的工具书。

图书在版编目(CIP)数据

核酸扩增技术原理及应用/郑文杰,赵祥平主编. —北京:科学出版社, 2013. 11

ISBN 978-7-03-038919-0

I. ①核… II. ①郑… ②赵… III. ①核酸-等温-研究 IV. ①Q52

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 247954 号

责任编辑:刘 冉 孙静惠 / 责任校对:张凤琴

责任印制:赵德静 / 封面设计:王 浩

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京源海印刷有限责任公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2013 年 11 月第 一 版 开本: 720×1000 1/16

2013 年 11 月第一次印刷 印张: 25 3/4

字数: 520 000

定价: 120.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

编 委 会

主 编：郑文杰 赵祥平

审 校：黄国明 董志珍

副主编：张 霞 魏亚东 高旗利 廖 芳

王玉玲 张宏伟 张裕君

编 委（按姓氏汉语拼音排序）：

程 瑜 郭京泽 贺 艳 刘 培

刘 鹏 刘 勇 刘 震 牛春敬

曲 鹏 王建华 王金成 王乃福

吴冬雪 肖 妍 赵 宏 赵良娟

赵卫东

审 阅：王 硕

序

随着全球经济一体化进程的加快和我国对外贸易的迅速发展,动植物产品及食品的贸易量日益增大,随之而来的疫情疫病传播风险和食品安全问题逐年增加。为充分发挥检验检疫的职能,做到“检得全、检得快、检得准”,缩短疫情疫病传播半径,确保食品安全,很多敏感、特异和快速的检测技术在检验检疫系统得到了极大的重视与应用,核酸扩增技术就是其中之一。

核酸扩增是一大类技术方法的总称,目前包括常规 PCR、实时荧光 PCR、等温核酸扩增技术等。这些技术方法分散于不同的书籍、文献和标准中,不便查询和使用。《核酸扩增技术原理及应用》一书对核酸扩增所涵盖的各种技术进行了收集和阐述,比较系统地反映了核酸扩增的全貌,并整理了各种核酸扩增技术在动植物检疫、食品安全及转基因检测等领域的标准方法,相信该书将会在一定程度上给广大同行提供便利。

该书的作者是一些长年与分子生物学打交道的研究与检测人员,在编写时对每种核酸扩增技术注重理论与实际相结合,既有简明的原理又有应用的实例,更有工作经验的总结,使得该书具体而实用,可作为各位同行案头或实验台前的一本好的工具书。



2013 年 9 月

目 录

序

原 理 篇

第一章 常规 PCR 技术	3
第一节 基于 DNA 的常规 PCR 技术	3
第二节 基于 RNA 的反转录 PCR 技术	19
第二章 实时荧光 PCR	35
第一节 TaqMan 探针	35
第二节 分子信标技术	44
第三节 LUX 引物	54
第四节 杂交探针法	57
第五节 荧光染料法	60
第三章 等温核酸扩增技术	68
第一节 链替代扩增	68
第二节 自主序列复制与依赖于核酸序列的扩增	73
第三节 滚环扩增技术	79
第四节 环介导的核酸等温扩增技术	86
第五节 转录介导的扩增技术	91
第六节 依赖解旋酶的等温扩增技术	96
第七节 单引物等温扩增	99
第八节 核酸快速等温检测放大技术	104
第四章 其他种类核酸扩增技术	109
第一节 免疫 PCR 技术	109
第二节 原位 PCR 技术	116
第三节 毛细管 PCR 技术	125
第四节 巢式 PCR 技术	128
第五节 不对称 PCR 技术	137
第六节 复合 PCR 技术	139

