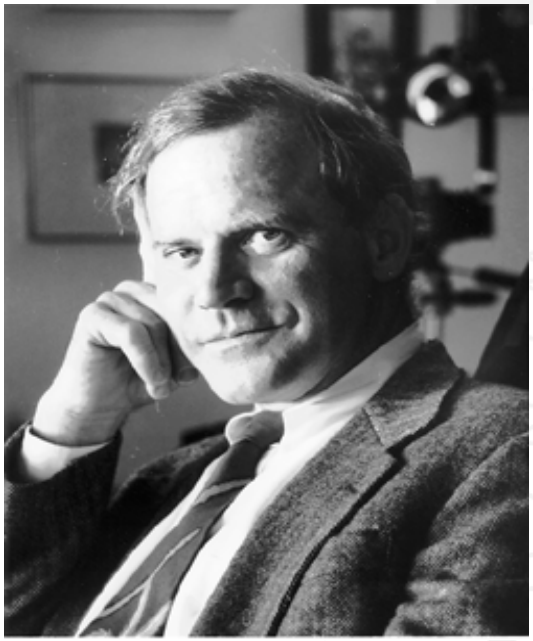
聚合酶链式反应技术及应用

检验医学院生命科学学院

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction,PCR）技术是生命科学界的重大发明，是生物技术领域中最重要的四项生物技术（即细胞融合技术、分子克隆术、蛋白工程技术和基因扩增技术）之一。

PCR的最大特点，是能将微量的DNA大幅增加。通过体外（试管内）扩增，可以将目的基因（或靶基因）片段百万倍的放大，从而达到极大地提高核酸分子检测的灵敏度，理论上其检测的灵敏度可以达到一个细胞、甚至一个分子的水平。

