

## 第三节 PCR技术原理

PCR (polymerase chain reaction) 是指那些**模拟体内DNA复制的方式在体外选择性的扩增DNA某个特殊区域的技术**

是80年代发展起来的新技术，广泛应用于分子生物学和基因工程及其它与DNA鉴定相关的其它领域，如疾病检测、临床应用、商品检疫、法医鉴定、新药物的开发等。

## 2.3.1 核酸体外扩增最早的设想

由Khorana及其同事于1971年提出：“经过DNA变性，与合适引物杂交，用DNA聚合酶延伸引物，并不断重视该过程便可克隆tRNA基因”。但由于当时很难进行测序和合成寡核苷酸引物，且当时(1970年)Smith等发现了DNA限制性内切酶，使体外克隆基因成为可能，所以，使Khorana等的早期设想被人们遗忘。

## 2.3.2 聚合酶链反应的发明

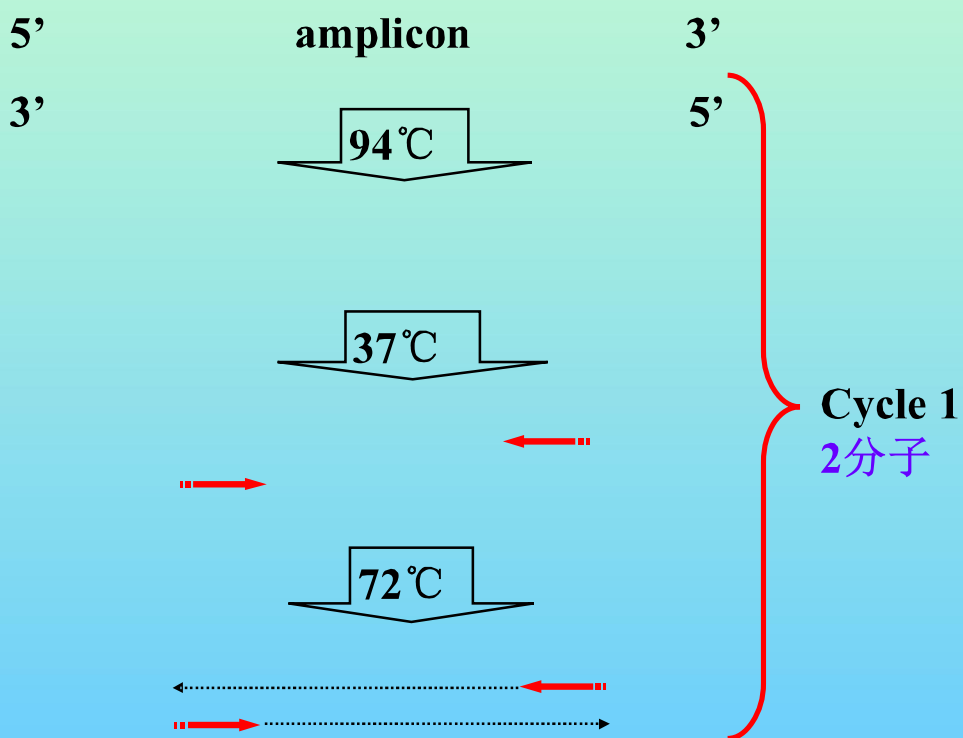
- 1985年，美国PE-Cetus公司的Mullis等人才发明了**聚合酶链反应** (Polymerase Chain Reaction, PCR), 其原理类似于DNA的体内复制。
- 开始是使用大肠杆菌 DNA聚合酶Klenow片段，由于该酶不耐热，因此，每次加热变性DNA后都要重新补加Klenow酶。在操作多份标本时，这一过程耗时，费力，且易出错。
- 耐热DNA聚合酶的应用使得PCR反应更易于自动化，继而PE-Cetus公司推出了**第一台PCR热循环仪**，使该技术的自动化成为现实。
- PCR具有划时代意义，Mullis等因此项技术于1993年获得诺贝尔奖金