应 用 篇

第五章 核酸扩增技术在动物检疫中的应用·····	151
第一节 细菌类疫病·····	151
第二节 病毒类疫病·····	176
第三节 寄生虫类及其他类疫病·····	229
第六章 核酸扩增技术在转基因检测中的应用·····	244
第七章 核酸扩增技术在植物检疫中的应用·····	254
第一节 核酸扩增技术在植物病原真菌检疫中的应用·····	254
第二节 核酸扩增技术在植物病原细菌检疫中的应用·····	277
第三节 核酸扩增技术在植物病毒和类病毒检测及研究中的应用·····	285
第四节 植物线虫分子鉴定研究进展·····	289
第五节 核酸扩增技术在植物昆虫检疫中的应用·····	297
第六节 核酸扩增技术在杂草检疫及鉴定中的应用·····	302
第八章 核酸扩增技术在食源性微生物检测中的应用·····	310
第九章 核酸扩增技术在成分检测中的应用·····	340
第一节 核酸扩增技术在食物过敏原成分检测中的应用·····	340
第二节 核酸扩增技术在动物源性成分检测中的应用·····	346

仪 器 篇

第十章 核酸提取仪·····	357
第十一章 普通 PCR 仪 ·····	363
第十二章 实时荧光定量 PCR 仪 ·····	370
第十三章 电泳仪·····	378
第十四章 凝胶成像系统·····	383
第十五章 基因芯片·····	388

第一章 常规 PCR 技术

第一节 基于 DNA 的常规 PCR 技术

一、引言

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR),是 20 世纪后期发展起来的一种体外扩增特异 DNA 片段的技术,具有快速、简便和灵敏度高的优点。通过 PCR,可以使微量的核酸(DNA 或 RNA)得以脱离于活体生物并进行大量复制,用于研究和检测鉴定。

人类对于核酸的研究已经有百余年的历史。20 世纪 60 年代末 70 年代初,人们开始致力于研究基因的体外分离技术,但是由于核酸的含量较少,在一定程度上限制了 DNA 的体外操作。Khorana 等于 1971 年最早提出在体外使 DNA 变性,并与适当引物杂交,然后用 DNA 聚合酶延伸,从而达到克隆 DNA 的设想。但是,当时的基因序列分析方法尚未成熟,对热具有较强稳定性的 DNA 聚合酶还未被发现,寡核苷酸引物的合成仍处在手工、半自动合成阶段,这种想法似乎没有任何实际意义。

1985 年,美国科学家 Kary Mullis 在高速公路的启发下,经过两年的努力,发明了 PCR 技术,并在 *Science* 杂志上发表了关于 PCR 技术的第一篇学术论文*。从此,PCR 技术得到了生命科学界的普遍认同,Kary Mullis 也因此获得 1993 年的诺贝尔化学奖。但是,最初的 PCR 技术相当不成熟,在当时是一种操作复杂、成本高昂、“中看不中用”的实验室技术。1988 年年初,Keohano 通过对所使用酶的改进,提高了扩增的真实性。而后,Saiki 等又从生活在美国黄石公园温泉中的水生嗜热杆菌内提取到一种耐热的 DNA 聚合酶,使得 PCR 技术的扩增效率大大提高。也正是此酶的发现使得 PCR 技术得到了广泛的应用,使该技术成为遗传与分子生物学分析的基石。在以后的几十年里,PCR 方法被不断改进:它从一种定性的分析方法发展到定量测定;从原先只能扩增几 kbp 的基因到目前已能扩增长达几十 kbp 的 DNA 片段。到目前为止,PCR 技术已拓展至十几种,例如,将 PCR 与

* Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230 (4732):1350-1354.