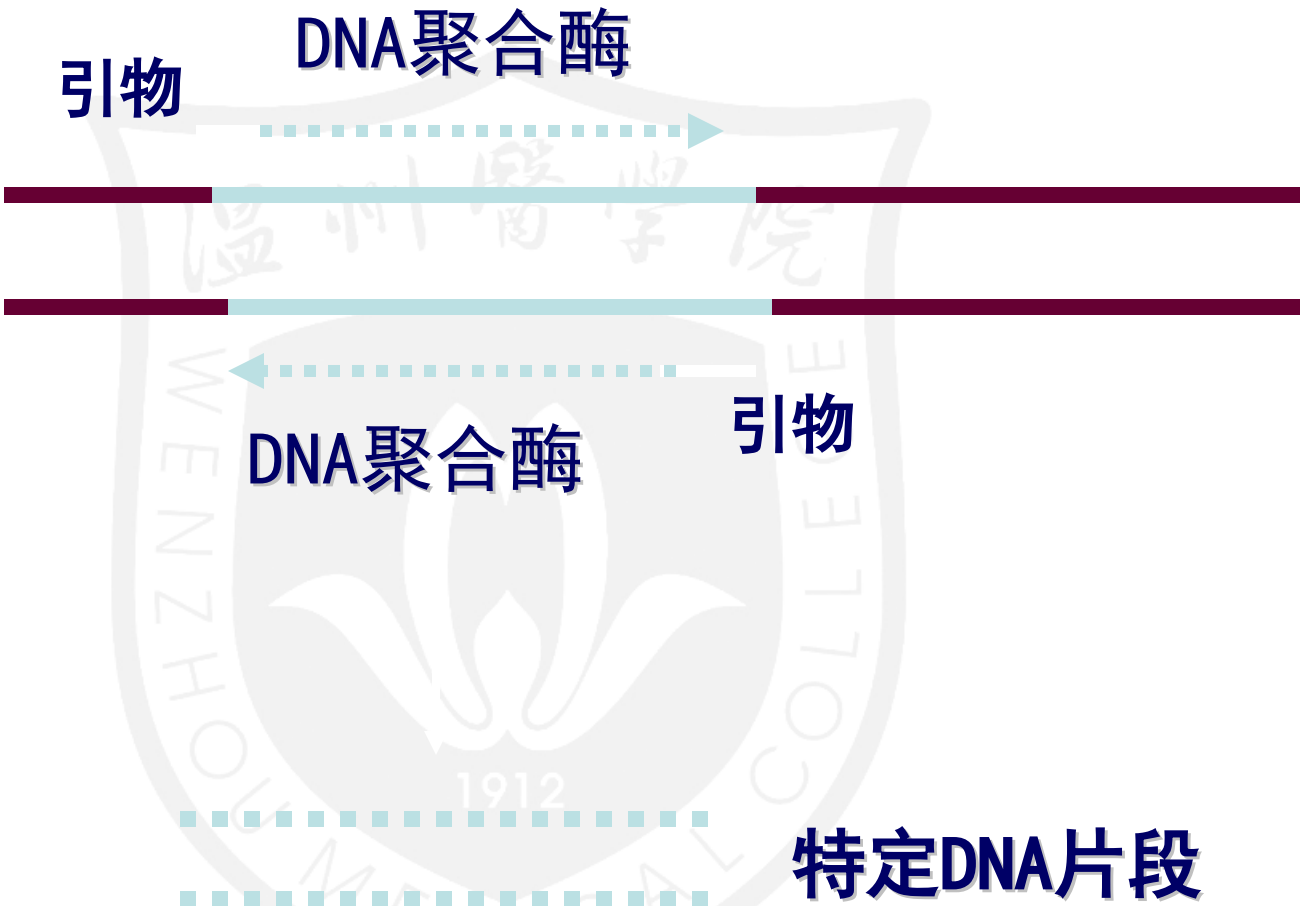
1. PCR发展简史



PCR的发明人，一般公认是凯利．穆利斯（K. Mullis, 在Cetus公司工作期间，发明了PCR 。

- 1983年4月穆利斯萌发了PCR的构想;
- 1985 关于PCR 的文章首次由Cetus公司Saiki等人在 Science 上 发 表;
- 1987 当年7月Cetus 公司在美国获得PCR基本技术专利批准,并于当年11月推出了第一 个PCR试剂产品及第一台热循环仪;
- 1989 Science 报道了耐热性DNA多聚酶 Taq 酶的 发现,预示着分子时代的到来;
- 1990 Cetus科学家 D.Gelfand和S.Stoffel发明了纯 化Taq DNA 多聚酶的方法;
- 1991 TaqMan 技 术 发 表;
- 九十年代中期PCR临床应用在国内全面展开;
- 1998年 实时荧光PCR技术开始在中国较广泛的应用于临床检测。

Mullis的构思



Kary B. Mullis

<<The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction>>

1989年美国《Science》杂志列PCR 为十余项重大科学发明之首,比喻1989年为PCR爆炸年,Mullis荣获1993年度诺贝尔化学奖。

PCR的应用

- 研究
  - 基因克隆，DNA测序，分析突变
- 诊断
  - 细菌、病毒、寄生虫检测，诊断
- 人类基因组工程
  - 遗传图谱的构建，DNA测序，表达图谱
- 法医
  - 犯罪现场标本分析
- 肿瘤
  - 各种肿瘤检测
- 其他……

2. PCR基本原理

PCR技术的基本原理是DNA的半保留复制，在模板DNA、引物和四种dNTP存在的条件下，依赖于DNA聚合酶的酶促反应。

在体内，DNA复制是周期性的，所以基因扩增的数量有限；PCR技术在体外利用人工合成的引物，再加上DNA聚合酶和一些合适的底物和因子，通过对温度的控制，使DNA不断位于变性、复性和合成的循环中，达到扩增DNA的目的。

