

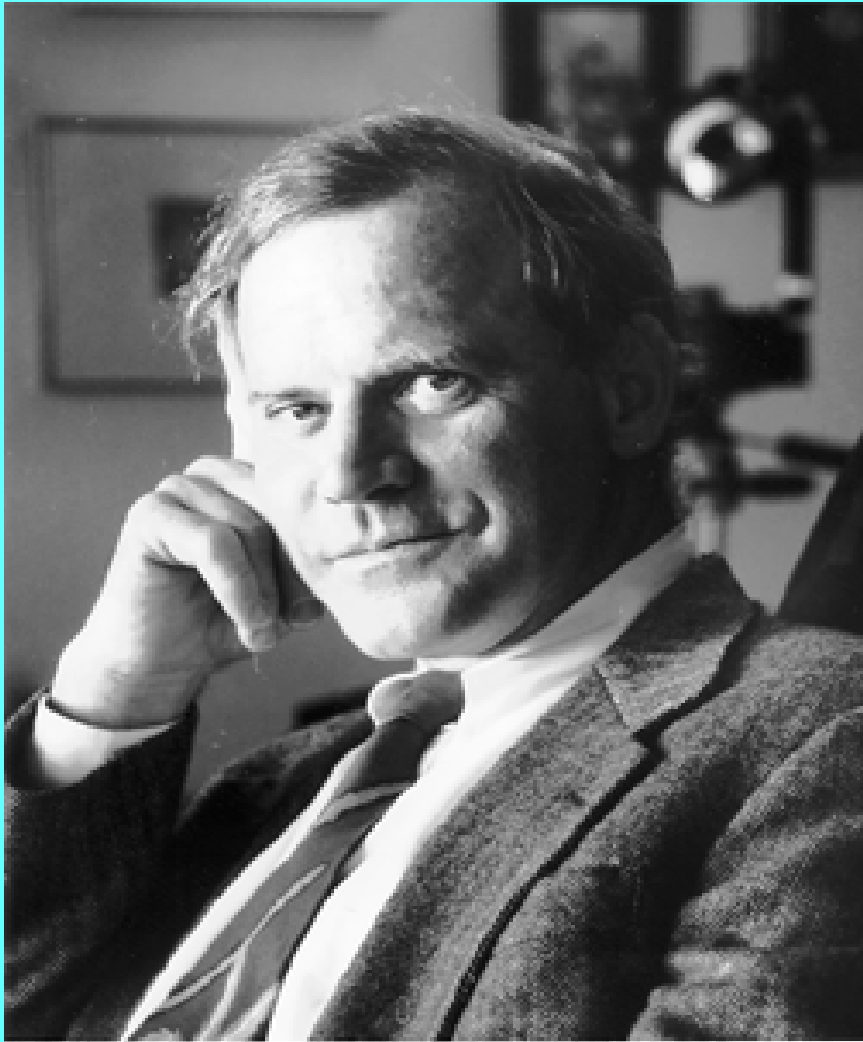
PCR的发明，应用现状 及未来发展趋势

黄伟达，复旦大学生物化学系

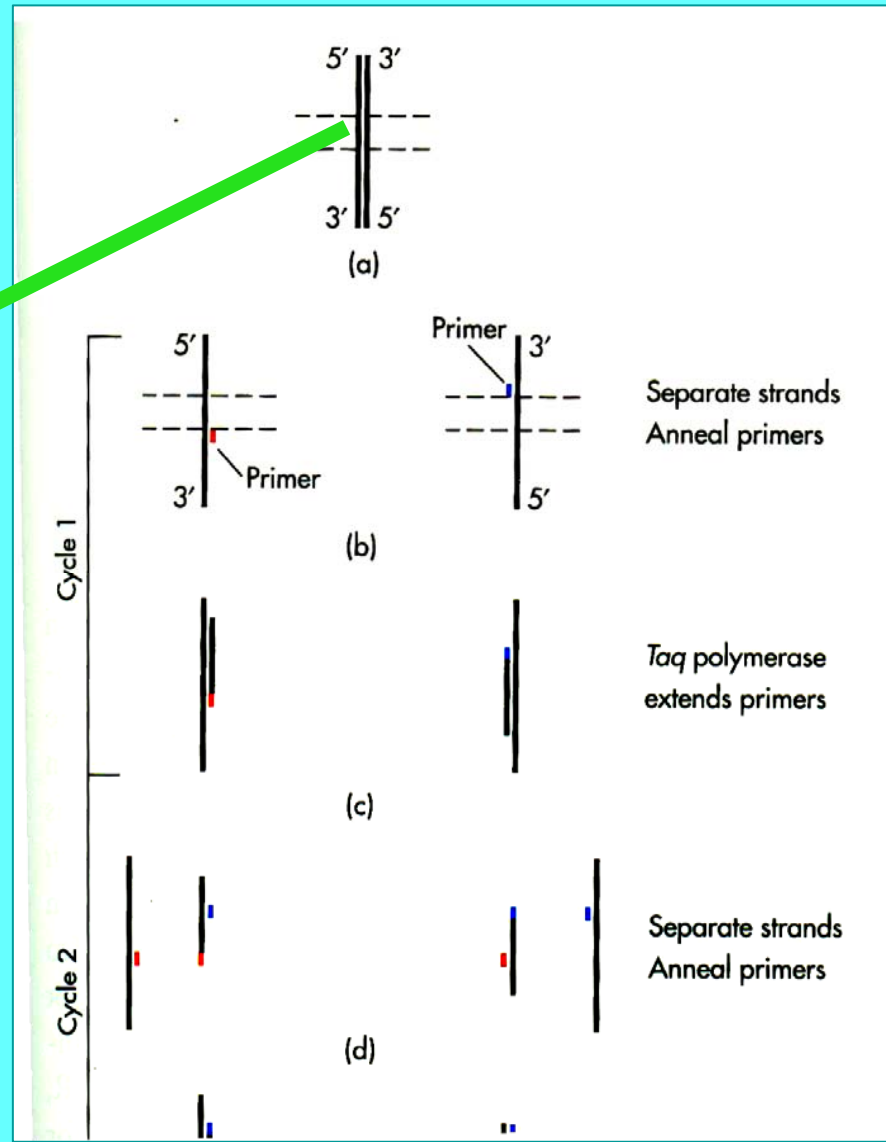
2004年12月3日于杭州博日科技研讨会

故事发生在1983年
的春夏之交

很少有在公司工作的科研人员得诺贝尔奖， **Mullis**是其中之一

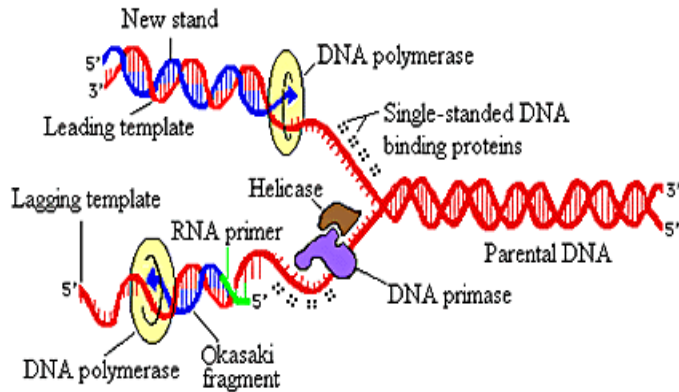


Kary B. Mullis (1944 -), 在**Cetus**公司工作期间，发明了**PCR**。他原本是要合成**DNA**引物来进行测序工作，却常为没有足够多的模板**DNA**而烦恼。**1983**年春夏之交的一个晚上，他开车去乡下别墅的路上萌发了用**两个**引物（**而不是一个引物**）去扩增模板**DNA**的想法.....