反转录酶结合的反转录 PCR,将 PCR 与抗体等相结合的免疫 PCR 等。

二、技术原理及组成

(一) PCR 的基本技术原理

PCR 技术相对比较简单,类似于 DNA 的天然复制过程,其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成(图 1-1):①模板 DNA 的变性:模板 DNA 经加热至 93℃左右时,其双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便与引物结合,为下步反应作准备;②模板 DNA 与引物的退火(复性):模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55℃左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;③引物的延伸:DNA 模板-引物结合物在 *Taq* DNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。重复循环变性—退火—延伸三过程,就可获得更多的半保留复制链,而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 min,2~3 h 就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

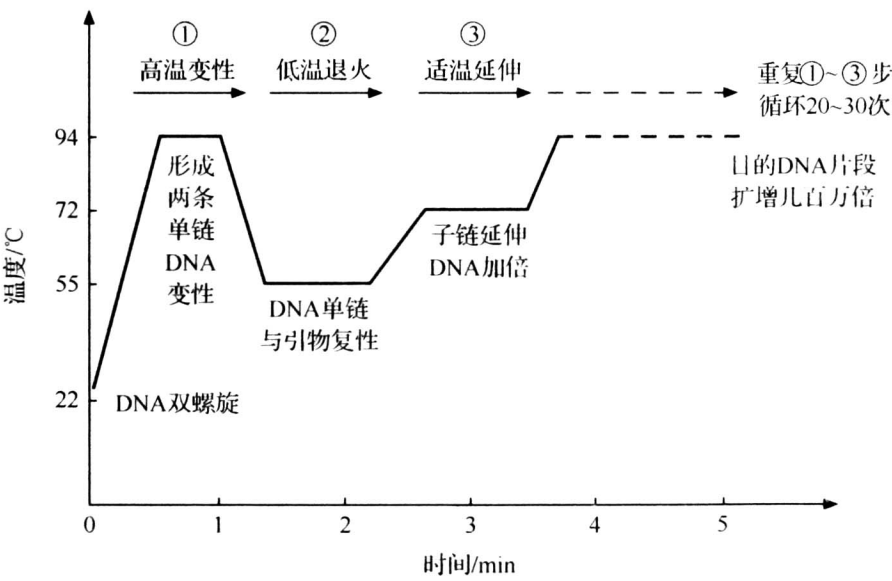


图 1-1 PCR 扩增程序

在实验中发现,DNA 在高温时也可以发生变性解链,当温度降低后又可以复性成为双链。因此,通过温度变化控制 DNA 的变性和复性,并设计引物作为启动子,加入 DNA 聚合酶、dNTP 就可以完成特定基因的体外复制。但是,DNA 聚合酶在高温时会失活,每次循环都要加入新的 DNA 聚合酶,不仅操作烦琐,而且价格昂贵,制约了 PCR 技术的应用和发展。发现耐热 DNA 聚合酶——*Taq* 酶对于

PCR 的应用具有里程碑意义。该酶可以耐受 90℃ 以上的高温而不失活,不需要每个循环加酶,使 PCR 技术变得非常简捷,同时也大大降低了成本,PCR 技术得以大量应用,并逐步应用于实际检测工作之中。

(二) PCR 的基本组成

PCR 的基本组成主要有五个要素,即参加 PCR 反应的五种主要物质,包括模板、引物、DNA 聚合酶、脱氧核苷三磷酸(dNTP)和 Mg^{2+} 。

1. 模板

模板即待扩增序列的核酸 DNA。几乎所有形式的 DNA 和 RNA 都可以作为 PCR 反应的模板,PCR 对模板 DNA 的纯度要求不是很高,但应尽量避免含有对 PCR 反应有抑制作用的杂质,如蛋白酶、核酸酶、*Taq* DNA 聚合酶抑制剂、能与 DNA 结合的蛋白质等。除了纯化的 DNA 外,PCR 反应也可以直接以细胞作为模板。模板核酸的量与纯化程度,是 PCR 成功的关键环节之一,传统的 DNA 纯化方法通常采用 SDS 和蛋白酶 K 来消化处理标本。