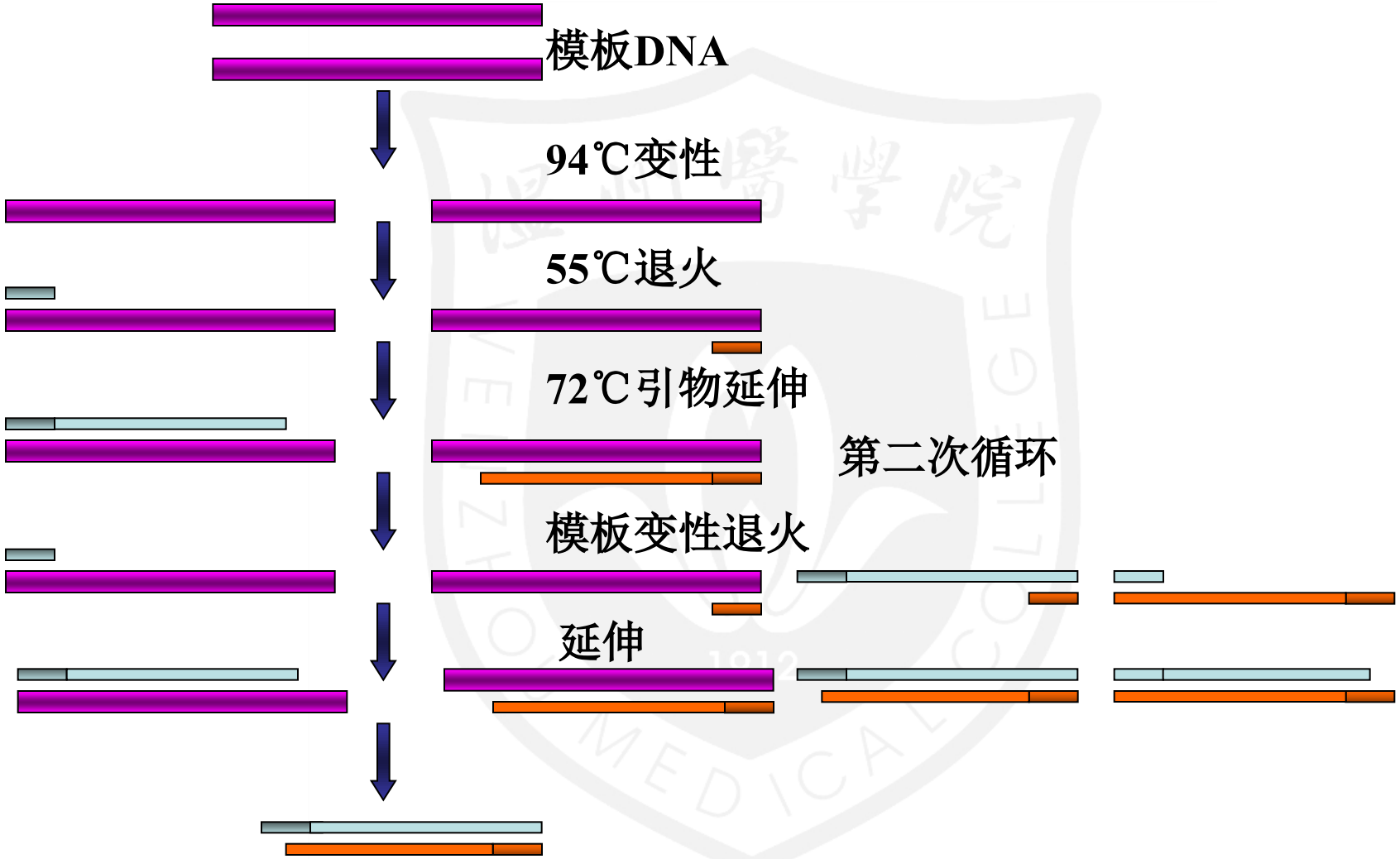
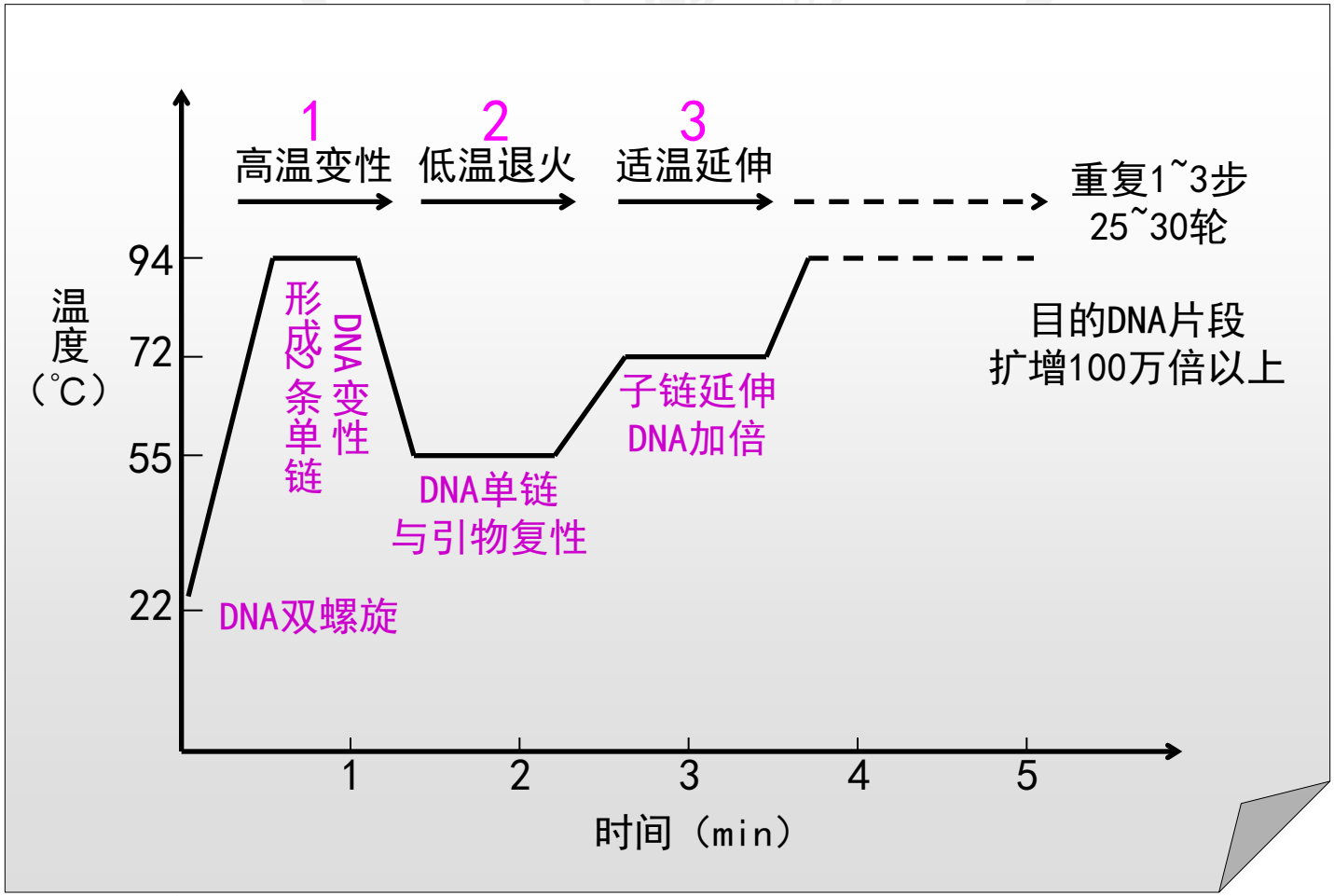
