



PCR技术及其在临床诊断中的应用

樊绮诗

<http://www.shsmu.edu.cn/>

讲课内容



1

第一节 PCR技术

2

第二节 以PCR为基础的相关技术

3

第三节 PCR 产物的检测



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 聚合酶链式反应于1983年由美国Cetus公司的K. Mullis建立，并和定点突变的发明者M. Smith一起荣获1993年度诺贝尔化学奖，为生命科学领域的研究开创了崭新时代。

2009年3月

上海交通大学医学院





PCR反应的特点

❖ 特异性强

引物与模板结合的特异性及聚合酶的忠实性

❖ 灵敏度高

指数增长，从pg (10^{-12})可扩增至 mg (10^{-6})水平

❖ 简便、快速

2~4 小时完成扩增

❖ 对标本的纯度要求低

DNA 粗制品及总RNA均可作为扩增模板

2009年3月

上海交通大学医学院



一、PCR反应原理和反应过程

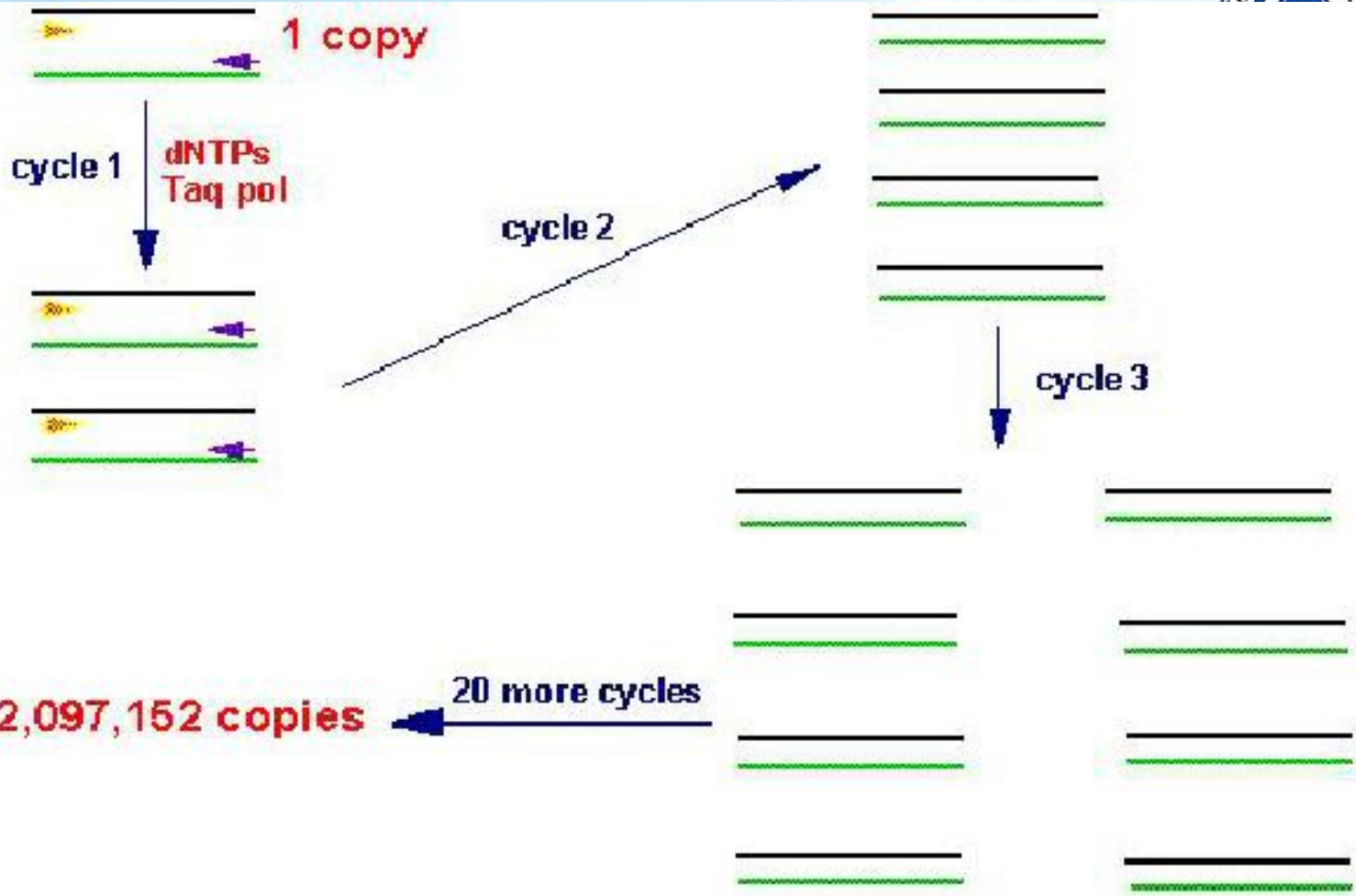
Amplification of DNA in vitro including:

- ❖ 变性 (denaturation) : 94 °C ~ 95 °C
- ❖ 退火 (annealing) : 40 °C ~ 70 °C
- ❖ 延伸 (extension) : 72 °C

3个步骤作为PCR的一个循环，每当完成一个循环，一个分子的模板被复制为二个，产物量以指数形式增长。

2009年3月

上海交通大学医学院



copyright M.W.King 1996
2009年3月

上海交通大学医学院

First Cycle

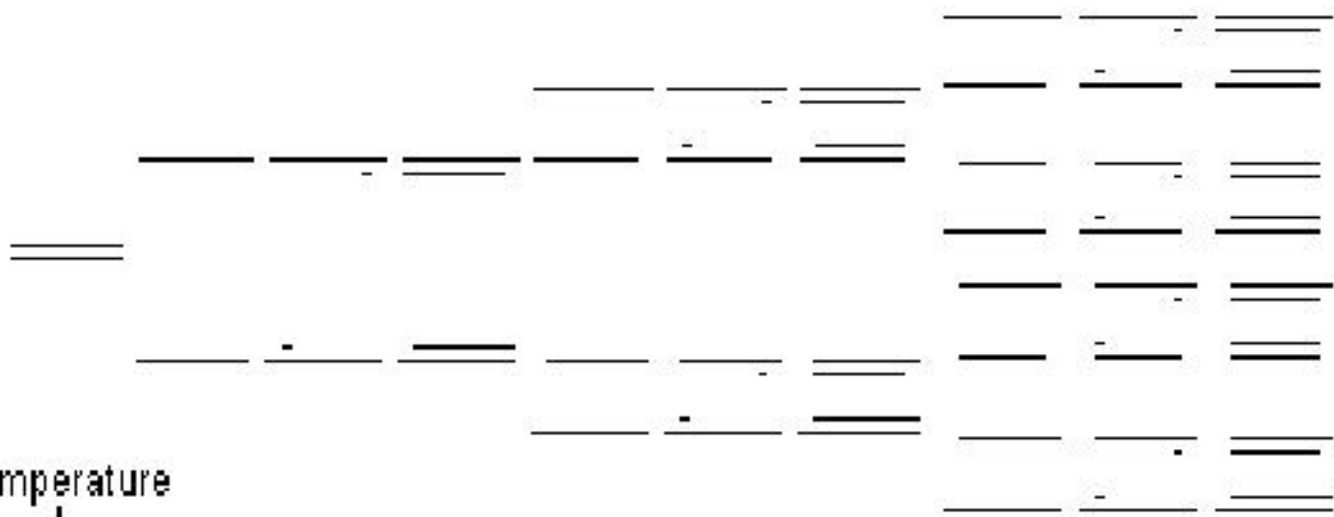
Second Cycle

Third Cycle

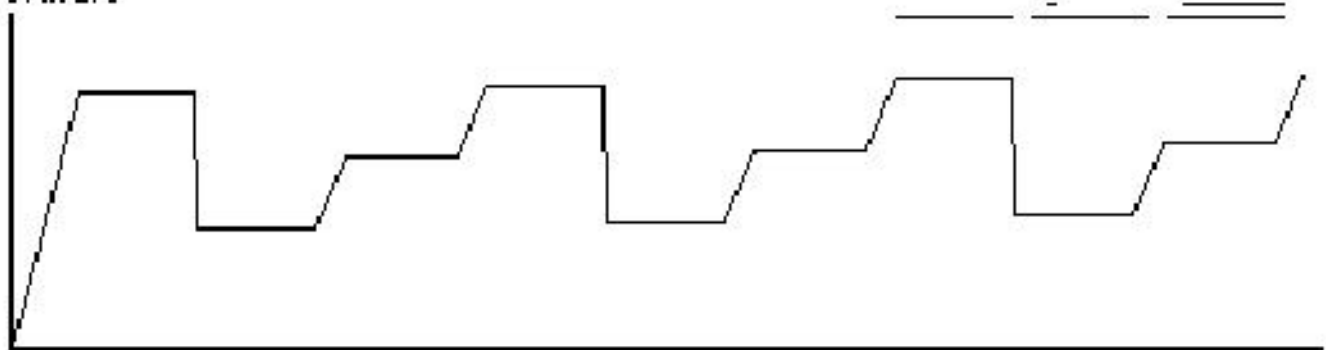
Melt Anneal Replicate

Melt Anneal Replicate

Melt Anneal Replicate



Temperature



Time



二、PCR的反应体系和反应条件

(一) PCR反应体系

参与PCR反应的主要成份(principle components):

- ❖ Template、Primers、dNTP
- ❖ Taq DNA polymerase
- ❖ Buffer



2009年3月

上海交通大学医学院



1、 模板 (Template)

- ❖ 基因组DNA、RNA、质粒DNA、线粒体DNA等
- ❖ RNA作为模板时，须先将RNA逆转录为cDNA，再以 cDNA作为扩增的模板
- ❖ 模板量：1000ng、500ng、100ng、50ng...