Mullis开车的时候, 瞬间感觉两排路灯就是DNA的两条链, 自己的车和对面开来的车象是DNA聚合酶, 面对面地合成着DNA,

Mullis的第一个PCR实验



**Collaboration of Proteins
at the Replication Fork**

1983年9月中旬。
Mullis在反应体系中加入DNA聚合酶后在37℃一直保温。结果第二天在琼脂糖电泳上没有看到任何条带。于是他

认识到有必要用加热来解链，每次解链后再加入DNA聚合酶进行反应，依次循环。
1983年12月，他终于看到了被同位素标记的PCR条带。

PCR的发展史

- 1983年春，Mullis发展出PCR的概念；
- 1983年9月，Mullis用大肠杆菌DNA聚合酶做了第一个PCR实验，只用一个循环；
- 1983年12月，用同位素标记法看到了10个循环后的49 bp长度的第一个PCR片断；
- 1985年12月20日，Mullis的同事Saiki在Science上发了一篇论文，方法中用了PCR技术，导致Mullis的文章到处被拒；
- 1985年10月25日申请了PCR的专利，1987年7月28日批准（专利号4,683,202），这回Mullis是第一发明人。
- 1986年5月，Mullis在冷泉港实验室做专题报告，全世界从此开始学习PCR的方法；
- 1986年6月，Cetus公司纯化了第一种高温菌DNA聚合酶，Taq DNA polymerase，这是85年春天Mullis建议做的；
- 1988年，第一台PCR仪问世；
- 1991年，Hoffman LaRoche以3亿美元的代价从Cetus公司获得全权开发权。

RESEARCH ARTICLE

**Enzymatic Amplification of β -Globin
Genomic Sequences and Restriction Site
Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia**

Randall K. Saiki, Stephen Scharf, Fred Faloona, **Kary B. Mullis**
Glenn T. Horn, Henry A. Erlich, Norman Arnheim

The authors are in the Department of Human Genetics, Cetus Corporation, 1400 Fifty-Third Street, Emeryville, California 94608. The present address for N.A. is Department of Biological Sciences, University of Southern California, Los Angeles 90089-0371.

SCIENCE, VOL. 230

States Patent

4, 683, 202
*** July 28, 1987**

for amplifying nucleic acid sequences

Inventors: **Mullis; Kary B.** (Kensington, CA)

Assignee: **Cetus Corporation** (Emeryville, CA)

[*] Notice: The portion of the term of this patent subsequent to July 28, 2004 has been disclaimed.

Appl. No.: **791308**

Filed: **October 25, 1985**

PCR不只是一个方法改进

- **Mullis**的上司有句“名言”，“我们要扩增这么多**DNA**样品有什么用”；
- 到了**1991**，**Cetus**公司以**3亿美元**的转让费将**PCR**相关专利转让给瑞士**Hoffman LaRoche**公司，并在此后的经营中又获得了**数亿美元**的分红；
- **Mullis**于**1993**年获得**诺贝尔化学奖**，**PCR和DNA重组技术**一样意义深远。

PCR的应用领域

生物学领域几乎无处不用

- 基因、**DNA**片段的克隆
- 人工基因构建
- **DNA**序列测定
- 基因定点突变
- 基因型（突变）检测
- **SNP**分析，遗传背景分析
- 生物物种鉴定，系统进化研究
- 基因表达量研究（real-time PCR） /
基因表达谱研究（DNA chip, SAGE）



医学领域

- 疾病基因检测 / 遗传病的产前诊断
- 致病病原体的检测
- 肿瘤治疗中癌基因的检测

会推广到大部分疾病治疗前的检测

- **DNA**指纹、个体识别、亲子关系鉴别、法医物证
- **其他：动、植物检疫**（转基因动植物检测）

PCR仪器的变迁

- 三个水浴锅， 用手移动 (Mullis等人当时用的)
- 电加热块 + 自来水冷却 (PE, 1988)
- 电加热块 + 内置循环液冷却 (PE, 1989)
- 三个加热块 + 机械手 (Stratagene, 1994)
- 半导体制冷和加热 (MJ, PE, BioMetra, Eppendorf)
- 温度梯度, 荧光检测 (如 Roche的Lightcycler)
- 风加热
- **Lab-on-chip式的PCR仪(所谓的芯片PCR)**

中国的状况

- 1991年出现三个水浴锅+机械手的原始PCR仪 (华美, 复日等)
- 现在以半导体 (Peltier板) 制冷式为主 (杭州博日, 上海天呈, 厦门安普利等)