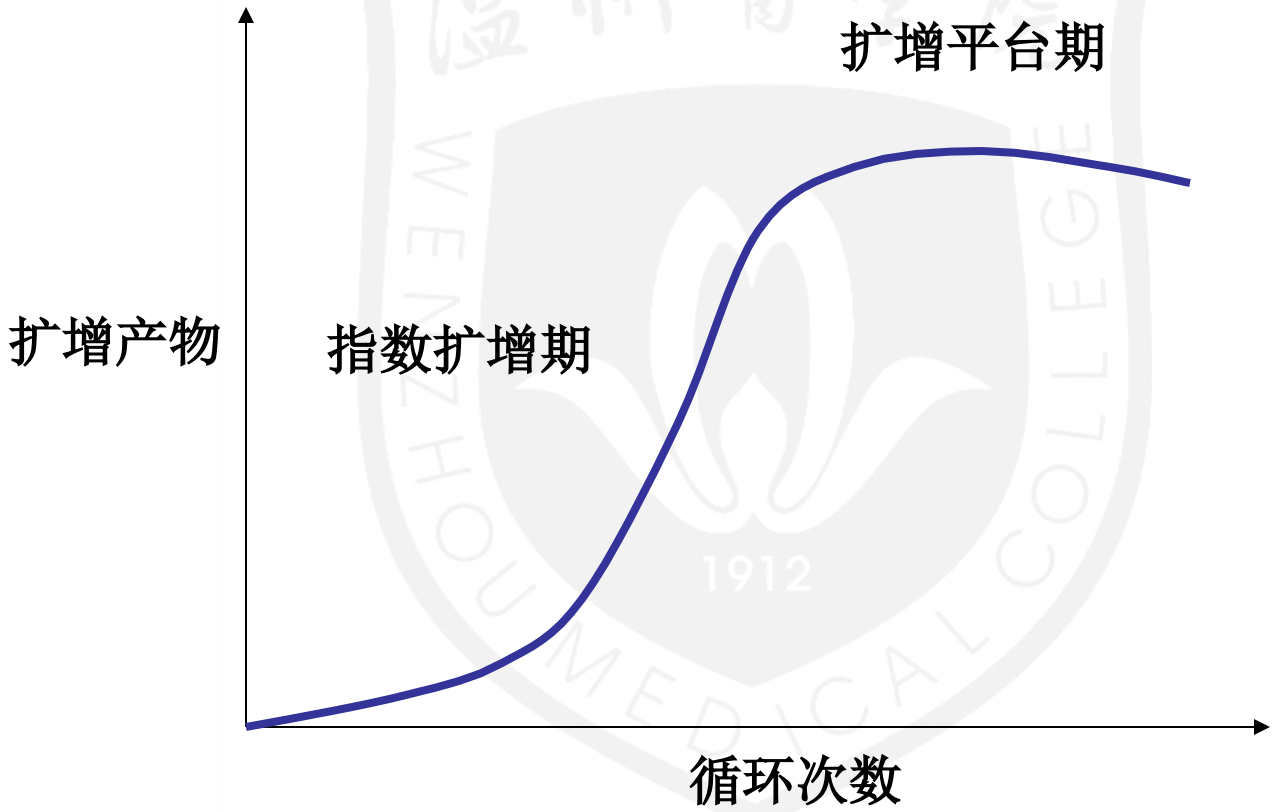