2009年3月

上海交通大学医学院



2、引物 (Primers)

引物决定PCR扩增产物的特异性和长度，是化学合成的寡核苷酸片段。

- ❖ 化学合成的寡核苷酸
- ❖ 能与模板特异地结合
- ❖ 引物决定产物的特异性和长度
- ❖ 引物设计时必须遵循一些原则

2009年3月

上海交通大学医学院





设计引物的原则:

- ❖ 二条引物分别位于被扩增片段的两端，与模板正负链序列互补
- ❖ 长度为18 ~ 25个核苷酸
- ❖ 二条引物之间避免形成引物二聚体
- ❖ 引物的碱基组成应平衡
- ❖ 引物退火温度计算： $T_mC^\circ = 2(A+T) + 4(C+G)$
- ❖ 引物的5'端可被修饰（引入酶切位点、引入突变位点、生物素等标记）

引物浓度：0.1 ~ 0.2 $\mu\text{mol/L}$ ，浓度过高容易生成引物二聚体

2009年3月

上海交通大学医学院

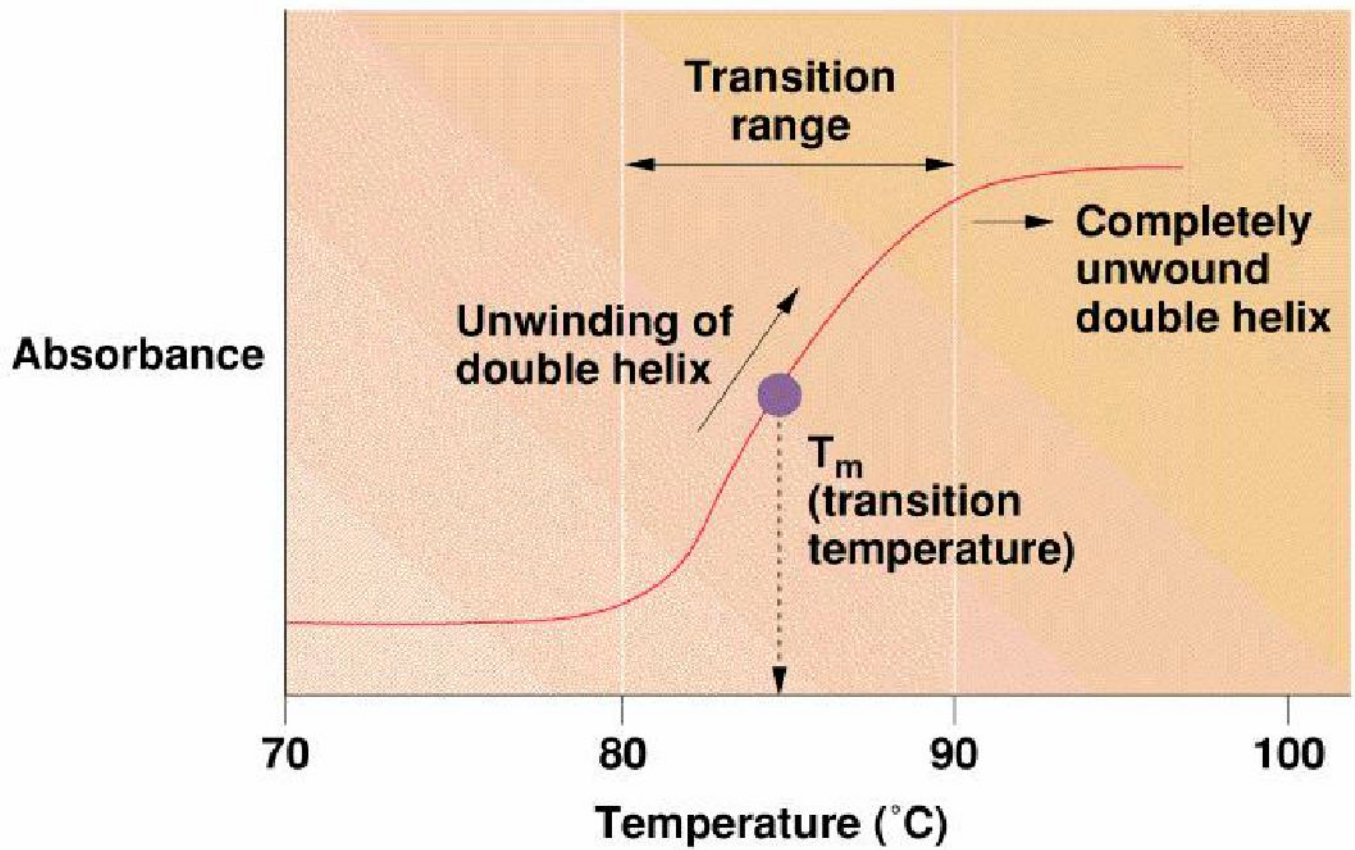


T_m is defined as the temperature
at which
half the molecules are single-stranded

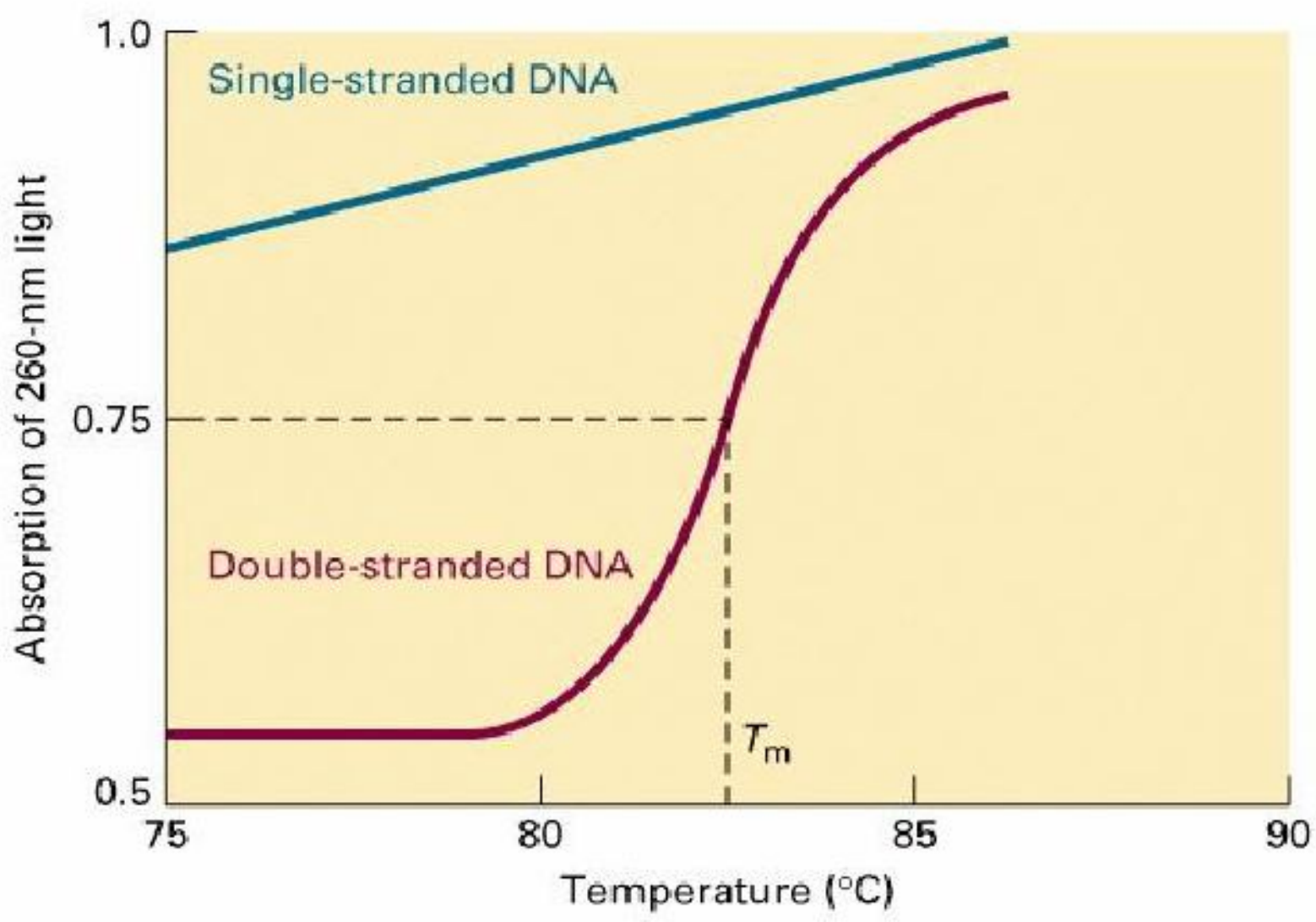


2009年3月

上海交通大学医学院



(a)