2. 引物

引物是 PCR 特异性反应的关键,PCR 产物的特异性取决于引物与模板 DNA 互补的程度。理论上,只要知道任何一段模板 DNA 序列,就能按其设计互补的寡核苷酸链作为引物,利用 PCR 就可将模板 DNA 在体外大量扩增。引物浓度一般为 0.1~0.52 $\mu\text{mol/L}$,浓度过高会引起碱基错配和非特异性扩增,浓度过低则得不到产物或产物量过低。

3. DNA 聚合酶

DNA 聚合酶的主要作用是以 DNA 单链为模板,以碱基互补原则为基础,按 5'→3'方向逐个将 dNTP 分子连接到引物的 3'端,合成一条与模板 DNA 互补的新的 DNA 子链。目前有两种 *Taq* DNA 聚合酶供应,一种是从栖热水生杆菌中提纯的天然酶,另一种为大肠菌合成的基因工程酶。催化一典型的 PCR 反应约需酶 2.5U(指总反应体积为 100 μL 时),浓度过高可引起非特异性扩增,浓度过低则合成产物量减少。

4. 脱氧核苷三磷酸

脱氧核苷三磷酸(dNTP)的质量与浓度和 PCR 扩增效率有密切关系,dNTP 粉呈颗粒状,如保存不当易变性失去生物学活性。

5. Mg^{2+}

Mg^{2+} 对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响,在一般的 PCR 反应中,各种 dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$ 时, Mg^{2+} 浓度以 1.5~2.0 mmol/L 为宜。

三、操作步骤

(一) 引物设计

1. PCR 引物设计的原理

PCR 引物设计的目的就是得到一对合适的核苷酸片段,通过这个核苷酸片段,可以将模板 DNA 序列有效地进行扩增。引物的设计是 PCR 技术中至关重要的一个环节,也是影响 PCR 试验的重要参数之一。设计引物的优劣直接关系到 PCR 的特异性和试验的成功与否。使用不合适的 PCR 引物容易导致实验失败,表现为扩增出目的带之外的多条带(如形成引物二聚体带),不出带或出带很弱,等等。

2. PCR 引物设计的一般原则

1) 引物应在核酸 DNA 序列保守区内设计并具有特异性。DNA 序列的保守区是通过物种间相似序列的比较确定的,不同物种的同一基因,各基因相同的序列就是该基因的保守区。

2) 扩增产物的单链不能形成二级结构。

3) 引物的长度通常为 18~30 bp,至少为 16 bp,但不能大于 38 bp。更短的引物虽然会提高扩增的有效性,但会降低扩增的特异性;而引物过长会导致其延伸温度大于 *Taq* DNA 聚合酶的最适温度 74℃,不适于 *Taq* DNA 聚合酶进行反应。