图6-1　PCR原理示意图

PCR的基本原理


1
高温变性
2
低温退火
3
适温延伸
重复1~3步
25~30轮
94
72
55
22
温度（℃）
形成2条单链
DNA变性
DNA单链与引物复性
子链延伸
DNA加倍
目的DNA片段
扩增100万倍以上
DNA双螺旋
1
2
3
4
5
时间（min）

PCR产物生成曲线



PCR的特点

➢灵敏度高

皮克(pg=10^{-12})量级扩增到微克(ug=10-6)水平

能从100万个细胞中检出一个靶细胞

病毒检测的灵敏度可达3个 PFU (空斑形成单位)

细菌检测的最小检出率为3个细菌

➢简便、快速

一次性加好反应液，2～4 小时完成扩增

扩增产物一般用电泳分析

➢对标本的纯度要求低

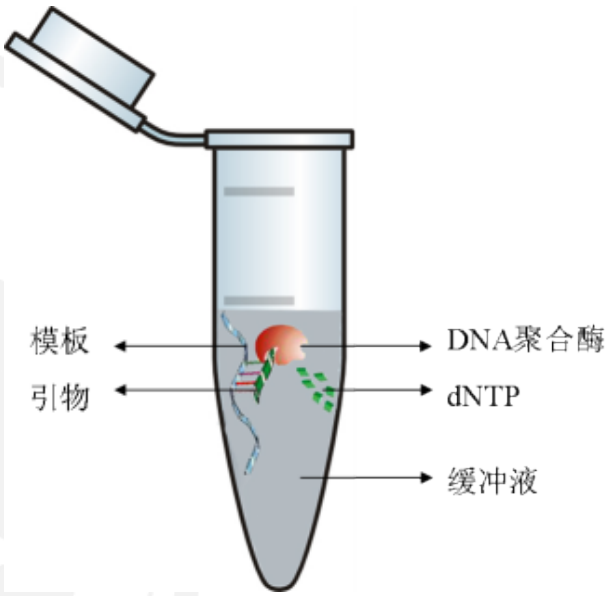
血液、体腔液、洗嗽液、毛发、细胞、活组织等组织的粗提DNA

3. PCR反应体系和反应条件

- 反应体系：（五要素）

  – **模板（template）**

  - DNA
    - 基因组DNA
    - 质粒DNA
  - RNA：总RNA、mRNA、tRNA、rRNA、 病毒RNA



  – **引物(primer)**

人工合成的两段寡核苷酸序列，决定RCP的特异性。

PCR反应成功扩增的一个关键条件在于寡核苷酸引物的正确设计。

引物设计的目的是在两个目标间取得平衡：**扩增特异性和扩增效率**。特异性是指发生错误引发的频率，特异性不好或劣等的引物会产生额外无关和不想要的PCR扩增子；引发效率是指在每一PCR循环中一对引物扩增的产物与理论上成倍增长量的接近程度。

引物设计基本原则

引物的长度

典型的引物为18-24个核苷酸，在一定范围内引物需要足够长，保证序列独特性，并降低序列存在于非目的序列位点的可能性；引物长度的上限主要与反应效率有关，所以一般又不能太长，因为过长会导致其延伸温度大于72℃，即Taq酶的最适温度。

PCR产物长度

一般来说，PCR产物长度对扩增效率有影响。扩增片段长度在普通PCR以200～500bp为宜；实时荧光PCR则为50～150bp。

引物的均衡性和GC含量

引物中碱基组成应尽可能随机分布，避免出现嘌呤或嘧啶碱基堆积现象。有效引物中(G+C)的比例为40-60%，过高(非特异性扩增)或过低（特异性降低）都不利于引发反应。上下游引物的GC含量不能相差太大。

引物溶解温度（Tm值）

引物的Tm值一般控制在**55-60度**，尽可能保证**上下游引物的Tm值一致，一般不超过2度.** 如果引物中的G+C含量相对偏低,则可以使引物长度稍长,而保证一定的退火温度.

$$Tm=2(A+T)+4(C+G)$$

引物自身

引物间3’端的互补、二聚体或发夹结构也可能导致PCR反应失败; 引物3’端的几个碱基与模板DNA需严格配对，并最好为低稳定性结构。

5’端序列对PCR影响不如3’端大，常用来引进修饰位点或标记物。

- DNA 聚合酶(DNA polymerase)

PCR发明初期，不耐热的Klenow片段

耐热的Taq DNA聚合酶

－良好的热稳定性：92.5、95、97.5℃时，半衰期分别为130、40、5～6 min；

－良好的延伸效率：在75～80 ℃时延伸效率最高，每个酶蛋白分子的延伸速度可达150个核苷酸/s；

－无3′－5′外切酶活性，缺乏校正功能；

-dNTP: 包括dATP、dTTP、dGTP、dCTP

- PCR buffer:

一般组成：50mM KCl, 10-50mM, Tris-Cl (室温 PH8.3)，1.5mM $MgCl_2$

KCl：促进引物退火，高浓度KCl抑制Taq DNA聚合酶活性；

Tris-Cl：调节pH值，使反应体系偏碱性；

$MgCl_2$：调节Taq DNA聚合酶活性、影响引物退火，PCR产物的特异性等

PCR反应条件

1）PCR反应成分

（1）模板

一般**100ng DNA模板/100μL**。模板浓度过高会导致反应的非特异性增加。

（2）引物浓度

0.1-0.5 μmol/L

浓度过高易导致模板与引物错配,反应特异性下降。

（3）Taq DNA聚合酶（thermus aquaticus，水生栖热菌)

0.5-5 U/100 μl

酶量增加使反应特异性下降;酶量过少影响反应产量。

（4）dNTP

dNTP浓度取决于扩增片段的长度

四种dNTP浓度应相等

浓度过高易产生错误碱基的掺入,浓度过低则降低反应产量

dNTP可与Mg^{2+}结合,使游离的Mg^{2+}浓度下降,影响DNA聚合酶的活性。

（5） Mg^{2+}

Mg^{2+}是DNA聚合酶的激活剂。

0.5mmol/L-2.5mmol/L反应体系。

对于大多数的PCR引物来说， Mg^{2+}浓度为1.5mmol/L是适宜的，如果扩增效果不好，则调整镁离子的浓度可能会有所帮助。

Mg^{2+}可与负离子结合,所以反应体系中dNTP、EDTA等的浓度影响反应中游离的Mg^{2+}浓度。

2）循环参数

热启动：在第一轮扩增前必须使模版DNA完全变性，一般94℃，变性5分钟

(1)变性

使双链DNA解链为单链

94℃, 30s～1min。

(2) 退火

温度由引物长度和GC含量决定，一般比引物Tm值约低5℃。

增加温度能减少引物与模板的非特异性结合;降低温度可增加反应的灵敏性，但特异性低。

（3）延伸

70-75℃,一般为72℃

延伸时间由扩增片段长度决定。（1~3 min)