耐高温DNA聚合酶的种类

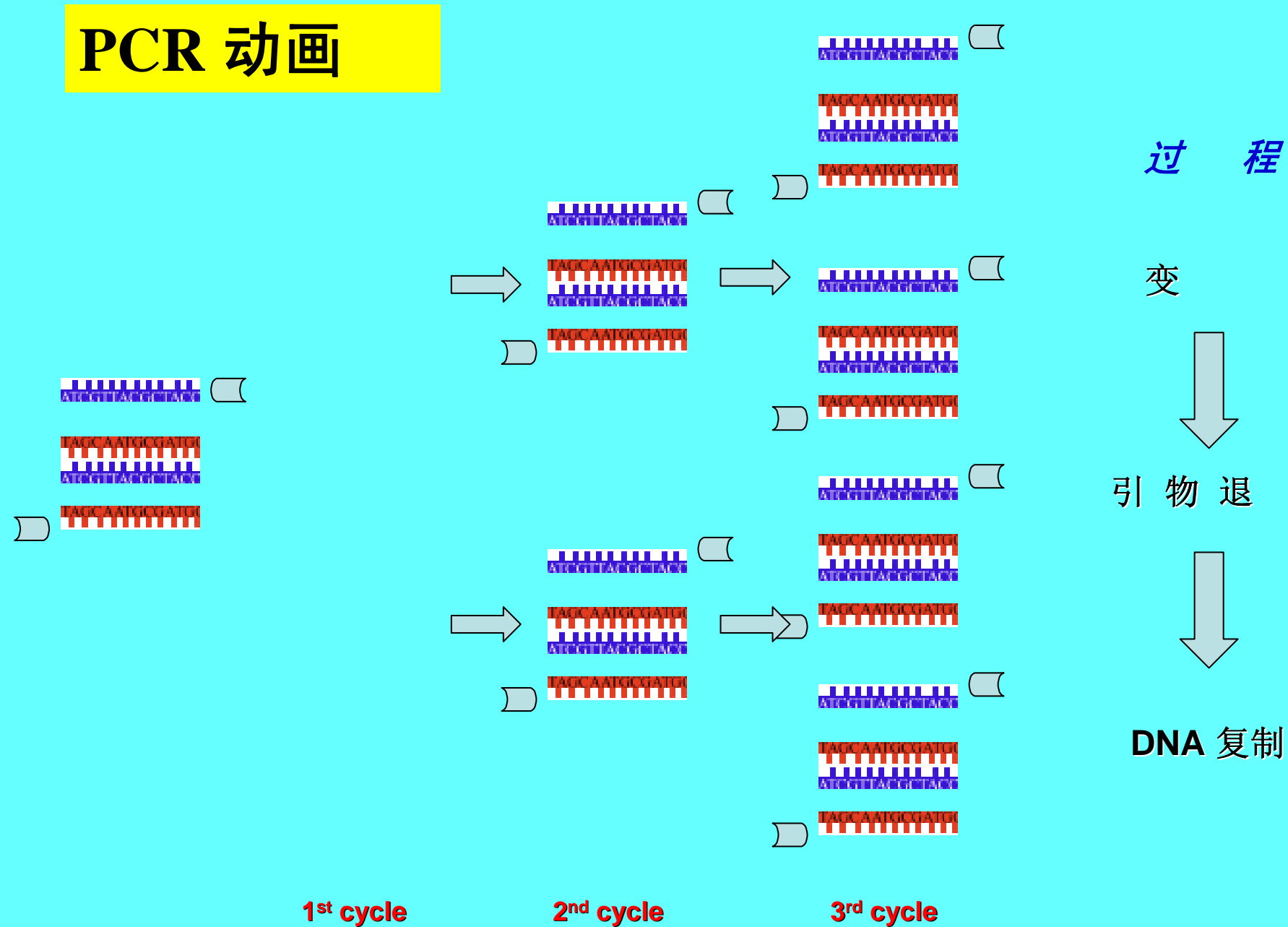
- ***Taq* DNA聚合酶** (*Thermus aquaticus*, Cetus/Roche)
- ***Tth* DNA聚合酶** (*Thermus thermophilus*, Toyobo)
- ***Pfu* DNA聚合酶** (*Pyrococcus furiosus*, Stratagene)
- **Deep Vent DNA聚合酶 (Bio-labs)**
- ***Tfi* DNA聚合酶** (*Thermus flavus*, Promega)
- ***Tli* DNA聚合酶** (*Thermococcus litoralis*, Promega)
- **Vent DNA聚合酶 (Bio-labs)**
- ***Pwo* DNA聚合酶** (*Pyrococcus woesei*, Roche)
- ***Pfx* DNA聚合酶** (*Thermococcus kodakaraensis*, Invitrogen)
- ***Dynazyme* DNA聚合酶** (*Thermus brockianus*, Finnazyme)
- ***FD* DNA聚合酶** (*Thermus sterophilus?* , 复旦大学)
- *Tma, Tne, KOD,*

PCR相关的术语和产品层出不穷

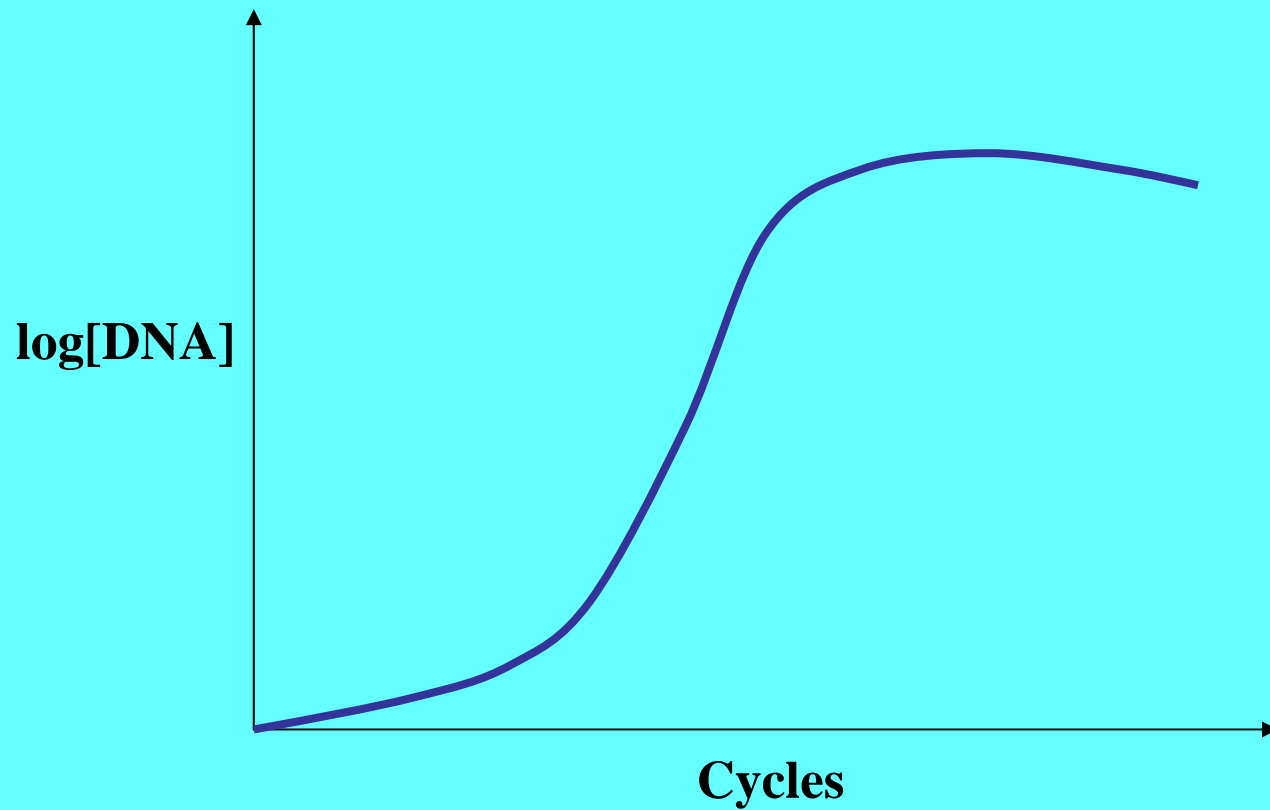
- T-vector
- HotStart Taq
- RT-PCR
- RAPD-PCR
- DDRT-PCR
- LM-PCR
- Inverse PCR
- Nested PCR
- Real-time PCR
- RACE
- Flow chip PCR
- TAS
- Multiplex PCR
- Immuno PCR
- Asymmetric PCR
- LP-PCR
- NASBA
- Recombinant PCR
- AFLP
- SSCP
- *In situ* PCR
- TaqMan/SYBR green