Effect of % GC Content on T_m

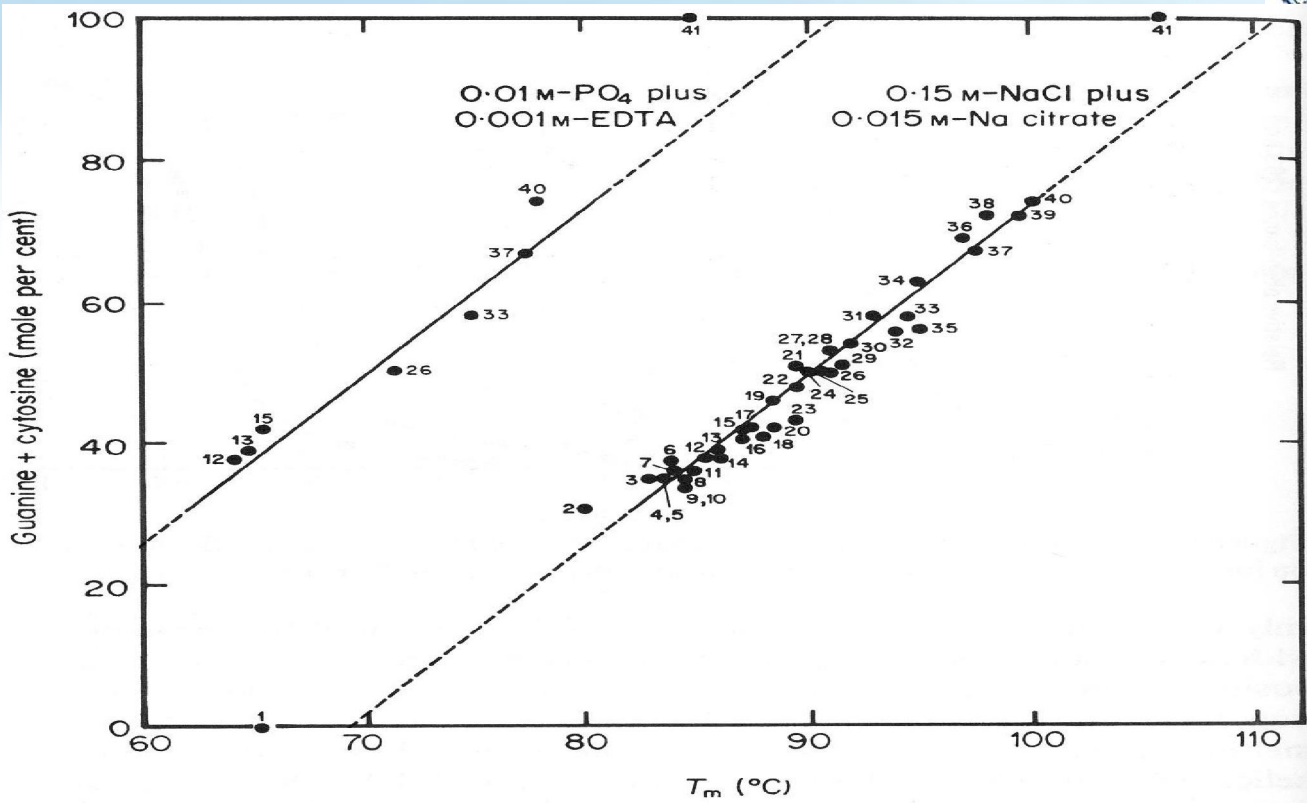


Figure 6-17. Dependence of melting temperature T_m on guanine + cytosine (G + C) content of various samples of DNA obtained from different sources. DNA was dissolved in 0.15 M NaCl + 0.015 M Na-citrate, pH 7.0. Points 1 and 41 for poly(dA-dT) and poly(dG-dC), fall off the least-squares line which is described analytically by $T_m = 69.3 + 0.41 (\%C)$. From (549).

14

2009年3月

上海交通大学医学院

Effect of [Salt] on T_m

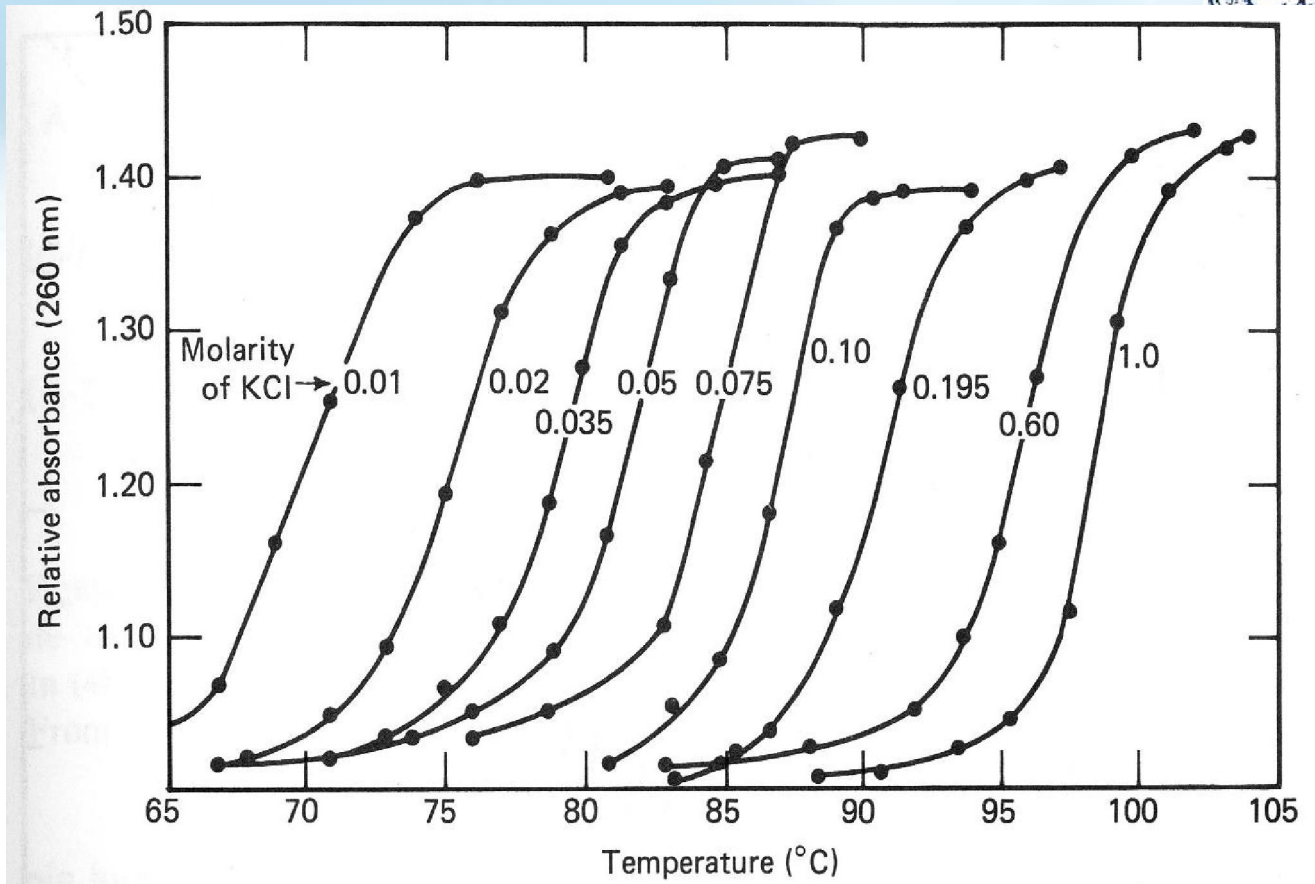


Figure 6-16. Dependence of thermal denaturation of *D. pneumoniae* (R-36A) DNA on ionic strength. Various KCl concentrations in citrate buffer, pH 7.0. From (549)

2009年3月

上海交通大学医学院

15



3、脱氧核苷三磷酸 (dNTP)

- ❖ 是dATP、dCTP、dGTP和dTTP 4种脱氧核苷三磷酸的混合物
- ❖ 反应体系中各种核苷酸的浓度必须一致
- ❖ 浓度过高虽能加快反应速度，但非特异性扩增也随之增加

dNTP浓度:

20 ~ 200 μ mol/L, 浓度升高增加非特异性扩增



2009年3月

上海交通大学医学院



4、DNA聚合酶 (DNA polymerase)

❖ 从一种生活在热泉 (80°C – 90°C) 中的水栖嗜热菌 (*Thermus aquaticus*, Taq) 中提取, 有很高的耐热稳定性

❖ Taq 酶的作用:

模板指导下, 以dNTP为原料, 在引物3'-OH末端加上脱氧单核苷酸, 形成3', 5' -磷酸二酯键, 使DNA链沿5'→3'方向延伸, 催化DNA合成

最适酶量:

1-2.5U (酶量过多, 导致非特异性扩增)



- ❖ Taq DNA聚合酶复制的保真性:
- ❖ Taq DNA聚合酶无3' → 5'外切酶活性，因而无校正功能，在复制新链的过程中会发生碱基错配
- ❖ Taq DNA聚合酶在每次循环中产生的移码突变率为1/30000，碱基替换率为1/8000，故扩增的片段越长，错配的机率越高

2009年3月

上海交通大学医学院





❖耐热的 DNA多聚酶

Pwo DNA polymerase、Tth DNA polymerase、Pfu DNA polymerase具有较高的热稳定性，较高的保真性，降低碱基错配率2 ~ 10倍

2009年3月

上海交通大学医学院





5、镁离子浓度

- ❖ 镁离子浓度是一个至为关键的因素，对于稳定反应系统、稳定核苷酸和提高Taq 酶的活性有直接影响
- ❖ 虽然Taq 酶的活性只与游离的 Mg^{2+} 浓度有关，但PCR反应体系中dNTP、引物、模板DNA及螯合剂的存在均可与 Mg^{2+} 结合而降低游离 Mg^{2+} 的浓度从而影响酶的活性

当dNTP浓度为 $200 \mu\text{mol/L}$ 时， $MgCl_2$ 的浓度为 $.5\text{mmol/L}$ 较宜。





6、其它反应因素

- ❖ pH: 调节至酶反应所需的最适pH (pH =7.2左右)
- ❖ 盐: 合适的盐浓度有利于稳定杂交体, 有利于引物与模板杂交
- ❖ 基质: BSA、gelatin、Tween 20、DTT等 (牛血清白蛋白或明胶等基质可以保护Taq 酶活性)



2009年3月

上海交通大学医学院



(二) PCR的反应条件

- ❖ 反应温度 (变性、退火、延伸)
- ❖ 反应时间 (变性、退火、延伸)
- ❖ 循环次数 (PCR效率及产物量)



2009年3月

上海交通大学医学院



1、温度

变性温度: $94^{\circ}\text{C} \sim 97^{\circ}\text{C}$

退火温度: 低于引物 T_m 5°C 左右

温度过高: 降低扩增效率

温度过低: 增加非特异性扩增

延伸温度: 72°C , 此时Taq酶具有较高的酶促活性

2009年3月

上海交通大学医学院





2、时间

- ❖ 第一次变性应给予足够时间（5 ~ 7分钟）
- ❖ 每一个步骤所需时间取决于扩增片段的长度，一般为30秒 ~ 1分钟，时间过长易导致非特异性扩增



2009年3月

上海交通大学医学院



3、循环次数

- ❖ 重复次数一般设为25 ~ 35个循环
- ❖ 扩增反应的平台效应:

理论上PCR反应产物呈指数性增长，但这种增长形式在扩增25~35个循环以后便放慢直至停止，达到反应平台，此时扩增产物量不再随循环次数的增加而呈指数增长



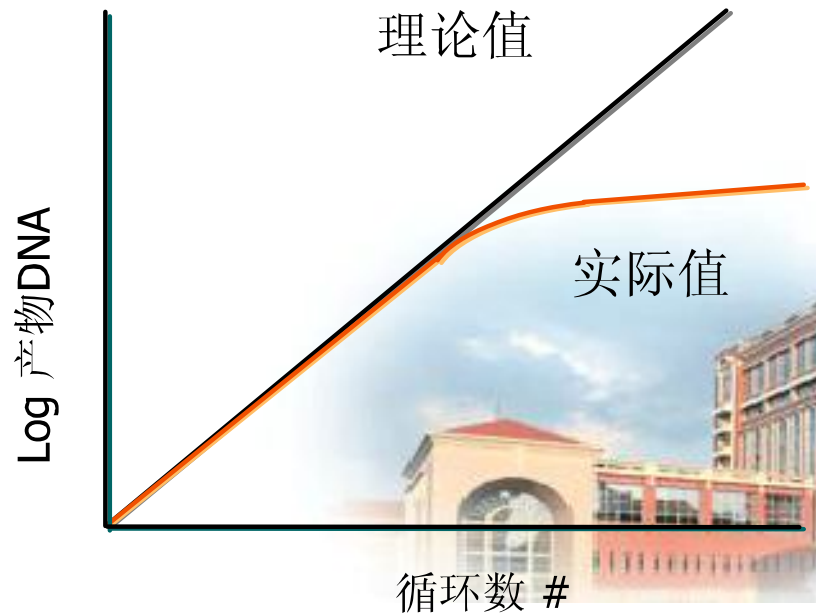
2009年3月

上海交通大学医学院



PCR过程的实时监测

- 指数增长期
- 线形增长期
- 平台期



2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 平台出现得迟早与模板的初始量有关，模板初始量越多，平台出现得越早。

❖ 平台效应产生的因素：

引物二聚体的产生、反应产物、各组分的消耗和变性、引物和已扩增的DNA片段间的竞争等



2009年3月

上海交通大学医学院



三、PCR技术的质量控制

(一) 实验室的规范化设置

实验室的规范化设置:

试剂贮存和准备区

标本制备区

扩增反应区

产物分析区

PCR技术的质量保证:

基因扩增检验的全过程的质量保证

室内质量控制和室间质量评价

PCR实验系统中的污染源及防污染措施

2009年3月

上海交通大学医学院



❖ 防污染体系:

- ❖ 正确设置实验室、严格规范实验操作、完整有效的去污染措施、人员培训、试剂质量
- ❖ 反应体系中以dUTP取代dTTP，再加入尿嘧啶糖苷酶（UNG）即可破坏以往的扩增产物

2009年3月

上海交通大学医学院





(二) PCR技术的质量保证

分析前因素：标本采集、运送、稳定化处理、贮存

分析中因素：核酸提取、逆转录、扩增反应、设置
对照系统

(包括阴性对照、阳性对照、内对照等)

分析后因素：报告形式、反馈的信息等

2009年3月

上海交通大学医学院

讲课内容



1

第一节 PCR技术

2

第二节 以PCR为基础的相关技术

3

第三节 PCR 产物的检测



2009年3月

上海交通大学医学院



第二节 以PCR为基础的相关技术

<http://www.shsmu.edu.cn/>



以PCR为基础的相关技术

- ❖ 逆转录PCR (reverse transcription PCR, RT-PCR)
- ❖ 定量PCR (quantitative PCR)
- ❖ 多重PCR (multiplex PCR)
- ❖ 免疫PCR
- ❖ 差异显示PCR (differential display PCR, DD-PCR)
- ❖ PCR诱导定点突变
- ❖ 原位PCR (in situ PCR)



2009年3月

上海交通大学医学院



一、逆转录PCR (RT-PCR)

- ❖ 以细胞内总RNA或mRNA为材料进行体外扩增的技术。
- ❖ 主要用于克隆 cDNA、合成cDNA探针，检测RNA病毒、分析基因表达等



2009年3月

上海交通大学医学院



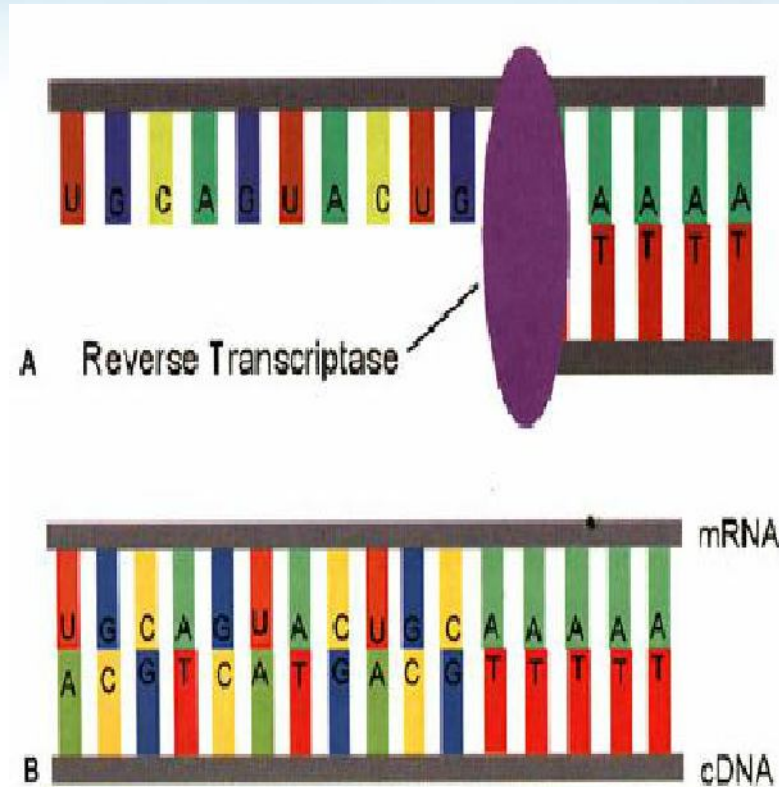
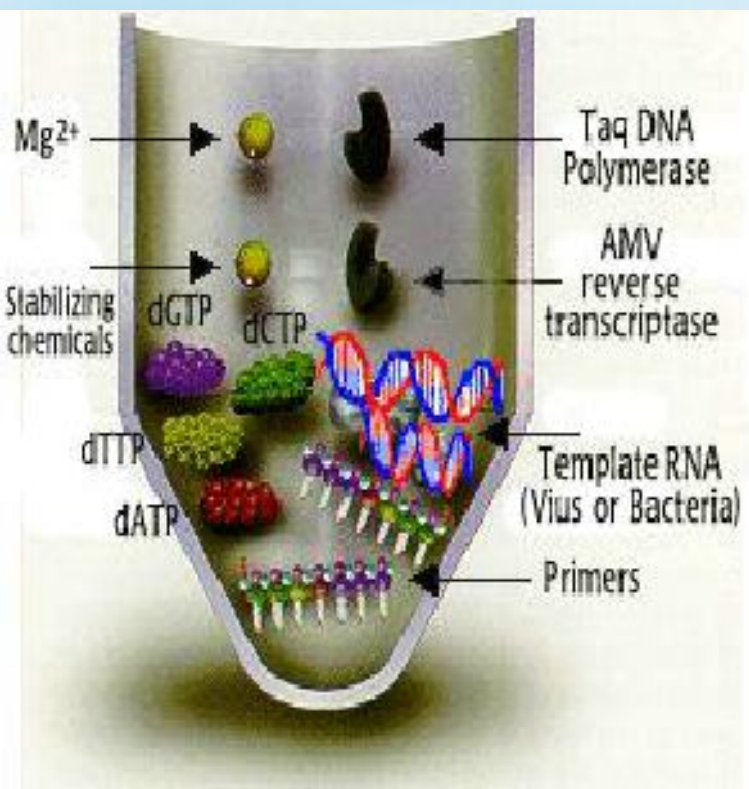
逆转录生成cDNA方式:

- ❖ 以随机进行的PCR扩增所需的下游引物作为逆转录反应的引物
- ❖ 以oligo (dT) 作为引物， mRNA3`末端polyA尾与之互补
- ❖ 以人工合成的随机序列六核苷酸混合物作为引物， 进行扩增



2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院



二、定量PCR

- ❖ 对DNA或RNA样本的靶序列进行定量分析
- ❖ 主要用于基因表达的分析、病原体核酸的检测等
- ❖ 在定量PCR反应体系中，除了常规PCR反应所需的材料和试剂外，还必须引入内参照系统
- ❖ 内参照系统一般选用与待测序列结构无关的基因常用的内参照基因是 β -肌球蛋白基因



2009年3月

上海交通大学医学院



定量PCR

对扩增产物进行定量分析
(病原体核酸、基因拷贝、蛋白产物表达量)



2009年3月

上海交通大学医学院



相对定量PCR

1. 由于多种因素会影响最终产物量，因此需设立内参照。
2. 通过凝胶电泳分析靶基因和内参照的PCR产物量实现对样本中靶基因的相对定量。
3. 内参照基因一般选择与靶基因序列无关的“管家基因”，因为这些基因的转录比较稳定，含量相对丰富。



2009年3月

上海交通大学医学院



相对定量RT-PCR

1. 将RNA逆转录为cDNA
2. 靶基因与“管家基因”同管扩增
3. PCR产物的凝胶电泳分析

2009年3月

上海交通大学医学院





相对定量PCR

设计相对定量PCR实验方案时须注意:

- ❖ 预先确定最佳模板量和PCR循环数，使所采用的各反应参数在扩增指数范围内，避免平台效应。



2009年3月

上海交通大学医学院

不同模板量时线性扩增循环数的确定

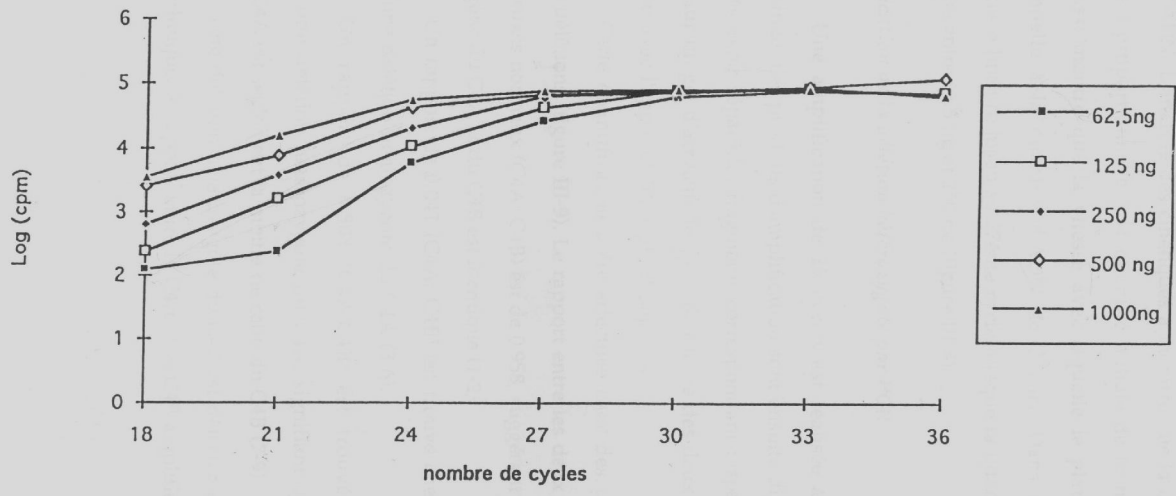


Figure III-7. Analyse cinétique de PCR. La phase de croissance exponentielle d'amplification est jusqu'au 27ème cycle.

96

线性扩增反应至24~27个循环

不同循环次数时模板量的确定

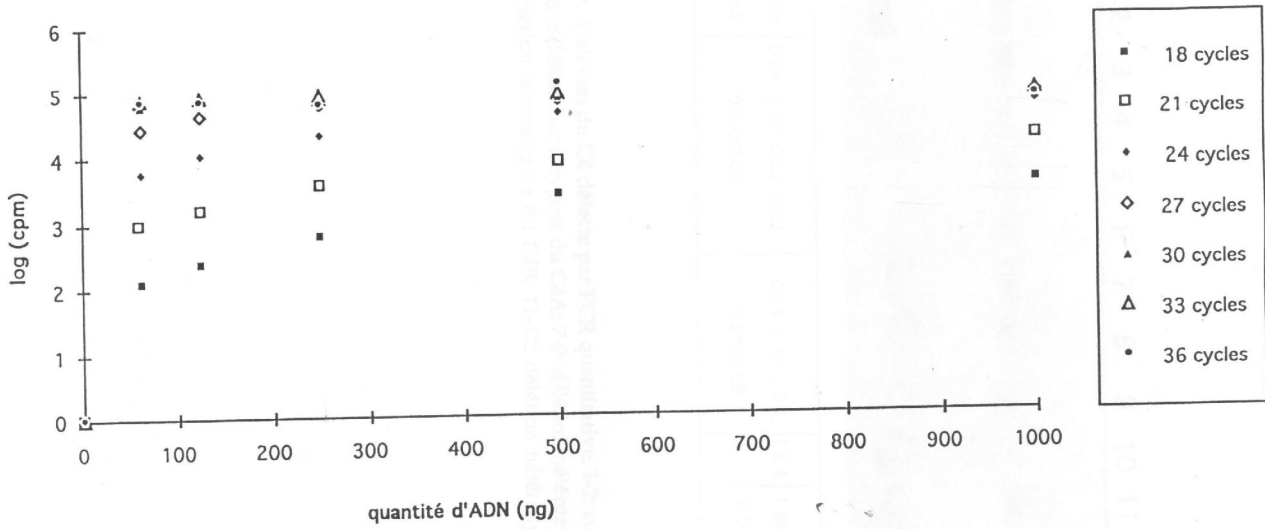


Figure III-8. Analyse cinétique de PCR. L'amplification reste linéaire jusqu'au 27ème cycle lorsque la quantité initiale d'ADN est comprise entre 62.5 ng et 250 ng.

86

(模板量为62.5~250ng时，线性扩增至27个循环)



相对定量PCR

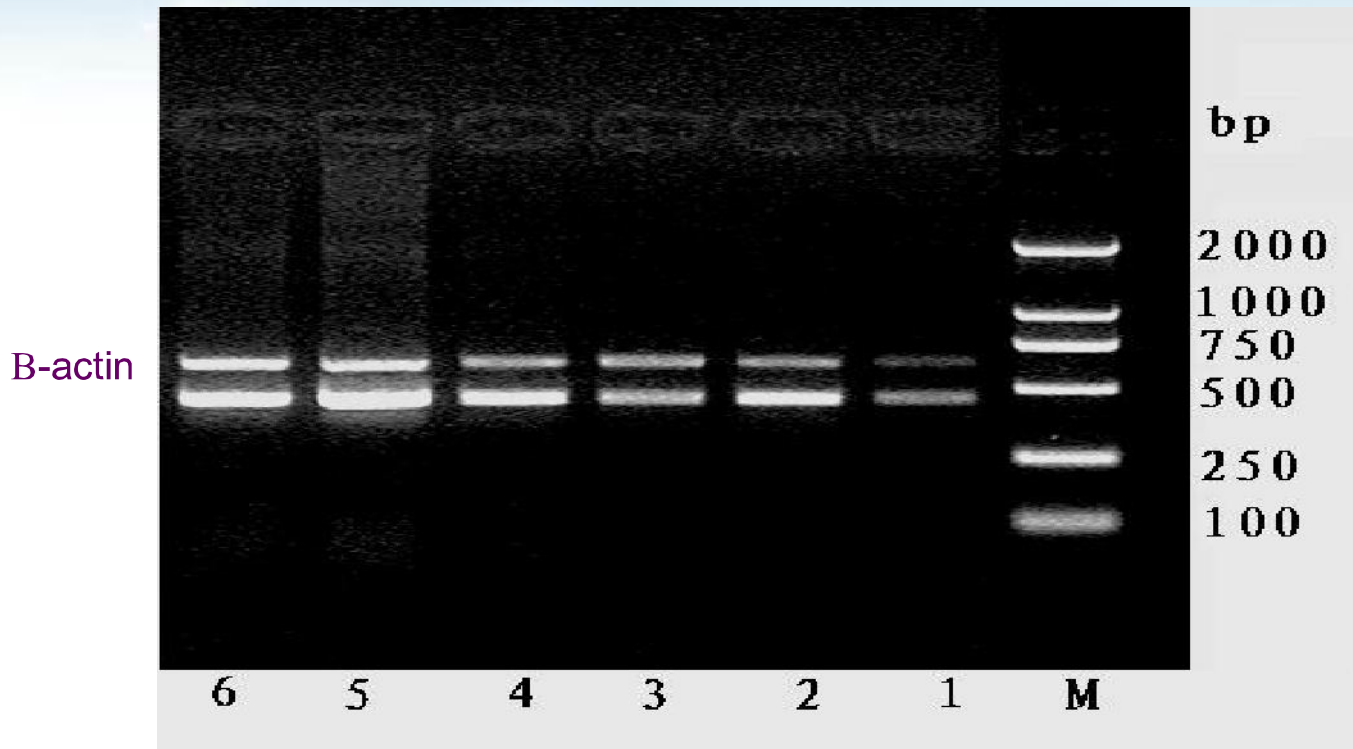
- ❖ 管家基因与靶基因扩增产物的长度应有所不同，以保证电泳能将两者分离开。
- ❖ 分别扫描管家基因和靶基因的条带密度，二者之比即为靶基因扩增条带的相对密度。
- ❖ 观察各靶基因相对密度的变化

2009年3月

上海交通大学医学院



相对定量扩增结果



2009年3月

上海交通大学医学院



相对定量PCR的优势与不足

- 不需要特殊的检测设备和试剂即可以对靶基因进行相对定量。
- 内对照系统无法排除参照基因本身表达变化的影响及参照基因和靶基因两者扩增效率不同等因素对实验结果的干扰。



2009年3月

上海交通大学医学院



实时定量 PCR

- 对核酸扩增反应进行直接和动态的监测，实现对靶基因的实时定量分析。



2009年3月

上海交通大学医学院



- ❖ 荧光定量PCR (fluorescence quantitative PCR, FQ-PCR)，又称实时PCR，是目前较精确的进行定量PCR的方法
- ❖ FQ-PCR通过荧光信号对PCR过程中产物量进行实时监测，精确计算出PCR的初始模板量



2009年3月

上海交通大学医学院



荧光信号的检测方法:

- ❖ 1、DNA结合染料技术
- ❖ 2、水解探针技术 (TaqMan probe) 技术
- ❖ 3、杂交探针技术

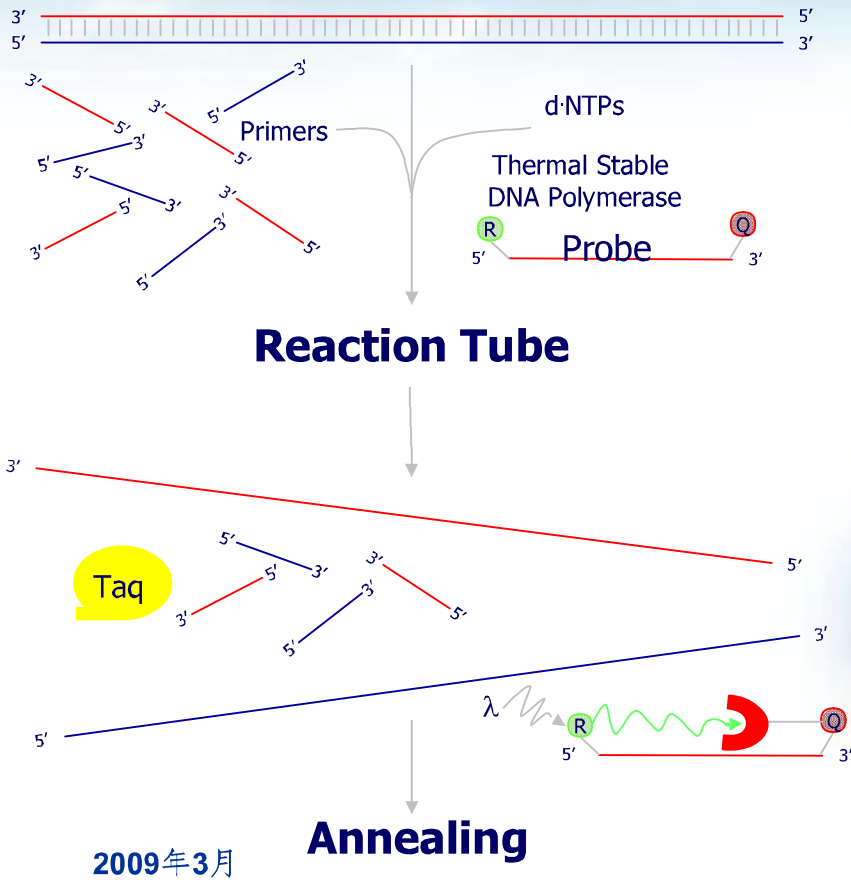
2009年3月

上海交通大学医学院





TaqMan™



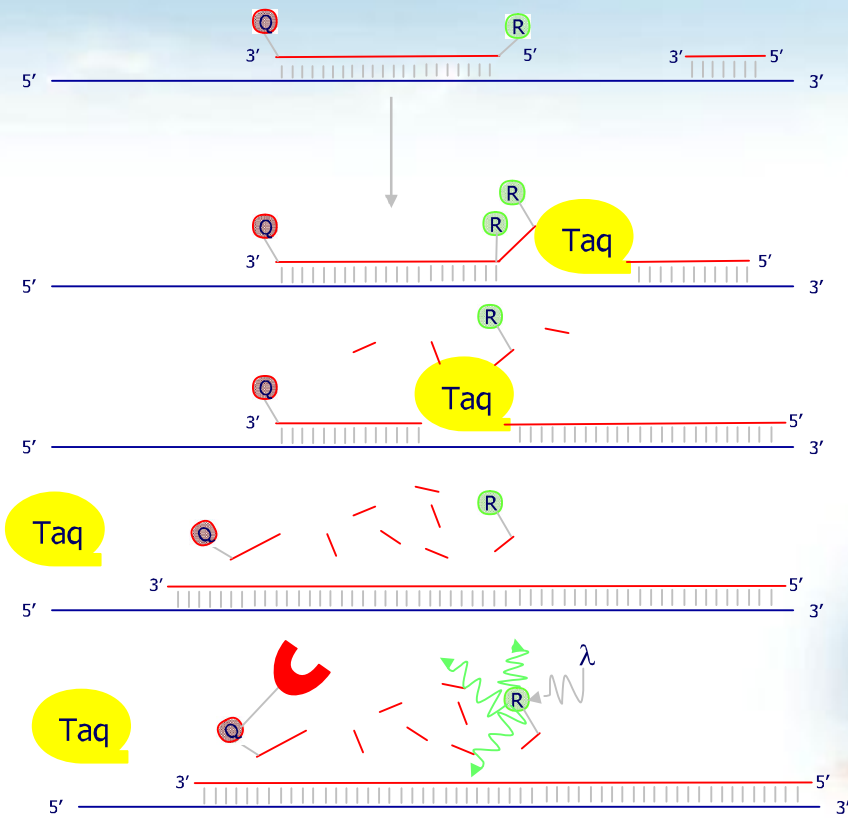
**Add Master Mix
and Sample**

Denaturation

上海交通大学医学院



TaqMan™



Extension Step

1. Strand Displacement
2. Cleavage
3. Polymerization Complete
4. Detection

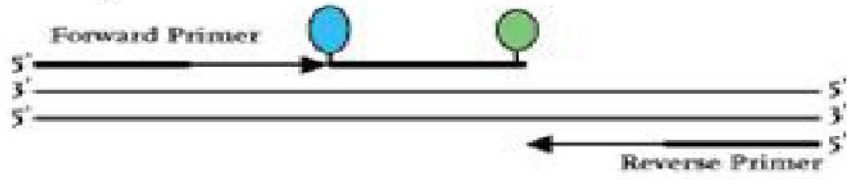
2009年3月

上海交通大学医学院

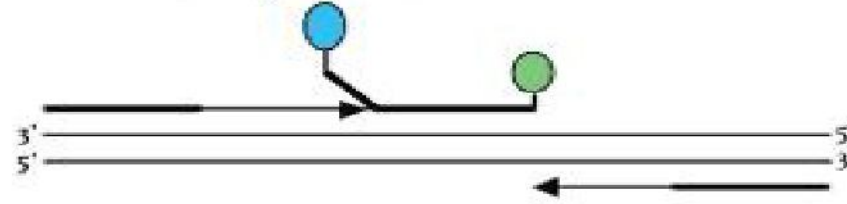


Polymerization

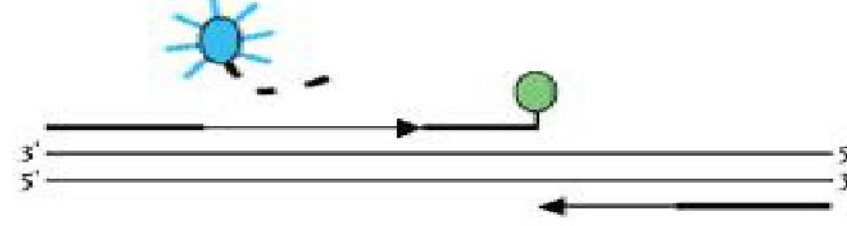
Fig. 1



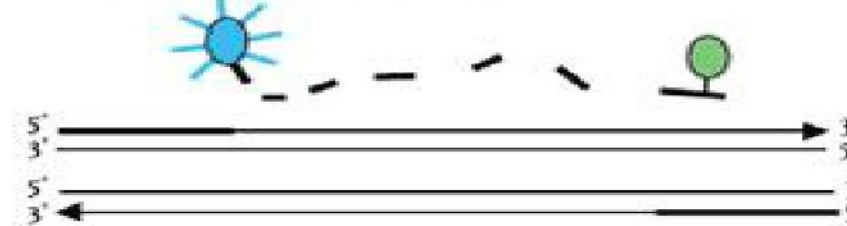
Strand Displacement



Cleavage



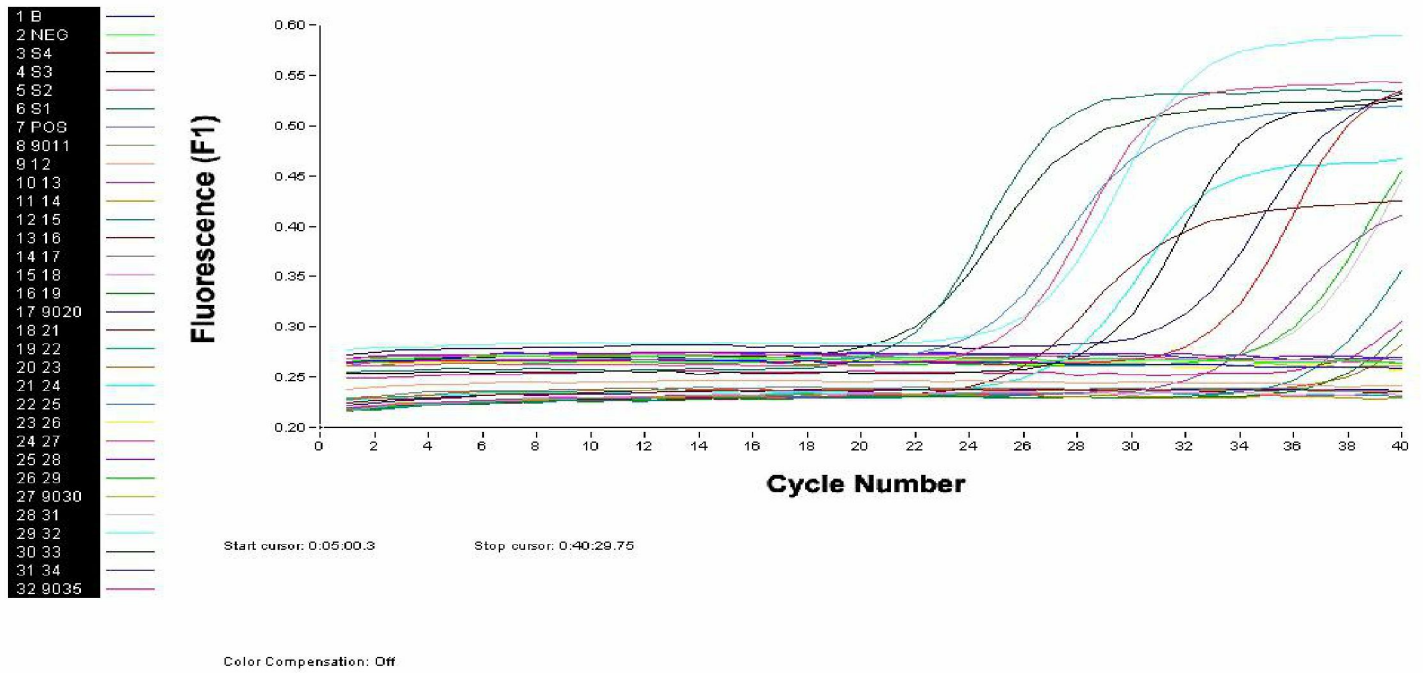
Polymerization Completed





临床标本实时定量PCR的扩增曲线

File: E:\LightCycler3\Users\分子诊断室\Data\HBV DNA\hbv 04-12-31(1).ABT Program: hbv3 Run By: 分子诊断室
Run Date: 十二月 31, 2004 10:31 Print Date:

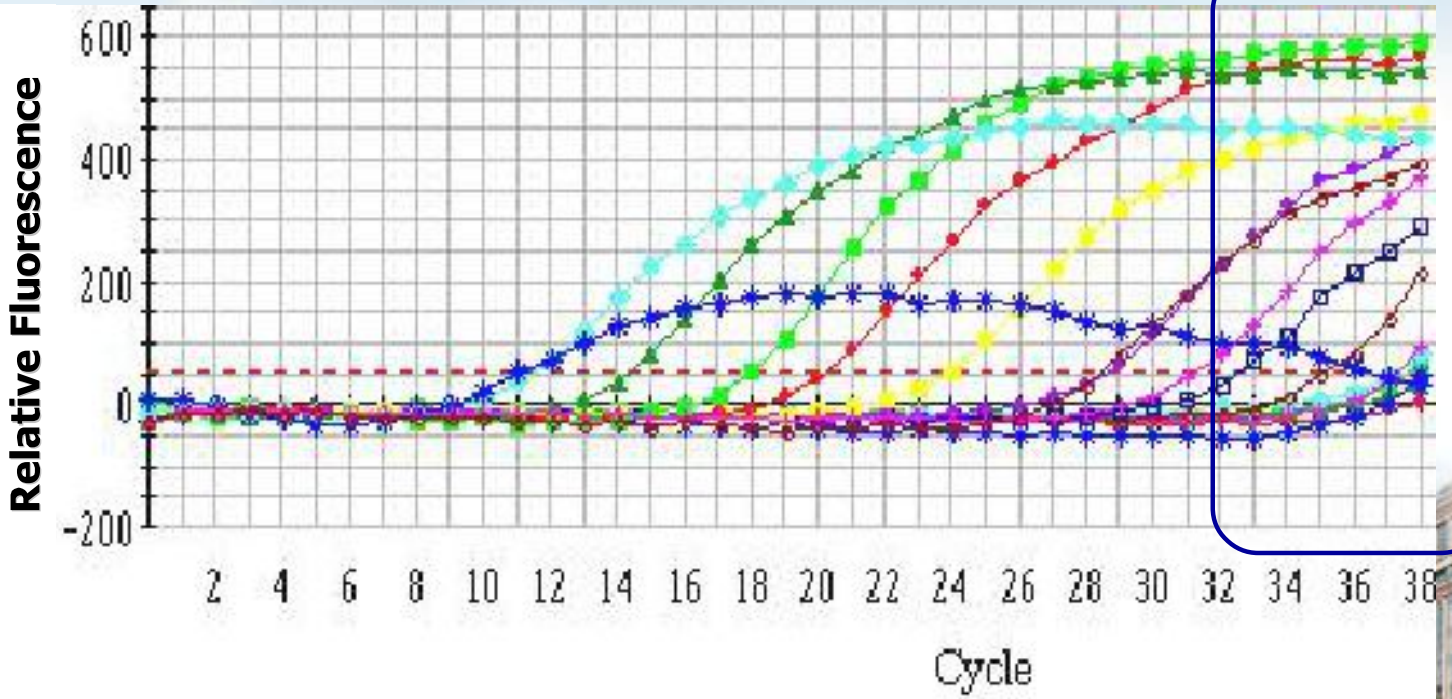


2009年3月

上海交通大学医学院



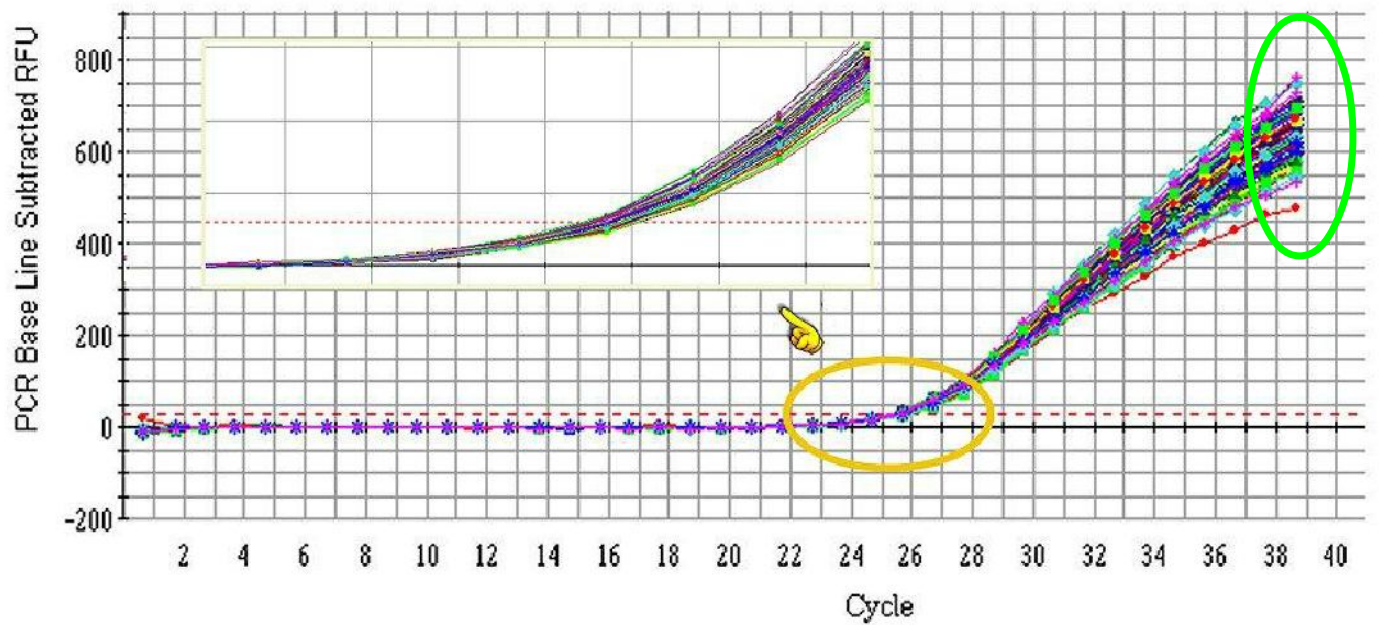
PCR产物的终点检测



2009年3月

上海交通大学医学院

同一份标本作96复管的测定结果



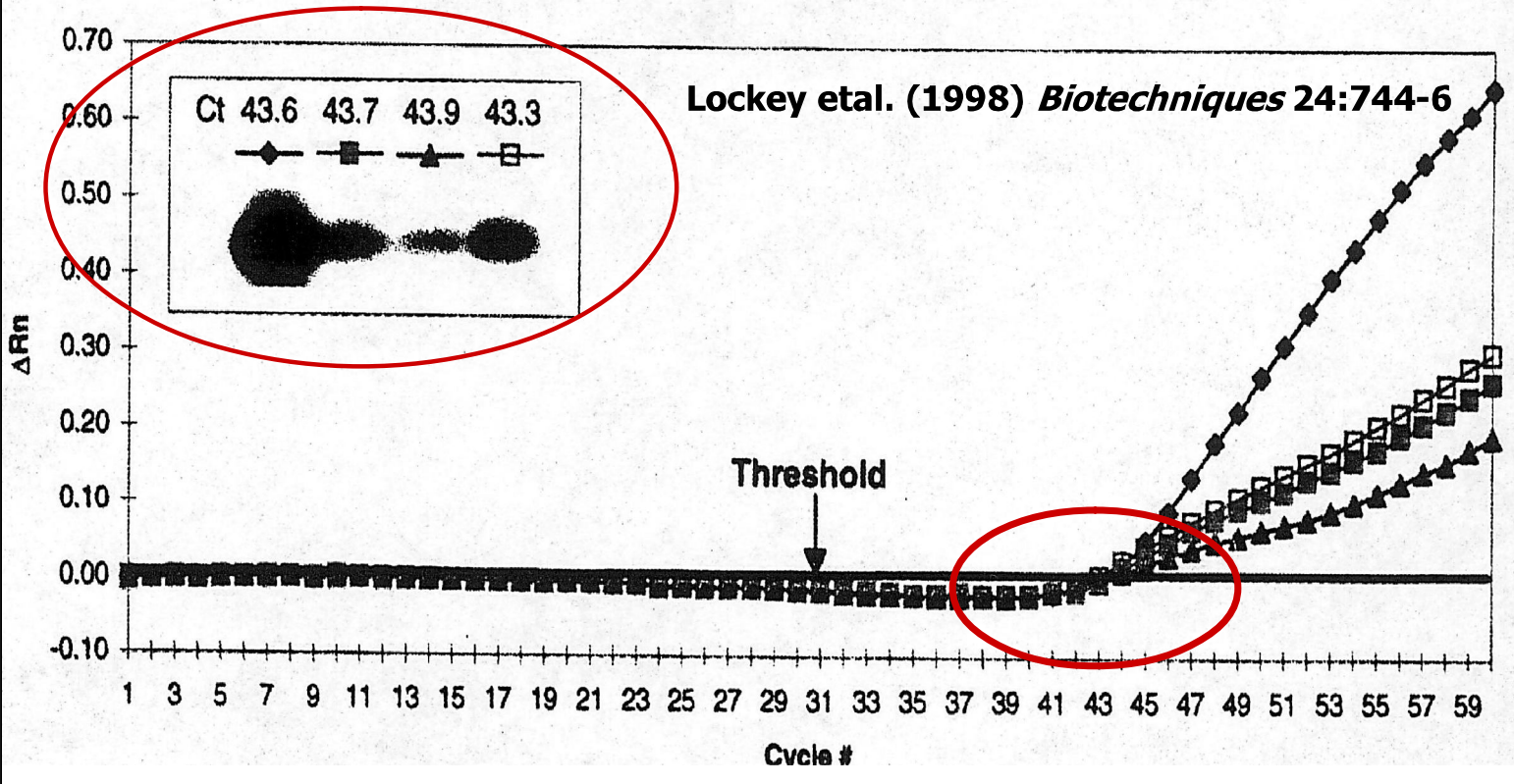
2009年3月

上海交通大学医学院



终点检测与实时监测的结果比较

Panel C: Amplification Plots and Hybridization Results of Ten-Copy Replicates

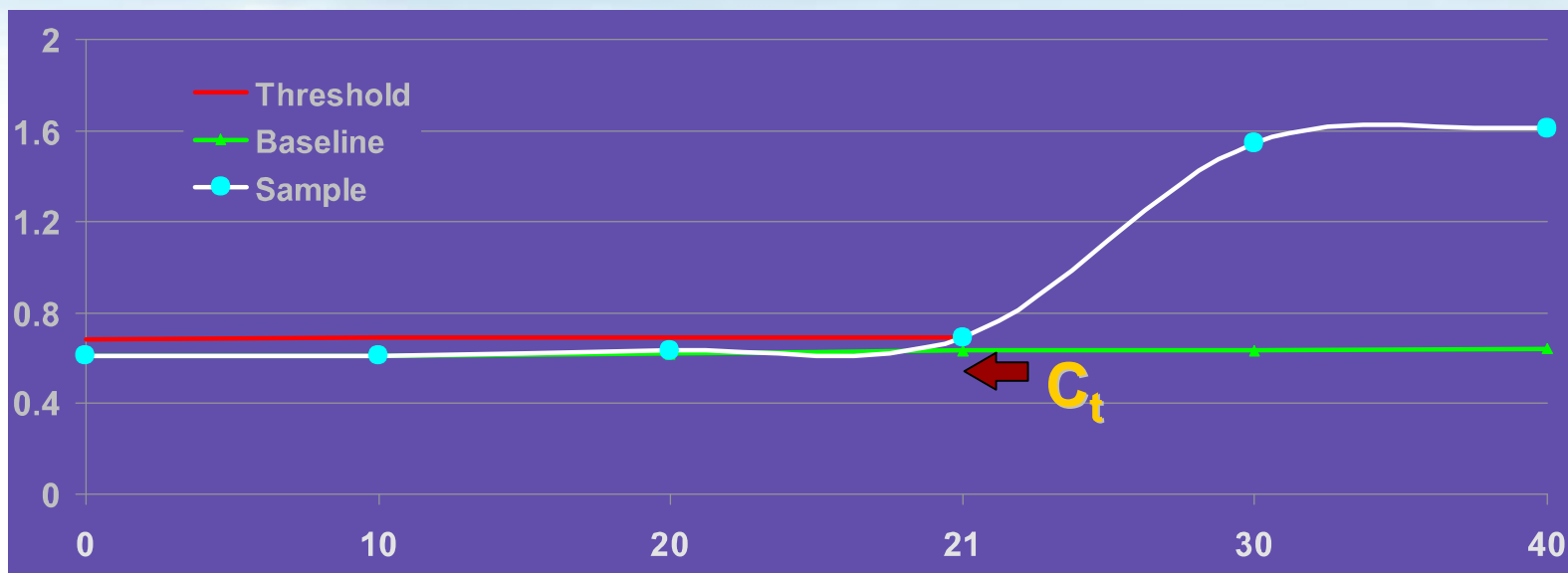