## 2.3.3 PCR 原理

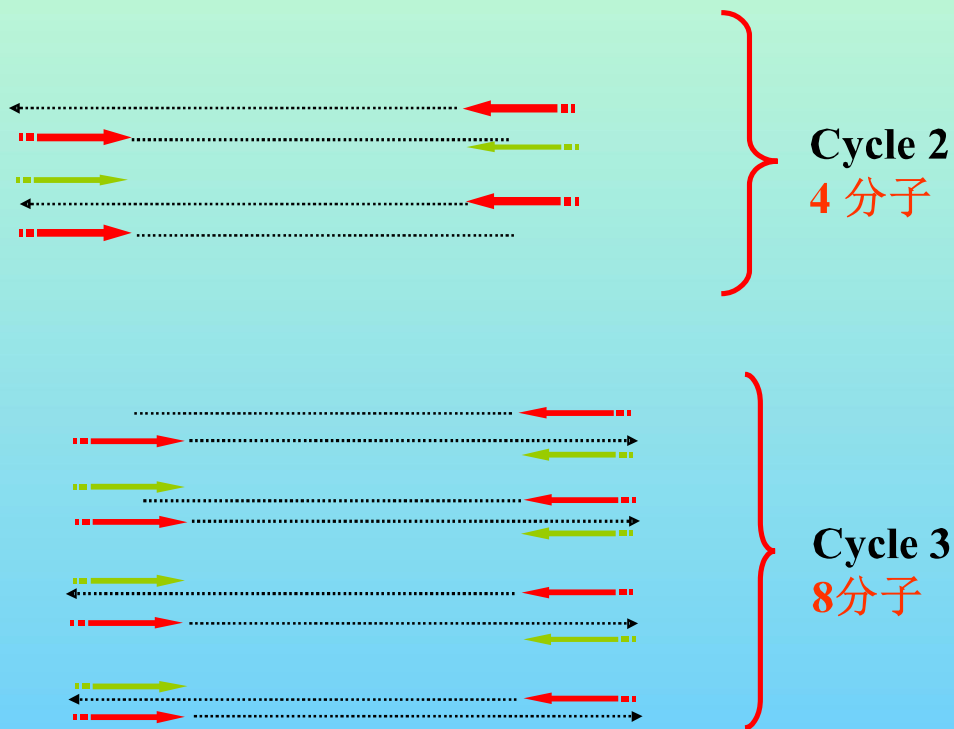
**基本原理：**即DNA合成的基本原理

**基本要素：** teplate/primer/DNA poly

- **Template:**ssDNA or dsDNA
- **Primers:**oligo-nucleotides等
- **Substrates:**dNTP
- **DNA polymerase:** Taq polymerase 使用的是来自高温微生物的DNA polymerase



---生命科学院<分子生物学>



## 2.3.4 PCR反应过程

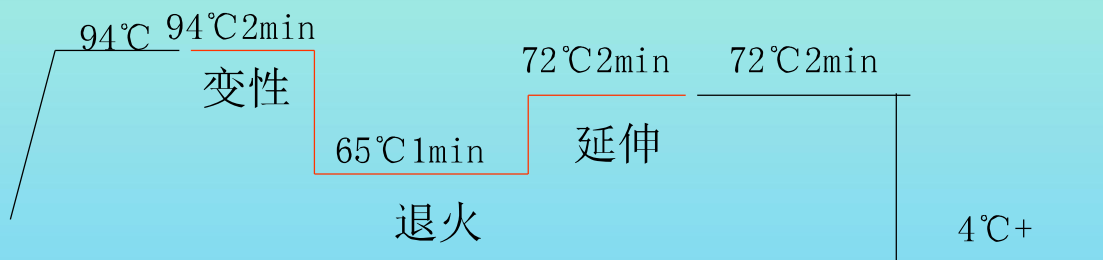
- ①**变性**。将模板DNA置于95℃的高温下，使双链DNA的双链解开变成单链DNA；
- ②**退火**。将反应体系的温度降低至55℃左右，使得一对引物能分别与变性后的两条模板链相配对；
- ③**延伸**。将反应体系温度调整到Taq DNA聚合酶作用的最适温度72℃，然后以目的基因为模板，合成新的DNA链。

如此反复进行约30个循环左右，即可扩增得到目的DNA序列。

---生命科学院<分子生物学>

denature	dsDNA	ssDNA	92-96°C
annealing	37-72°C	50-58°C	
extension	72°C		

一般需使用一对引物  
新合成的链又可作为模板



这三个热反应过程的重复称为一个循环



## 2.3.5 PCR反应体系

### 缓冲液 buffer (1×)

50 mM KCl      引物退火  
10 mM Tris.HCl    pH 8.3-9.0  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (0.5-2.5)

## dNTP

终浓度0.2mM(即饱和浓度) (pH7.0)

- 4种dNTP应平衡, 提高忠实性
- 使用时应考虑 $Mg^{2+}$ , 引物, 产量之间的关系  
如序列分析和制备探针时, 用20-40  $\mu$  m

## 引物

各1  $\mu$  m, 即1pmol/ $\mu$  l

OD260 dsDNA 50  $\mu$  g/ml (molecular cloning)