4) 引物序列中 GC 的含量一般在 40%~60% 之间, T_m 值一般控制在 55~60℃。

5) 四种碱基要随机分布。

6) 引物自身及引物之间不应存在互补序列,一般一对引物间不应多于四个连续碱基的互补。引物本身存在互补序列,会导致引物自身折叠成发夹结构,使引物本身复性。

7) 引物 3'端不能选择 A,最好选择 T。

8) 引物的 5'端可以修饰,而 3'端绝对不可以进行任何修饰,因为引物的延伸是从 3'端开始的。

9) 引物的 3'端要避开密码子的第 3 位,否则会因为密码子第 3 位发生简并而影响扩增的特异性和效率。

10) 引物的 5'端和中间 ΔG 值应该相对较高,而 3'端 ΔG 值较低。

(二) 使用试剂及仪器

完成常规 PCR 试验所使用的仪器设备主要包括 PCR 仪、微量移液器及配套

吸头、PCR 管等。另外,还需要灭菌锅、恒温金属浴、旋涡混合器、掌式离心机、台式离心机、电泳仪、电泳槽、凝胶成像分析系统、制冰机、低温冰箱等。

PCR 仪作为试验必需的仪器设备,根据 DNA 扩增的目的和检测的标准,分为普通 PCR 仪、梯度 PCR 仪、原位 PCR 仪、实时荧光定量 PCR 仪等几类。常规 PCR 试验主要使用前两者。所谓普通 PCR 仪,一般指的是一次 PCR 扩增只能运行一个特定退火温度的 PCR 仪,如果要用它做不同的退火温度则需要多次运行。普通 PCR 仪主要是用作简单的对目的基因退火温度的扩增,主要应用于科研、教学、临床医学、检验、检疫等。而梯度 PCR 仪在一次性 PCR 扩增时,可以设置一系列不同的退火温度条件(通常为 12 种温度梯度)。因为被扩增的不同 DNA 片段的最适合的退火温度不同,通过设置一系列的梯度退火温度进行扩增,一次性 PCR 扩增就可以筛选出表达量高的最适合退火温度进行有效扩增。梯度 PCR 仪主要用于研究未知 DNA 退火温度的扩增,这样既节省时间,也节约经费。在不设置梯度的情况下也可当作普通的 PCR 仪用。真正的梯度,是每一排管都有精确的加热控温探头。梯度 PCR 仪多应用于科研、教学机构。

由于 PCR 具有高度灵敏的特点,要求 PCR 反应体系必须在一个洁净的环境中进行,所以 PCR 试验中的试管和吸头不能够重复使用,以避免相互污染。

以下是标准 PCR 反应体系所需要的试剂:

10×扩增缓冲液	10 μL
4 种 dNTP 混合物	200 μL
引物	10~100 μL
模板 DNA	0.1~2 μg
<i>Taq</i> DNA 聚合酶	2.5 μL
Mg^{2+}	1.5 mmol/L
加双蒸水或三蒸水	100 μL

(三) 条件优化

PCR 技术因其具有高效率、高灵敏度和高特异性的优点,已被广泛应用于生物和医学等各个领域。但是正因为其具有很强的特异性和敏感性,PCR 体系中任何成分出现问题,或者反应参数不合适等都会影响试验结果的准确性,导致假阴性和假阳性的出现。因此,要实现高效、灵敏和高特异性 PCR 反应,就必须对其反应条件进行摸索和优化,根据预期要达到的指标,找出对反应影响最大的因素并据此优化反应条件。

PCR 反应条件的优化包括对 PCR 反应体系的优化和对 PCR 反应循环参数的优化。

1. PCR 反应体系的优化

(1) 模板核酸

模板核酸可以是多种形式的 DNA, 高质量的模板 DNA 是 PCR 试验成功的保证。若起始材料是 RNA, 须先通过逆转录得到 cDNA 后才能进行正常 PCR 扩增。无论标本来源如何, 待扩增核酸都需部分纯化, 通过纯化能够除去蛋白酶、核酸酶、DNA 聚合酶抑制剂以及能与 DNA 结合的蛋白质, 以及制备模板过程中的有机物如醇、酚和 RNA 等的污染。

理想的 PCR 反应体系应该是模板的纯度高而拷贝数低, 通过模板 DNA 的纯化、降低模板浓度可以有效提高 PCR 的效率, 降低非特异性扩增。低拷贝数的模板 DNA 能大大减少 PCR 循环中长片段扩增产物的产生, 降低对目的基因片段 DNA 竞争的抑制作用, 提高扩增效率。实验表明, 在一定范围内 PCR 的产量随模板浓度的升高而显著升高。由于不同靶序列的分子质量不同, 所以 PCR 反应中模板的加入量也有所不同, 一般为 $10^2 \sim 10^5$ 拷贝的靶序列。此外, 模板的加入量与循环数也要匹配, 如果循环数一定, 模板的量太少, 会出现阴性结果或条带很弱; 而模板的量太多, 则会出现条带弥散、模糊不清的现象。

扩增靶序列的长度根据其目的的不同而不同。用于检测目的的基因的扩增片段长度一般在 500 bp 以内, 以 100~300 bp 为最佳。但是如果在适当的条件下, 使用较长的延伸时间时, 可扩增长达 10~20 kbp 的片段。