（4）循环次数

主要取决于模版DNA的浓度

一般为25-30次

次数过多：产生“平台效应”

错误掺入率增加

4. PCR扩增产物的检测方法

- 凝胶电泳：琼脂糖凝胶电泳法 、聚丙烯酰胺凝胶电泳法
- PCR-限制性片段长度多态性分析法（PCR-RFLP）
- 单链构型多态性分析法（PCR-SSCP）
- 核酸探针杂交法
- PCR产物测序
- 荧光PCR

（一）琼脂糖凝胶电泳法

- 基本原理：
  - DNA在电泳缓冲液中带负电荷，将PCR产物点样于负极端的加样孔，在电场力的作用下DNA涌向正极，并且由于电荷效应和分子筛效应，不同DNA分子量及构型的DNA涌动率不同；
  - 在电泳过程中，凝胶中的EB将嵌入DNA分子中，在紫外线照射下，EB-DNA复合物发出橙红色荧光，荧光强度与DNA含量成正比；
  - 不同浓度的凝胶分辨DNA的有效范围不同。

操作简单，但存在EB污染。

聚丙烯酰胺凝胶电泳特点及用途

- 特点：
  - 分辨力高，长度仅相差1bp的DNA分子即可分开；
  - 上样量远大于琼脂糖凝胶；
  - 回收的DNA纯度高；
  - 采用银染色DNA或RNA，灵敏度高，比琼脂糖凝胶电泳中EB染色法高2-5倍，而且避免EB易退色的弱点。
- 用途：PCR扩增指纹图、多重PCR、PCR产物限制性片段长度多态性（PCR-RFLP）分析。

(二)PCR-限制性片段长度多态性分析法

（polymerase chain reaction based on restriction fragment length polymorphism，PCR-RFLP）

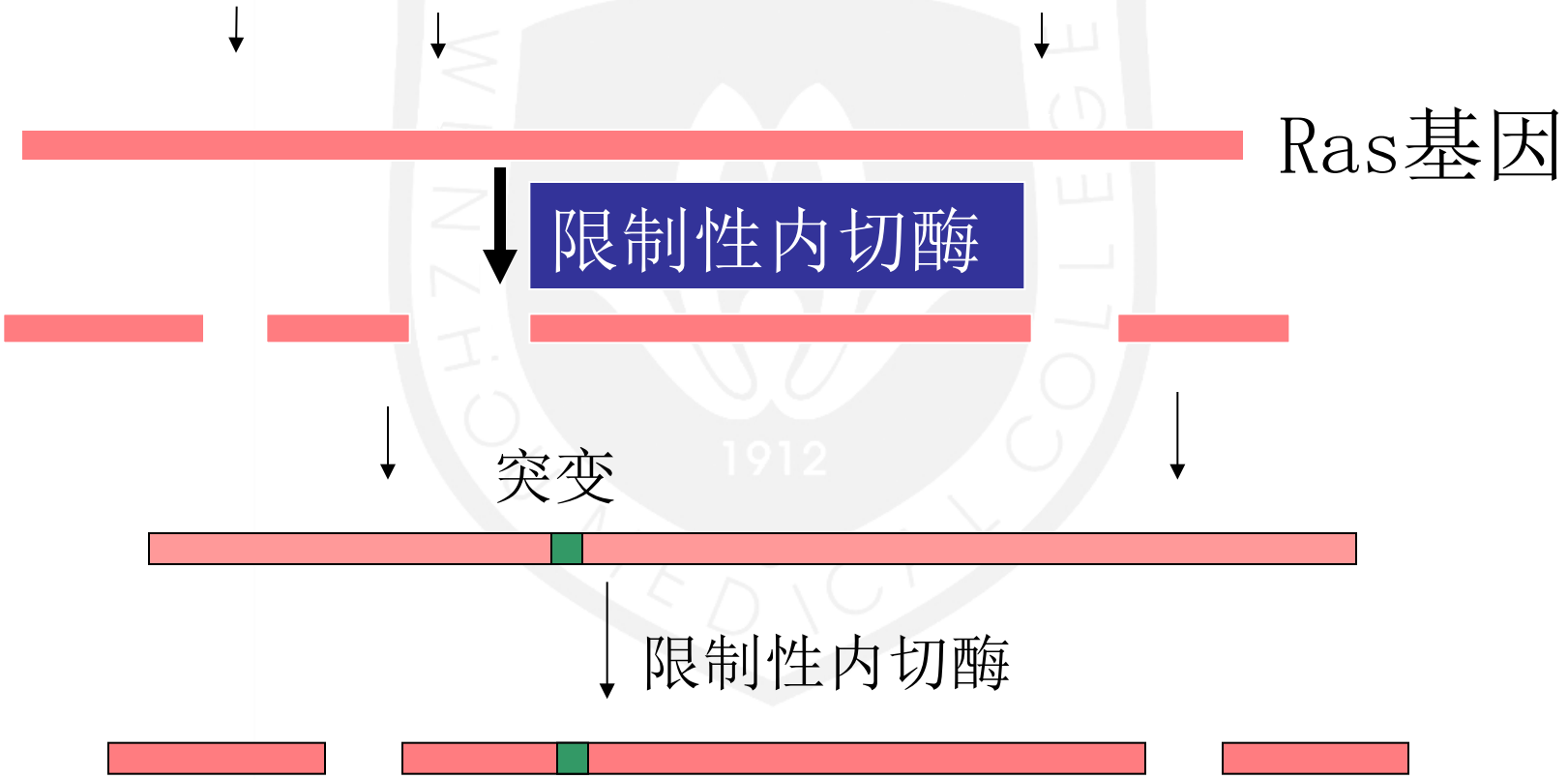
- 不同的限制性核酸内切酶可识别特异DNA序列，所以用特定的限制性核酸内切酶对目的DNA分子进行消化，得到的酶切片段其大小和数量可以在一定程度上反应出目的DNA分子的序列信息