从定性到定量的革命

PCR 动画



PCR产物生成曲线



PCR

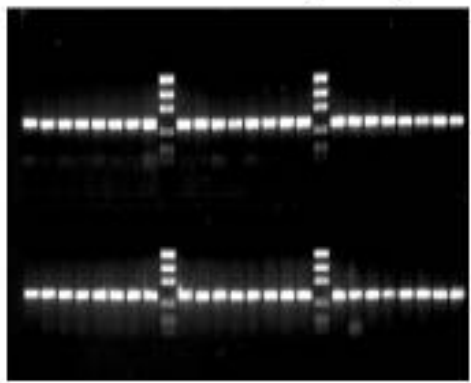


琼脂糖凝胶电泳

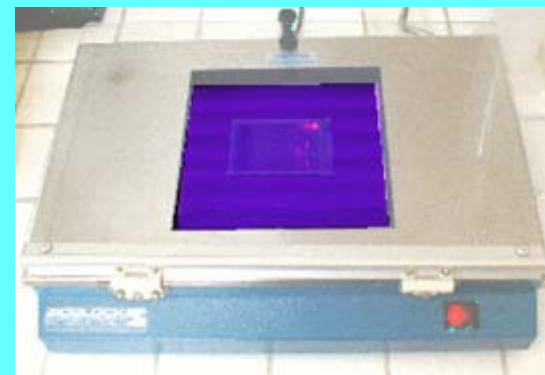


3-4 小时

Reliable PCR from Every Sample



最终产物

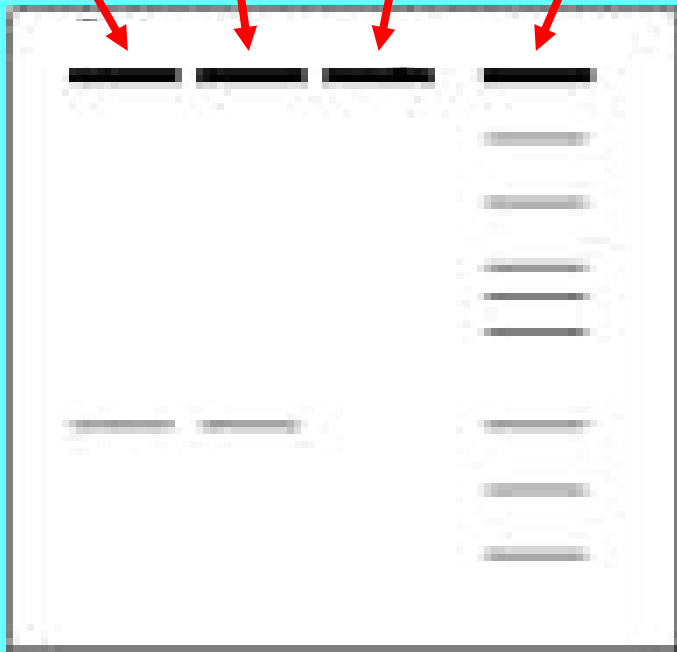


紫外光观察

PCR具有极高的灵敏度

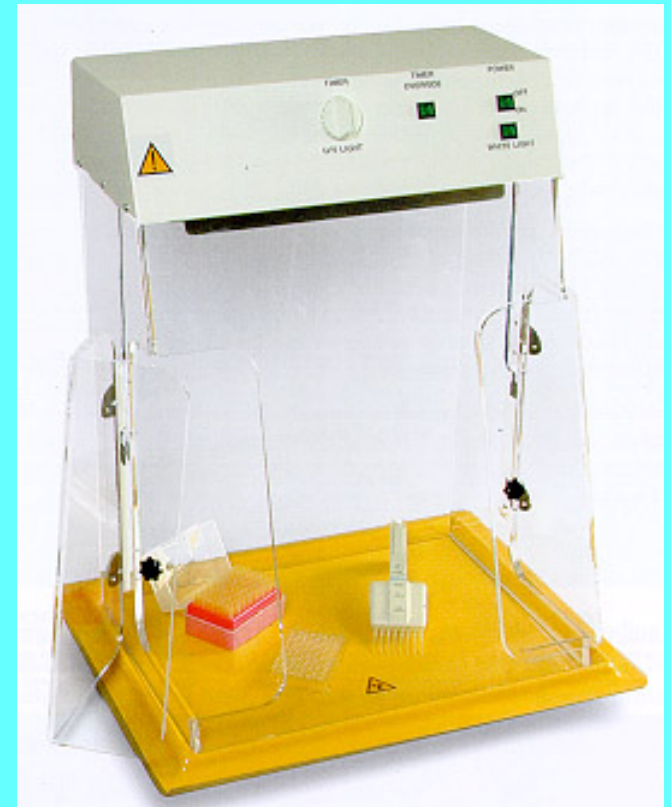
污染是PCR实验的常见问题。只要实验室里曾经扩增过某个片段，就有可能以后的实验中发生污染。