SsDNA 40  $\mu$  g/ml oligo 33  $\mu$  g/ml

## 引物

- 长度至少16bp，通常20-30bp
- $T_m = 81.5 - 16.6 \log [J^+] + 0.041 (G+C)\% - (600/N)$

N: 链长 J: 单价离子浓度

若N=20 G+C%=55% [J+]=60mmol/L, 则:

$$T_m = 81.5 - 20.3 + 22.6 - 30 = 53.8$$

简单计算  $T_m = (G+C) \times 4 + (A+T) \times 2$  (用于较短引物)

还可从internet计算

- 避免二级结构的形成
- 二聚体 二级结构
- G/C和A/T分布尽管均匀，一般G+C% 45-55%  
Oligo dT/oligo dC除外
- 其它，如5'末端，限制酶位点的长度
- 随机引物 6nt 10-12nt

## 模板

$\mu\text{g}$  or  $\text{ng}$  10<sup>2</sup>-10<sup>5</sup>

1  $\mu\text{g}$  人类单拷贝基因组DNA

3 × 10<sup>5</sup> targets

10  $\text{ng}$  yeast DNA 3 × 10<sup>5</sup>

1  $\text{ng}$  E.coli DNA 3 × 10<sup>5</sup>

1  $\text{ng}$  1kb DNA 9 × 10<sup>6</sup>

1% M13 plaque 10<sup>6</sup>

## 2.3.6 PCR的相关技术

名 称	主要用途
简并引物扩增法	扩增未知基因片段
巢居PCR	提高PCR敏感性、特异性，分析突变
复合PCR	同时检测多个突变或病原
反向PCR	扩增已知序列两侧的未知序列，致产物突变
单一特异引物PCR	扩增未知基因组DNA
单侧引物PCR	通过已知序列扩增未知cDNA
锚定PCR	分析具备不同末端的序列
增效PCR	减少引物二聚体，提高PCR特异性
固着PCR	有利于产物的分离

连接介导PCR	DNA甲基化分析、突变和克隆等
RACE-PCR	扩增cDNA末端
定量PCR	定量mRNA或染色体基因
原位PCR	研究表达基因的细胞比例等
臆断PCR	鉴定细菌或遗传作用
通用引物PCR	扩增相关基因或检测相关病原
信使扩增表型分型 (mapping)	同时分析少量细胞的mRNA
膜结合PCR	去除污染的杂质或PCR产物残留
表达盒PCR	产生合成或突变蛋白质的DNA片段

## 逆转录PCR (retrotranscription PCR, RT PCR)

指的是以RNA为模板，经逆转录获得与RNA互补的DNA链即cDNA，然后以cDNA链为模板进行的PCR反应。



## 锚定PCR (anchored PCR)

适合于扩增那些只知道一端序列的目的DNA。例如，对于一端序列已知、一端序列未知的DNA片段，可以通过DNA末端转移酶给未知序列的那一端加上一段多聚dG的尾巴，然后分别用多聚dC和已知的序列作为引物进行PCR扩增。

## 反向PCR (inverse PCR, inPCR)

适用于扩增**已知序列的两端**的未知序列。其具体方法是选择一个在**已知序列中没有，而在其两侧都存在**的限制性内切酶位点，用相应的限制性内切酶酶解后，将**酶切**的片段在连接酶的作用下**环化**，使得已知序列位于环状分子上。根据已知序列的两端序列设计两个引物，以环状分子为模板扩增出已知序列两侧的未知序列。