用途：传染病病原体基因分型　人类基因的变异性研究。

是诊断遗传病和传染病病原体基因分型的常用方法

恶性肿瘤（癌基因或抑癌基因）

PCR-RFLP法：



（三）单链构型多态性分析法（PCR-Single Strand Conformation Polymorphism，简称PCR-SSCP）

- 本法就是将PCR 产物双链DNA（dsDNA）变性为单链DNA （ssDNA），加样于变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，由于DNA 分子在凝胶中的电泳迁移率与其分子量和空间结构有关，而空间结构又与ssDNA序列有关。因此，电泳结束后，ssDNA带位置的差异即可反映出PCR产物序列的差异。

PCR-SSCP过程

过　程

primer

↓ ^{32}P-dNTP掺入　PCR扩增

产物

↓

变性

↓

单链DNA

↓

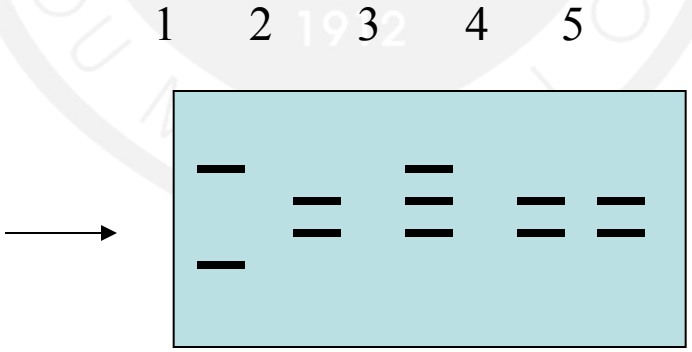
中性聚丙烯酰胺凝胶电泳

↓

自显影

↓

结果分析

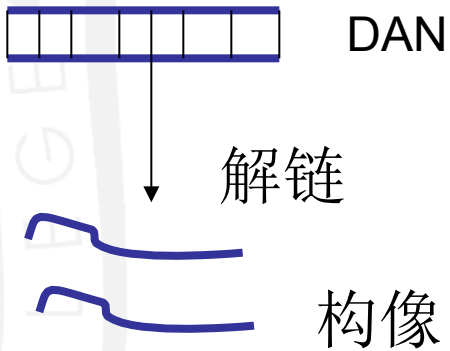


1.为正常

2、4、5纯合患者

3.为杂合子

原　理



优点及作用：方法简便、快速、灵敏，不需要特殊的仪器，适合临床实验的需要。该方法和其他方法相比有较高的检测率。首先，它可以发现靶DNA片段中未知位置的碱基突变。**经实验证明小于300bp的DNA片段中的单碱基突变，90%可被SSCP发现**，另外，SSCP方法可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将不同迁移率的突变单链DNA分离，并且还可以进一步提纯。用这种方法可以最终从DNA序列水平上鉴别突变DNA片段。

不足之处：只能作为一种突变检测方法，**要最后确定突变的位置和类型，还需进一步测序**；电泳条件要求较严格；另外，由于SSCP是依据点突变引起单链DNA分子立体构象的改变来实现电泳分离的，这样就可能会出现当某些位置的点突变对单链DNA分子立体构象的改变不起作用或作用很小时，再加上其他条件的影响，使聚丙烯酰胺凝胶电泳无法分辨造成漏检。