样品 正对照 负对照 标准分子量

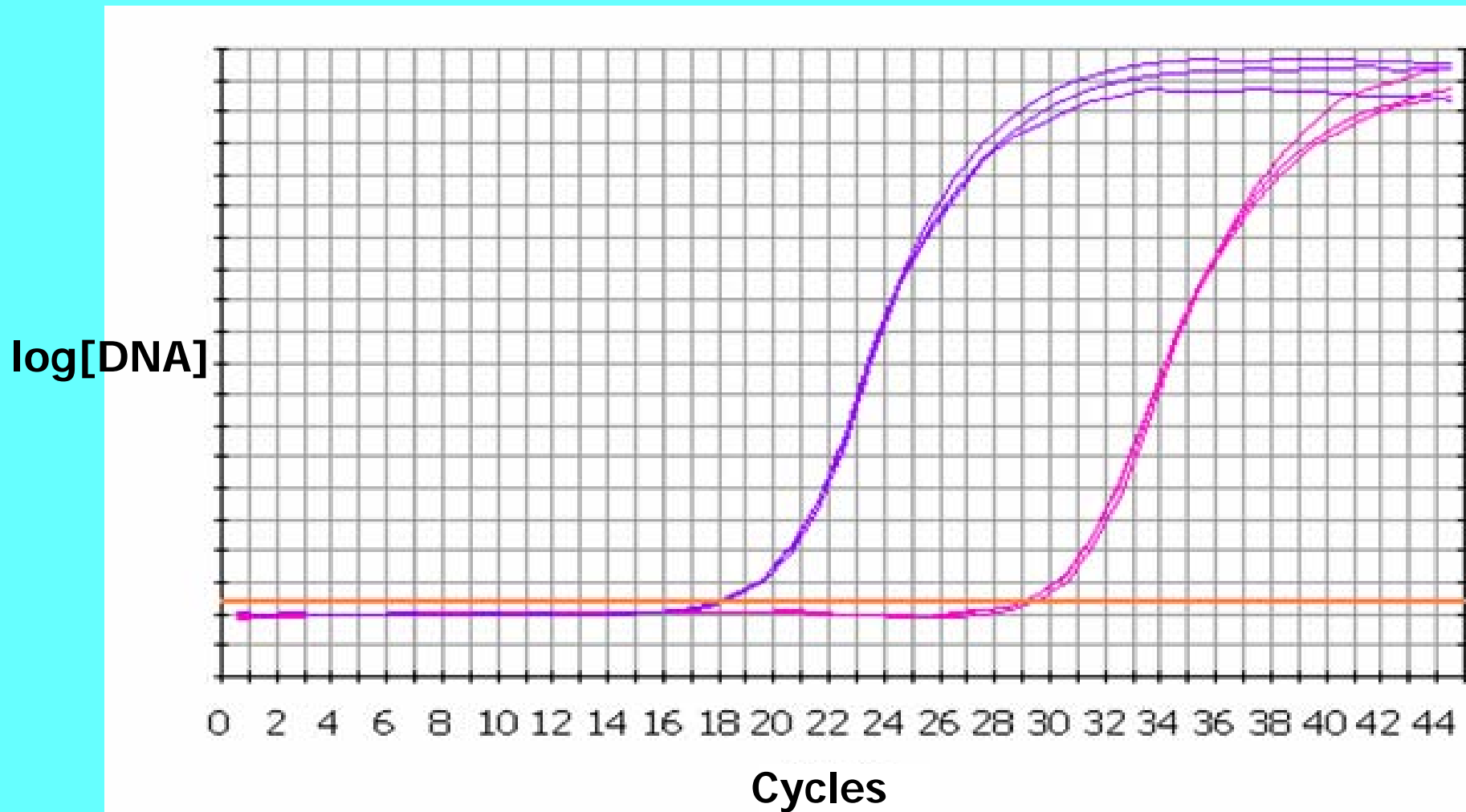


因此，做实验的时候绝对不要忘了负对照。

用紫外灯破坏污染物也是一个办法



不同样品有不同的生成曲线

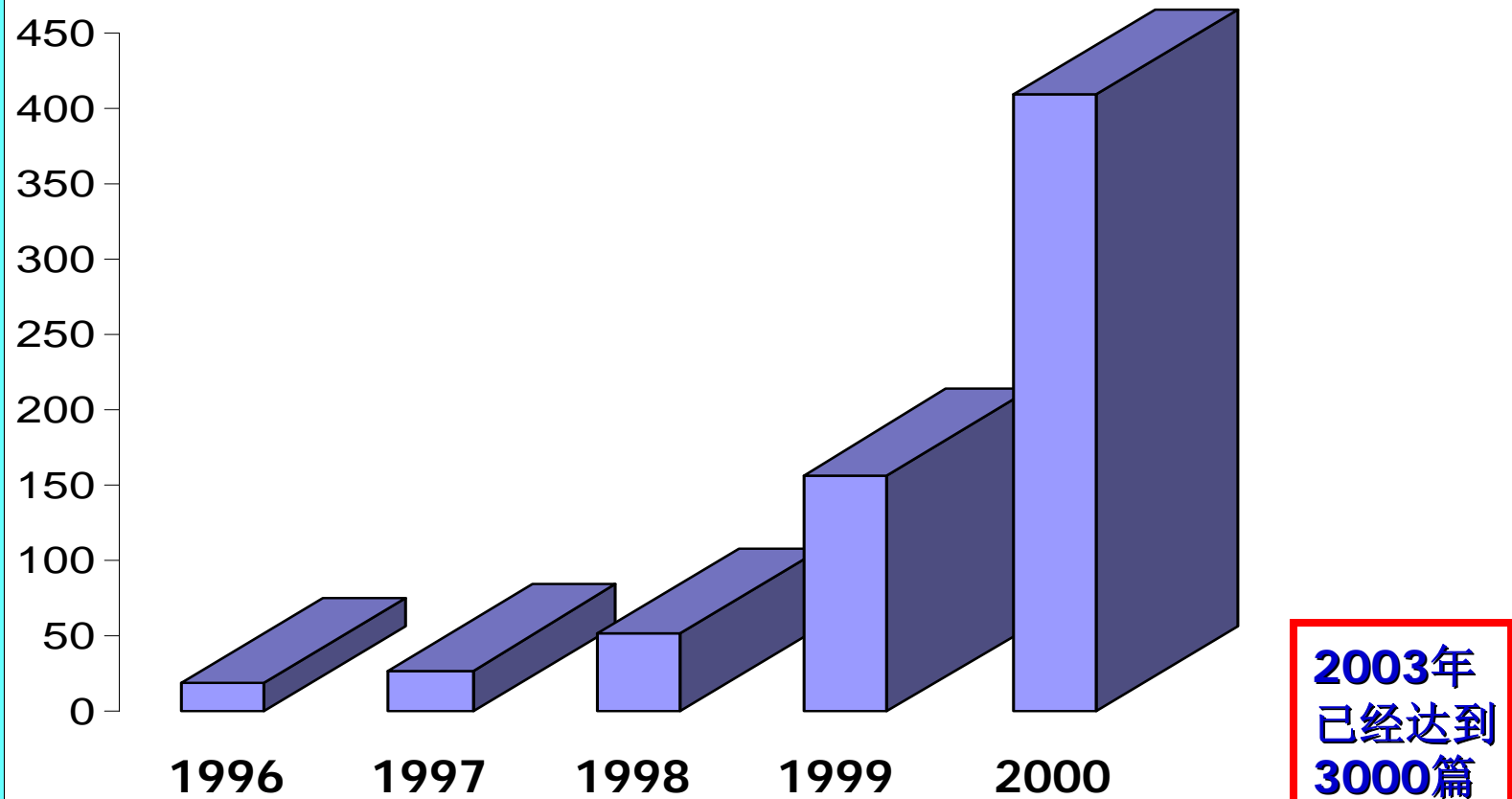


普通PCR和定量PCR的区别

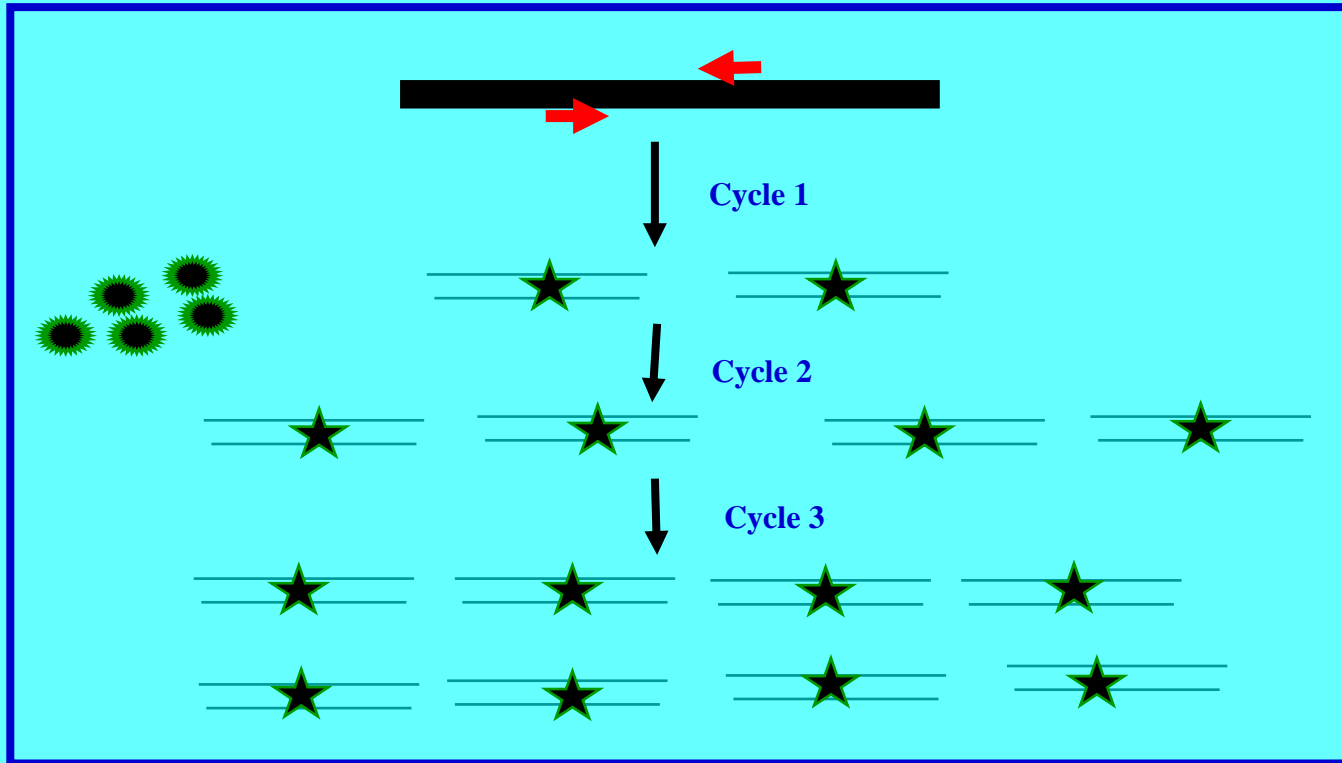
- 适用定性分析，不适合定量分析；
- **PCR** 产物的长度从 **100bp** — 数**kb**

- 实时检测:每个循环都产出荧光信号