(2) 引物

PCR 扩增产物的大小及扩增的靶序列在基因组中的位置是由引物限定的。因此, 引物的选择与合成对 PCR 试验成功与否具有决定性意义。引物在设计过程中除要遵循前述的设计原则之外, 在使用过程中同样需要进行优化。引物的优化主要包括提高引物合成的质量和引物的使用浓度优化两方面。

高质量和高度纯化的引物是 PCR 试验成功的关键, 可以避免很多问题的出现。理论上引物应与模板精确互补, 但通常在引物合成的过程中会有相当数量的“错误序列”, 包括不完整的序列、脱嘌呤产物以及可检测到的碱基修饰的完整链和高分子质量产物, 如果不除去, 这些序列在 PCR 反应中可导致非特异性扩增和信号强度的降低。因此 PCR 引物必须进行纯化, 纯化的方法有聚丙烯酰胺凝胶电泳或反相高压液相色谱(HPLC)等。为保证引物的质量, 避免其降解, 冻干引物通常保存在 -20°C 条件下。在此温度条件下, 一般干粉状引物至少可以保存 2~3 年, 液体状引物可保存至少 6 个月。

PCR 反应体系中, 引物浓度应该适当, 这样才能保证其特异性。一般 PCR 反应中引物的终浓度为 $0.2 \sim 1 \mu\text{mol/L}$, 在此范围内, PCR 产物量基本相同。引物浓度过低, 会导致产物量降低。而浓度过高, 则会大大增加碱基错配的概率, 导致非特异性产物的合成, 同时还会增加引物二聚体的形成, 最终导致靶序列扩增量的降

低;浓度过高,还会导致凝胶电泳时出现引物条带。通常引物量应当 10 倍于靶序列。此外,引物的 T_m 值与退火温度相关,因此引物的 T_m 值最好在 $55\sim 80^{\circ}\text{C}$ 范围内,以接近 72°C 为宜。

(3) DNA 聚合酶

耐热 DNA 聚合酶在 PCR 体系中起着关键的作用,所以 PCR 体系中耐热 DNA 聚合酶的选择及其用量特别重要。尽管耐热 *Taq* DNA 聚合酶引入 PCR 之后,相继又有多种耐热 DNA 聚合酶用于 PCR,但目前仍以 *Taq* DNA 聚合酶应用最多。不同来源聚合酶制备条件、测定方法和(或)单位定义有所不同,使用时需加以注意。一般在保证 PCR 有效性的前提下,尽量降低酶的浓度有助于提高反应的特异性,降低碱基的错配率。当其他参数都在最优的情况下,每 $100\ \mu\text{L}$ 反应体系中以加入 $1\sim 2.5\ \text{U}$ 的 *Taq* DNA 聚合酶为宜。在 PCR 试验中,酶的用量要随模板或引物的不同而进行适当调整,以保证试验的成功。比如以质粒 DNA 为模板时,酶的用量较少,循环次数也可以少些;而以染色体 DNA 为模板时,比较而言需要酶的用量要多些,至少需要 $25\sim 30$ 个循环才能达到好的扩增效果,在反应循环中适当补充 *Taq* DNA 聚合酶也会促进反应的进行。对于一个新的体系,第一次优化 PCR 反应时,可以用 $0.5\sim 5\ \text{U}$ 的酶浓度梯度来试验酶的最佳浓度。如果琼脂糖凝胶电泳中出现非特异性扩增条带,则可能是酶的浓度过高。