（四）核酸探针杂交法

(1)点杂交（dot blot）

(2)反向点杂交（reverse dot blot）

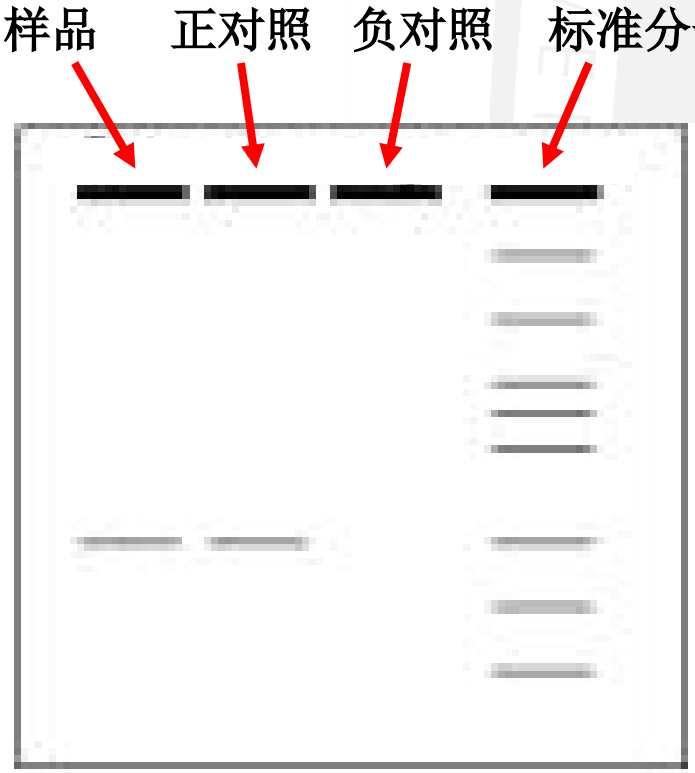
(3)微孔板夹心杂交（microplate hybridization）

(4)荧光探针杂交

(5)Southern印迹杂交（Southern blot）

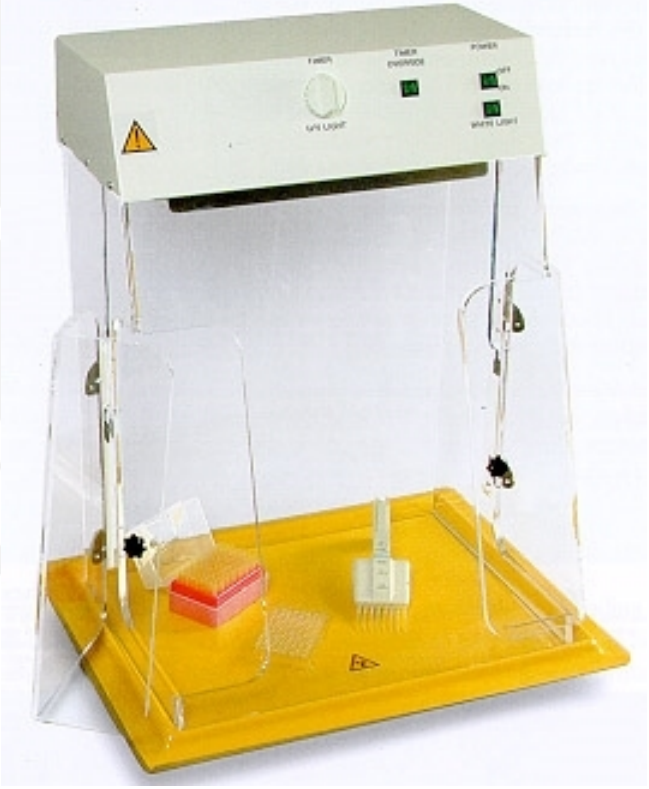
5. PCR常见问题及分析

污染是PCR实验的常见问题。只要实验室里曾经扩增过某个片段，就有可能以后的实验中发生污染。



因此，做实验的时候绝对不要忘了负对照。

用紫外灯破坏污染物也是一个办法



（1）假阳性

①PCR产物是最主要的污染源。

②阳性对照的污染。

③标本之间的交叉污染。

④在采集标本时，其他污染源带来的污染。

⑤使用带有污染的试剂。

预防措施：

(2) 假阴性

假阴性是PCR反应中另一个易出现的问题。造成的原因也比较多。可以归纳以下几方面原因。

- 1)标本处理的原因。

  ①处理标本时，靶DNA丢失。

  ②处理标本时，杂质成分没有去除干净，带入PCR反应中抑制了Taq酶活性。

  ③标本放置不当，模板发生降解（尤其是RNA）。

- 2)PCR试剂问题。
  - ① 引物设计不合理。
  - ② Taq DNA聚合酶失活。
  - ③ Mg2+浓度过低或是没有加。
- 3)PCR扩增过程中的问题
  - ①PCR扩增仪故障。
  - ②PCR扩增反应液没有加液体石蜡油。
- 4) PCR产物鉴定中的问题
  - ①电泳时没有加溴化乙锭。
  - ②电泳缓冲液和凝胶使用次数过多。
  - ③凝胶浓度过低，使扩增带跑散。

(3) 引物二聚体

形成引物二聚体的原因有：

(1)两个相同的或不同的引物分子之间有较多的碱基配对，特别是引物3′端有互补区。

(2)引物比例太高，可增加模板用量。

(3)退火温度过低。

(4)热循环次数过多。

（4）非特异性PCR产物

造成非特异性PCR产物的常见原因及其预防措施：

① 引物特异性不高或用量太大，应更换引物或降低用量；

②TaqDNA聚合酶质量不好或用量太大，应更换酶或降低酶使用量；

③ Mg2+浓度过高，可适当调整其浓度；

④退火温度过低，可提高退火温度；

⑤延伸时间过长，可减少延伸时间；

⑥热循环次数过多，应适当增加模板量，减少循环次数。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：https://d.book118.com/515242031241012010