- 绝对定量，灵敏度更高
- **PCR**产物的长度一般在 **60-150 bps**

定量PCR相关的近年来 国际学术刊物上发表的论文数



Real-Time PCR, SYBR green

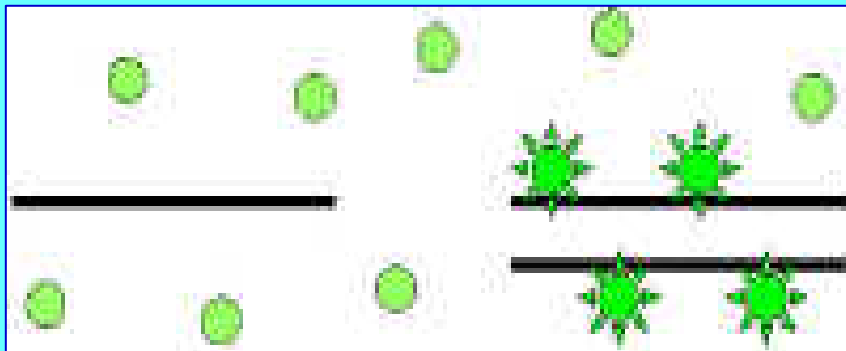


Molecular
Probe公司
的一个专利
产品，

US Patent

5,436,134

1993年7月
12日申请

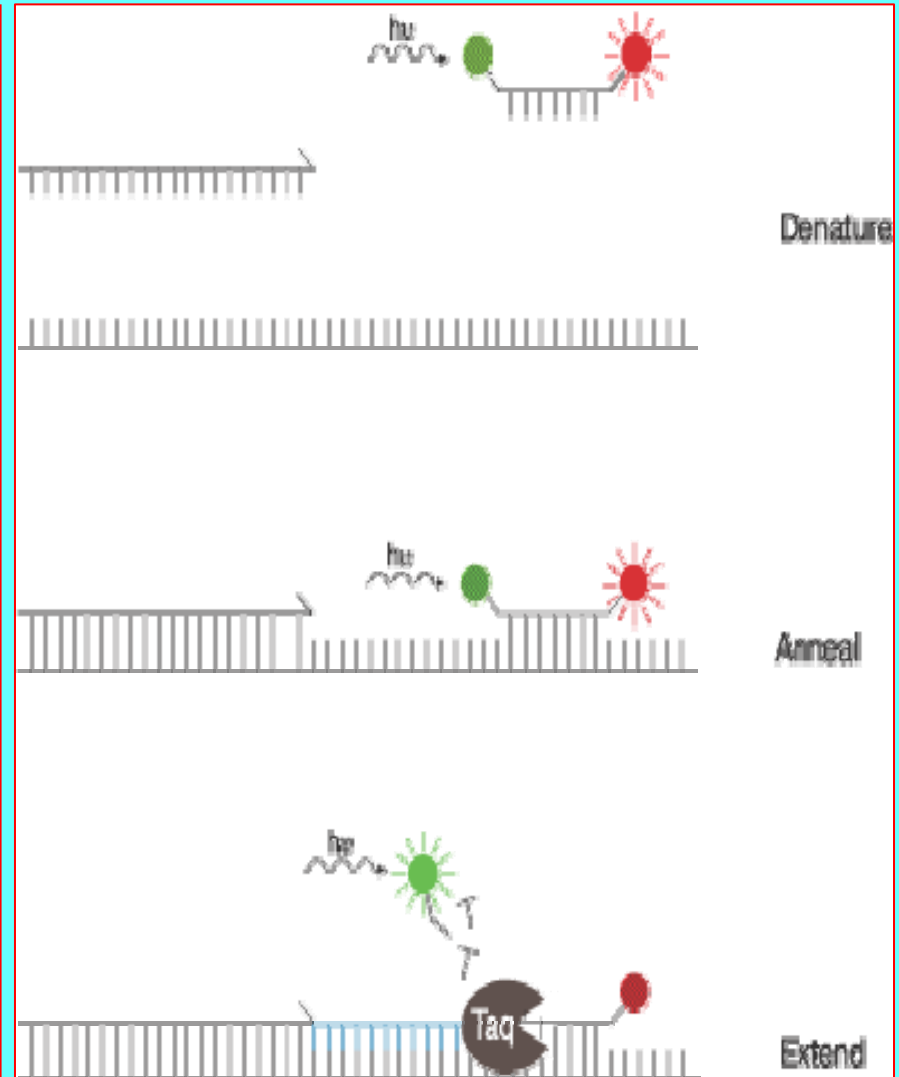
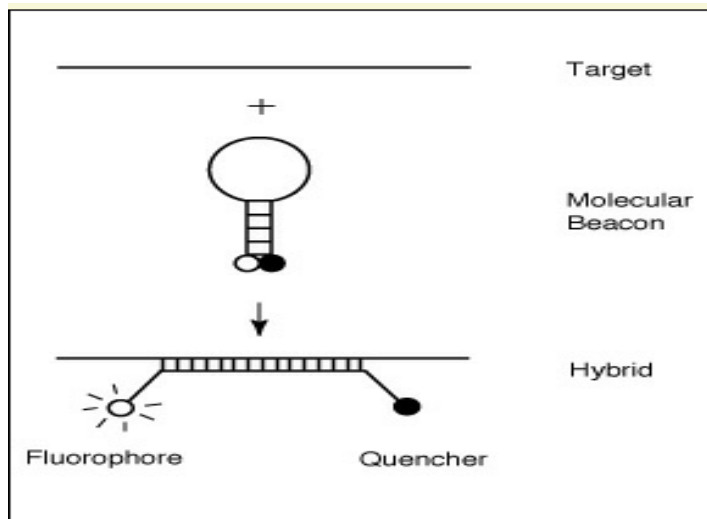