扩增长片段 DNA、高 GC 含量 DNA 或结构复杂的 DNA 片段时,将两种或两种以上 DNA 聚合酶混合使用往往会得到良好的扩增效果,这可能是由于多种 DNA 聚合酶之间功能互补。试验结束后,如果需要放置等待,此时应将 DNA 聚合酶进行灭活处理。常用 *Taq* DNA 聚合酶灭活方法有:一是在 $99\sim 100^{\circ}\text{C}$ 加热 $10\ \text{min}$;另外一种方法是加入 EDTA 至 $10\ \text{mmol/L}$;还有一种方法是利用酚-氯仿抽提、乙醇沉淀 PCR 产物。

(4) Mg^{2+}

镁离子影响 PCR 的多个方面,如 DNA 聚合酶的活性,这会影响产量;再如引物退火,这会影响特异性。dNTP 和模板同镁离子结合,降低了酶活性所需要的游离镁离子的量。对于不同的引物和模板,最佳的镁离子浓度不同,但是包含 $200\ \mu\text{mol/L}$ dNTP 的典型 PCR 起始浓度是 $1.5\ \text{mmol/L}$ (注意:对实时定量 PCR,使用 $3\sim 5\ \text{mmol/L}$ 带有荧光探针的镁离子溶液)。在多数情况下,较高的游离镁离子浓度可以增加产量,但也会增加非特异性扩增,降低忠实性。确定最佳浓度,可以用 $0.1\sim 5\ \text{mmol/L}$ 递增浓度的 Mg^{2+} 进行预备实验,选出最适的 Mg^{2+} 浓度。在 PCR 反应混合物中,应尽量减少高浓度的带负电荷的基团,如磷酸基团或 EDTA 等可能影响 Mg^{2+} 浓度的物质,以保证最适 Mg^{2+} 浓度。

(5) dNTP

高浓度的 dNTP 会对扩增反应起抑制作用。将每种 dNTP 的浓度从 $200\ \mu\text{mol/L}$

降低到 25~50 $\mu\text{mol/L}$ 可以使扩增产物获得满意的产率。

(6) 其他

提高 PCR 缓冲液的浓度有助于提高 PCR 反应的效率。

2. PCR 反应循环参数的优化

(1) 变性

第一轮循环前,在 94℃ 下变性 5~10 min 非常重要,它可使模板 DNA 完全解链,然后加入 *Taq* DNA 热启动聚合酶,这样可减少聚合酶在低温下仍有活性从而延伸非特异性配对的引物与模板复合物所造成的错误。变性不完全,往往使 PCR 试验失败,因为未变性完全的 DNA 双链会很快复性,减少 DNA 产量。一般变性温度与时间为 94℃ 1 min。在变性温度下,双链 DNA 解链只需几秒即可完成,所耗时间主要是使反应体系达到适当的温度。对于富含 GC 的序列,可适当提高变性温度,但变性温度过高或时间过长都会导致酶活性的损失。

(2) 退火

退火是 PCR 的一个关键参数。在理想状态下,退火温度要足够低,以保证引物同目的序列有效退火,同时还要足够高,以减少非特异性结合。合理的退火温度在 55~70℃。退火温度一般设定为比引物的 T_m 低 5℃,当产物中包含有影响试验的非特异性扩增带时,以 2℃ 为增量,逐步提高退火温度。较高的退火温度会减少引物二聚体和非特异性产物的形成。如果两个引物 T_m 不同,将退火温度设定为比较低的 T_m 低 5℃。或者为了提高特异性,可以在根据较高 T_m 设计的退火温度下先进行 5 个循环,然后在根据较低 T_m 设计的退火温度下进行剩余的循环。这使得在较为严谨的条件下可以获得目的模板的部分拷贝。退火温度越高,所得产物的特异性越高。有些反应甚至可将退火与延伸两步合并,只用两种温度(如用 60℃ 和 94℃)完成整个扩增循环,既省时间又提高了特异性。退火一般仅需数秒即可完成,反应中所需时间主要是使整个反应体系达到合适的温度。