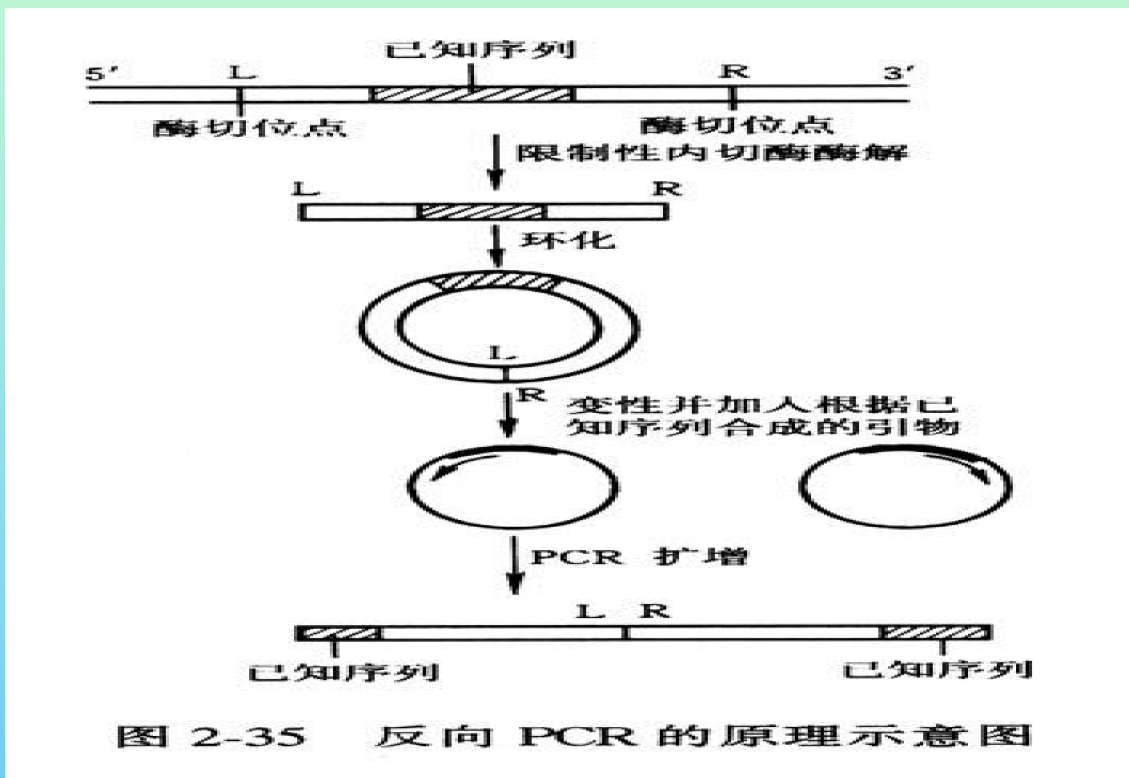


图 2-35 反向 PCR 的原理示意图

## 2.3.7 其它体外核酸扩增技术

技术	应用
转录依赖的扩增系统(TAS)	检测HIV
连接酶链反应(LCR)	检测点突变
自主序列复制(3SR)系统	研究RNA, 临床应用、法医学等
链替代扩增(SDA)	检测、鉴定基因
$Q_{\beta}$ 复制酶系统	增加探针检测敏感性
循环探针反应	增加探针检测敏感性

## 2.3.8 PCR技术的应用

**研究：**基因克隆；DNA测序；分析突变；基因重组与融合；鉴定与调控蛋白质结合DNA序列；转座子插入位点的绘图；检测基因的修饰；合成基因的构建；构建克隆或表达载体；检测某基因的内切酶多态性

**诊断：**细菌(螺旋体、支原体、衣原体、分支杆菌、立克次氏体、白喉杆菌、致病大肠杆菌、痢疾杆菌、嗜水气单胞菌和艰难梭菌等)；病毒(HTLV、HIV、HBV、HPV、EV、CMV、EBV、HSV，麻疹病毒、轮状病毒、细小病毒B19)；寄生虫(疟疾等)；人遗传病(Lesh-Nyhan综合症、地贫、血友病、BMD、DMD、囊性纤维化等)

**免疫学：**HLA分裂；T细胞受体或抗体多样化的定性；自身免疫病基因作图；淋巴因子定量

---生命科学院<分子生物学>

**人类基因组工程：**用散布重复序列产生DNA标志；遗传图谱的构建(检测DNA、多态性或精子绘图)；物理图谱的构建；测序，表达图谱

**法医：**犯罪现场标本分析；HLA-DQ

**肿瘤：**胰癌、结肠癌、肺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、血液恶性肿瘤

**组织和群体生物学：**遗传聚类研究；动物保护研究；生态学；环境科学；实验遗传学。

**古生物学：**考古与博物馆标本分析

**动物学：**动物传染病的诊断等

**植物学：**检测植物病原等

## 2.3.9 PCR技术未来发展的方向

随着PCR技术在更多领域的越来越广泛的应用，还会有更多的新的改进问世。总之，**PCR技术与每一领域的专门技术结合使用**是PCR技术未来发展的方向。

## 回答问题

1. 什么是PCR，PCR的程序是什么？
2. 什么是锚定PCR，反向PCR，逆转录PCR？
3. 举例说明PCR的用途
4. 随机引物PCR和通用引物PCR有什么用途？
5. 实验分析题：起初，人们怀疑“非典型肺炎”是由某种人类已知病毒引起，请设计实验，用PCR的方法分析之。