SYBR green 的优缺点

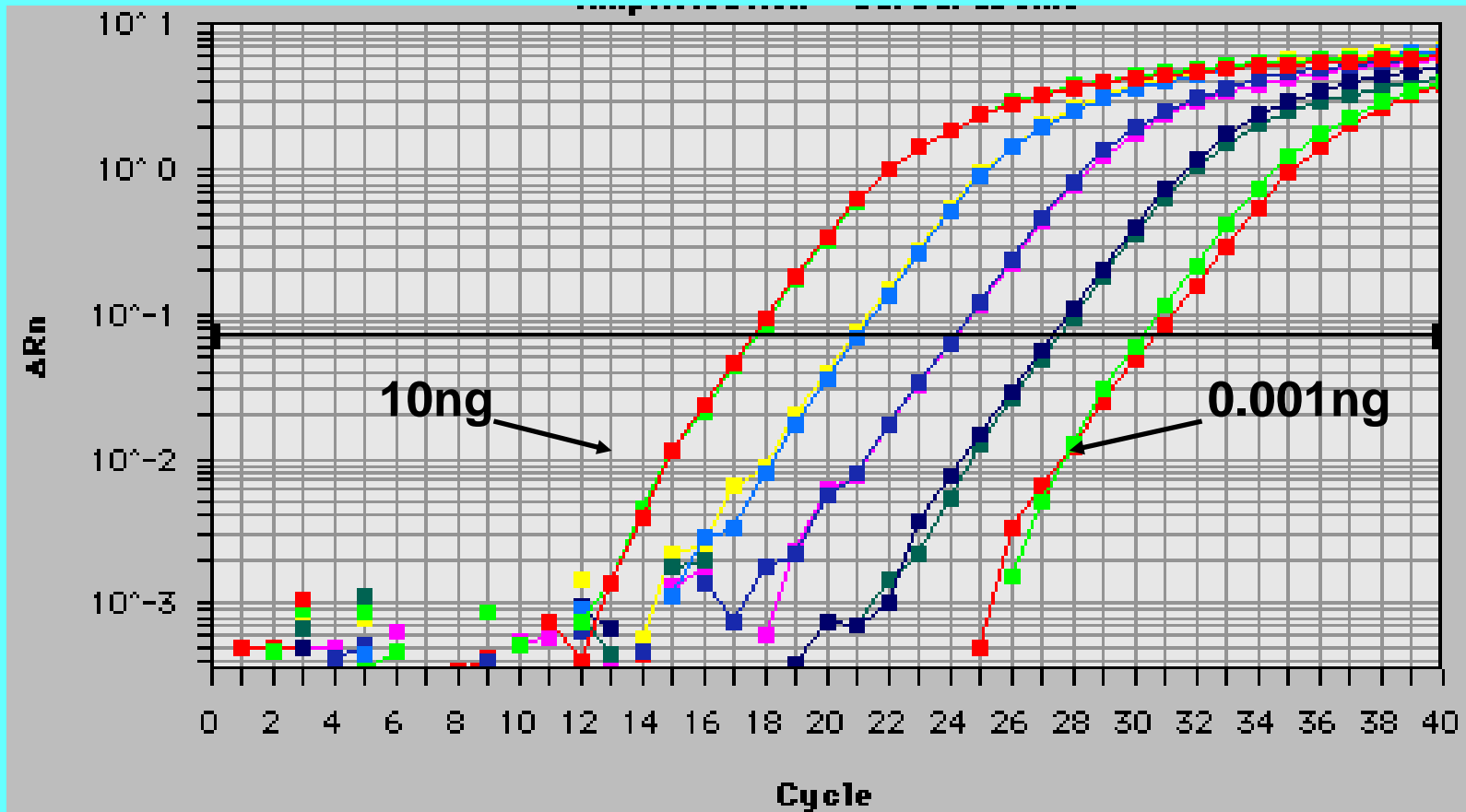
- 简便
 - 可以使用已有的引物
- 普遍通用
 - 可以检测所有的双链**DNA**，包括引物二聚体；
 - 需要化大力气优化反应条件，以消除非特异性扩增；
- 价格
 - **\$1 / PCR** 反应
- 定量的灵敏度有所欠缺

定量 PCR, TaqMan体系

- **ABI 公司首先推出(PRISM 7000系列) US Patent 5,723,591, 1995年11月申请。**
- **实时检测:**
每个循环都会产生与**PCR**产物成正比的**荧光物质**