(3) 延伸

延伸反应通常为 72℃,接近于 *Taq* DNA 聚合酶的最适反应温度 75℃。实际上,引物延伸在退火时即已开始,因为 *Taq* DNA 聚合酶的作用温度范围可从 20℃ 至 85℃,延伸反应时间的长短取决于目的序列的长度和浓度。在一般反应体系中,*Taq* DNA 聚合酶每分钟约可合成 1 kbp 长的 DNA。延伸时间过长会导致产物非特异性增加。但对很低浓度的目的序列,则可适当增加延伸反应的时间。一般在扩增反应完成后,都需要较长时间(10~30 min)的延伸反应,以获得尽可能完整的产物,这对以后进行克隆或测序反应尤为重要。

(4) 循环次数

当其他参数确定之后,循环次数主要取决于 DNA 浓度。一般而言,25~30 次循环已经足够。循环次数过多,会使 PCR 产物中非特异性产物大量增加。通常

经 25~30 次循环扩增后,反应中 *Taq* DNA 聚合酶已经不足。如果此时产物量仍不够,需要进一步扩增,可将扩增的 DNA 样品稀释 $10^3 \sim 10^5$ 作为模板,重新加入各种反应底物进行扩增,这样经 60 次循环后,扩增水平可达 $10^9 \sim 10^{10}$ 。扩增产物的量还与扩增效率有关,扩增产物的量可用下列公式表示: $C=C_0(1+P)^n$ 。其中, C 为扩增产物量; C_0 为起始 DNA 量; P 为扩增效率; n 为循环次数。在扩增后期,由于产物积累,原来呈指数扩增的反应变成平坦的曲线,产物不再随循环数而明显上升,这称为平台效应。平台期会使原先由于错配而产生的低浓度非特异性产物继续大量扩增,达到较高水平。因此,应适当调节循环次数,在平台期前结束反应,减少非特异性产物。

(四) 产物检测和判读

PCR 扩增反应完成之后,必须通过严格的检测分析,才能确定是否真正得到了准确可靠的预期特定扩增产物。用于检测分析 PCR 扩增产物的方法有多种,包括凝胶电泳、核酸探针杂交、酶谱分析、DNA 酶免疫试验、PCR-酶联免疫吸附(PCR-ELISA)、颜色互补分析、序列分析、PCR-HPLC、单一核苷酸引物延伸(SNUPE)、PCR-寡核苷酸连接检测(PCR-OLA)和单链构型多态性分析等方法。在实际检测过程中,可以根据实验室现有的条件,以及具体的研究对象和研究目的,有针对性地选择不同的方法进行 PCR 产物的检测分析。

1. 凝胶电泳

凝胶电泳是检测 PCR 产物最为常用和最简便的方法。其原理是 PCR 根据检测的目的基因的不同,扩增后得到大小不同的扩增片段,在电泳过程中,大片段的扩增产物因其分子质量大,在凝胶中泳动的速度会慢于小片段的扩增产物,因此通过凝胶电泳就可以判断扩增产物的大小,有助于产物的鉴定。凝胶电泳常用的有琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳,前者主要用于 DNA 片段大于 100 bp 者,后者主要用来检测小片段 DNA。

(1) 琼脂糖凝胶电泳

琼脂糖凝胶电泳是实验室最常用的方法,简便易行,只需少量 DNA 即可进行实验。其原理是不同大小的 DNA 分子通过琼脂糖凝胶时,由于泳动速度不同而被分离,经溴化乙锭(EB)染色,在紫外光照射下 DNA 分子发出荧光而判定其分子的大小。

用于电泳检测 PCR 产物的琼脂糖浓度常为 1%~2%*,应该使用纯度高的电泳纯级琼脂糖,这种琼脂糖已除去了荧光抑制剂及核酸酶等杂质。与聚丙烯酰胺凝胶电泳相比较,琼脂糖凝胶电泳的分辨率较低,但其分离范围较广,电泳的检出

* 如不特殊说明,本书中表示浓度的百分数均表示质量分数。