TaqMan系统的一个例子



Titrate a template; 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 ng

Taqman的优缺点

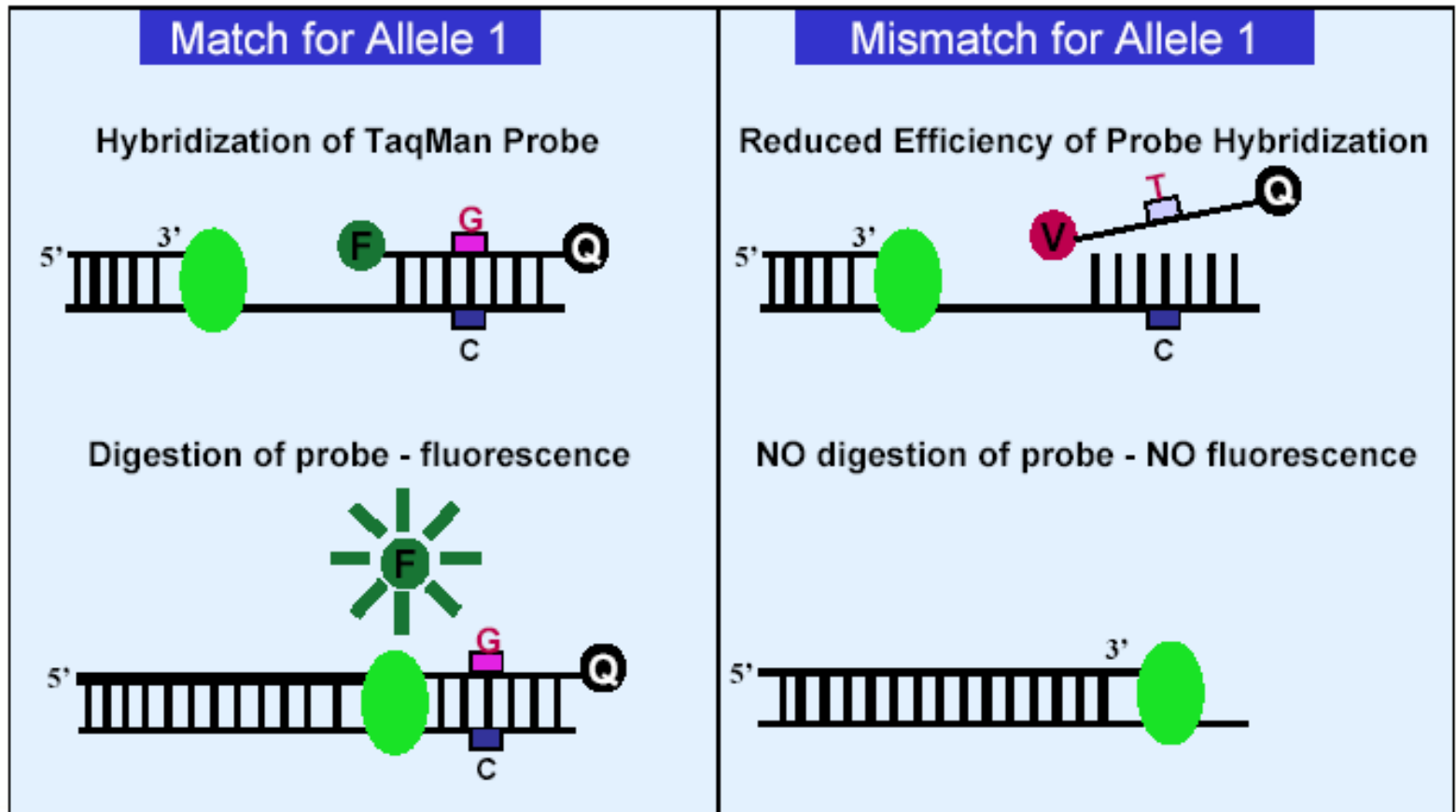
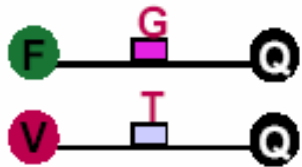
- 单一荧光系统中
 - 不能在同一管中进行多片段扩增
 - 不同的基因必须在不同的试管中
 - 管之间的精确度跟多荧光系统同等的精确和可靠
 - 灵敏度高，定量方便
 - 费用高
- 多种荧光提供仪器价格比较贵

PCR会用于基因身份
证的制作吗？

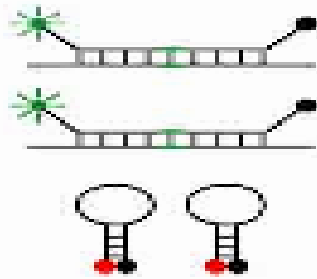
到2030年，预计只要1000美金就能得到个人的基因组序列。人与人之间平均1000个碱基对就有一个碱基呈多态性(SNP)。因此共有300万碱基上可能存在差异，而真正有价值的SNP也许只有1-2万个。

防治基因信息的滥用和基因歧视，将是今后社会的重任。

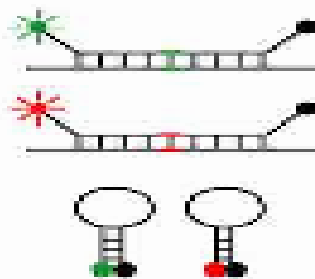
利用定量PCR进行SNP定型



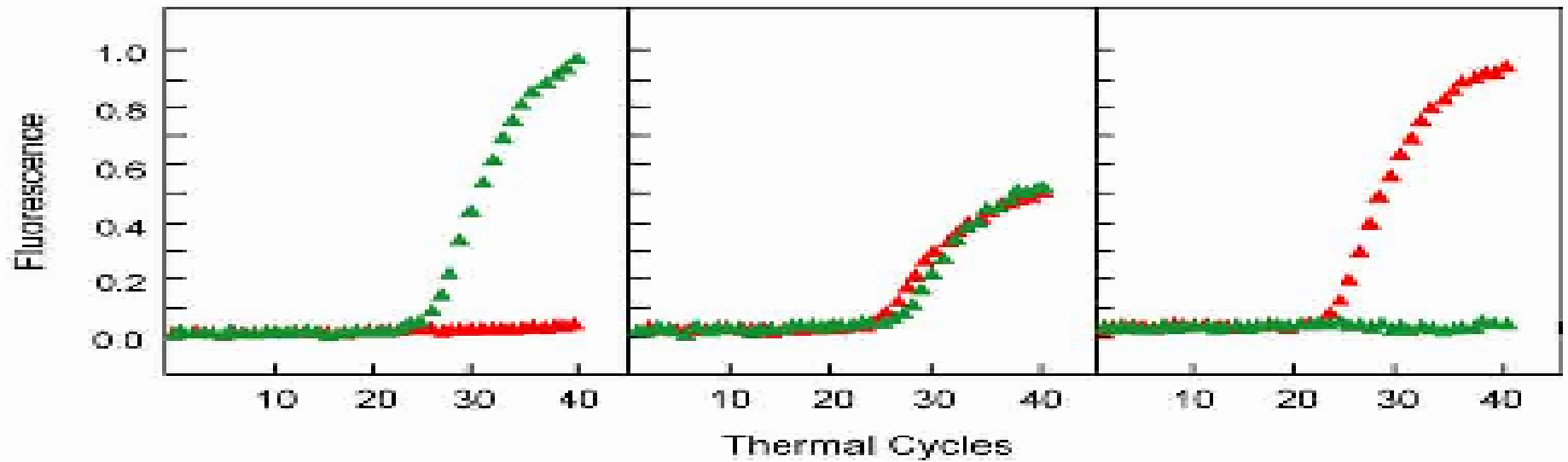
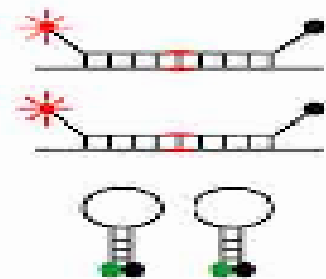
Homozygous Wild-type



Heterozygote



Homozygous Mutant



PCR的网上资源

<http://www.highveld.com/pcr.html>

<http://www.protocol-online.net/molbio/>

<http://info.med.yale.edu/genetics/ward/tavi/PCR.html>

附加:

<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/~rcruicks/additives.html>

谢谢各位