2009年3月

上海交通大学医学院



C_t 值的概念



C_t 值：扩增曲线与基线交叉处的循环数
可以较为客观地反映样本中靶基因的初始拷贝数

2009年3月

上海交通大学医学院



定量PCR的外参照系统

标准曲线的制备

1. 制备标准品并计算标准品浓度
2. 系列稀释的标准品与被检样本同时扩增
3. 仪器软件绘制标准曲线并依据被检样品的Ct值给出每一反应中靶基因的拷数。

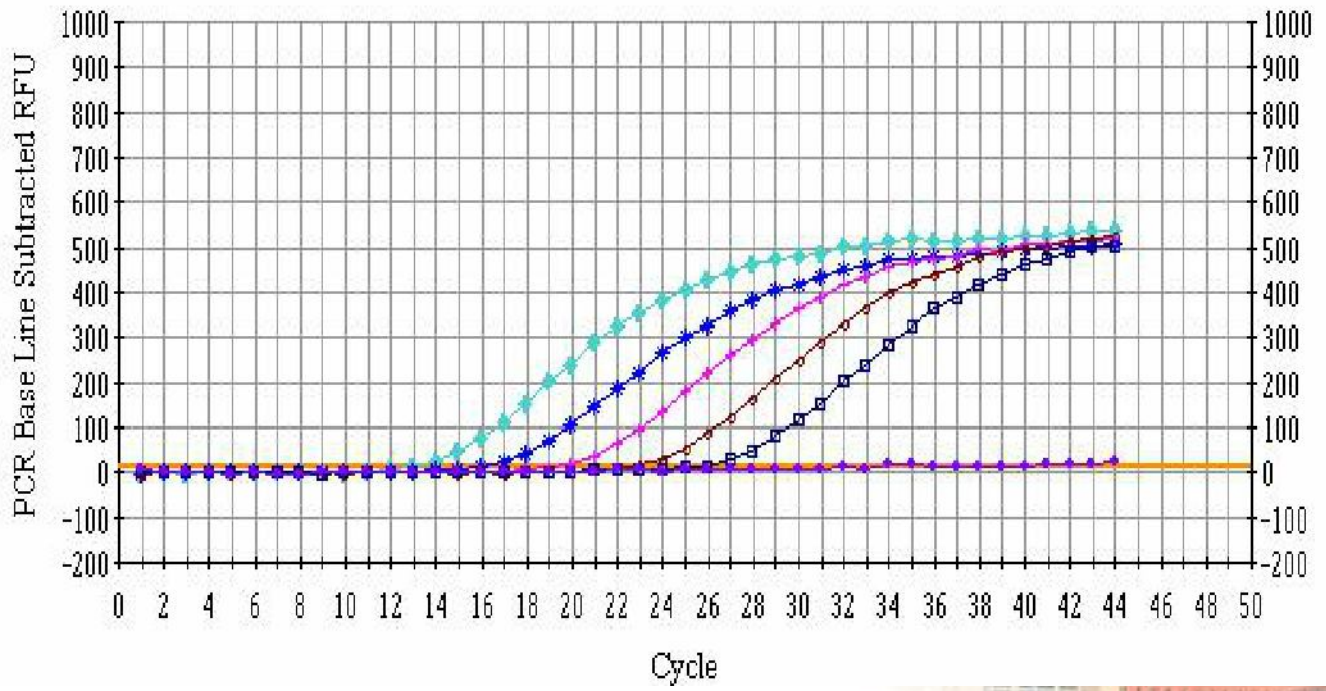
2009年3月

上海交通大学医学院





标准品的扩增曲线

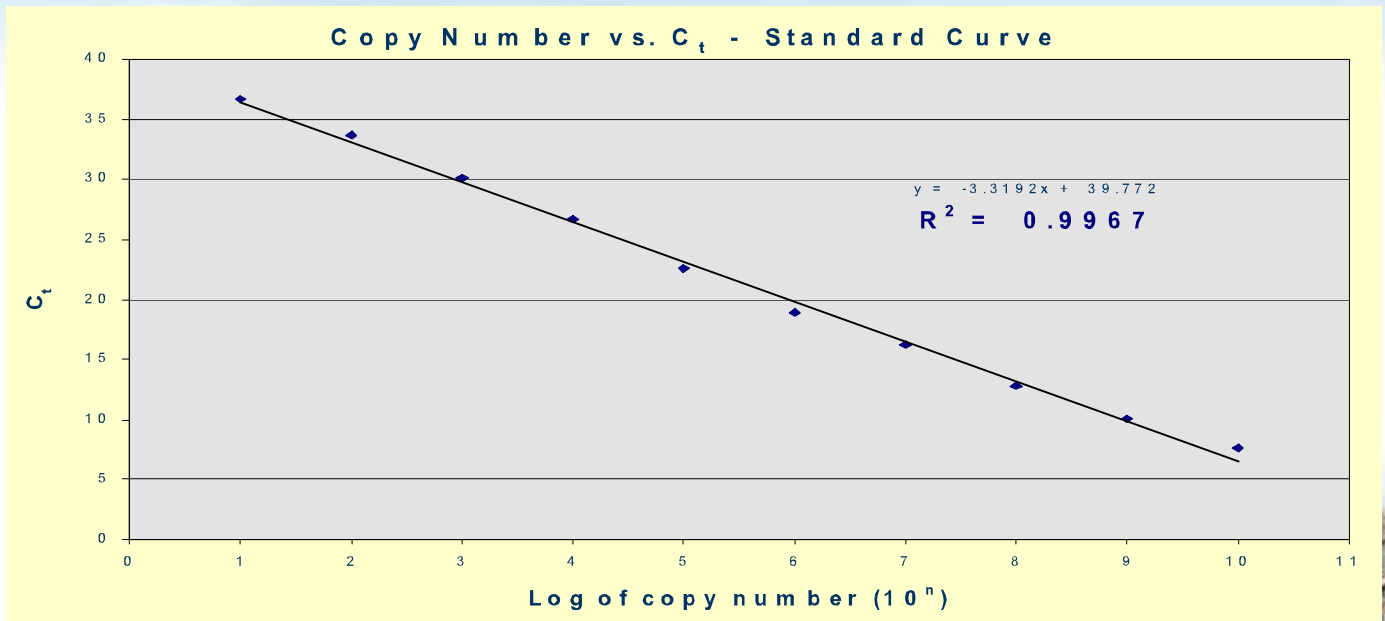


2009年3月

上海交通大学医学院



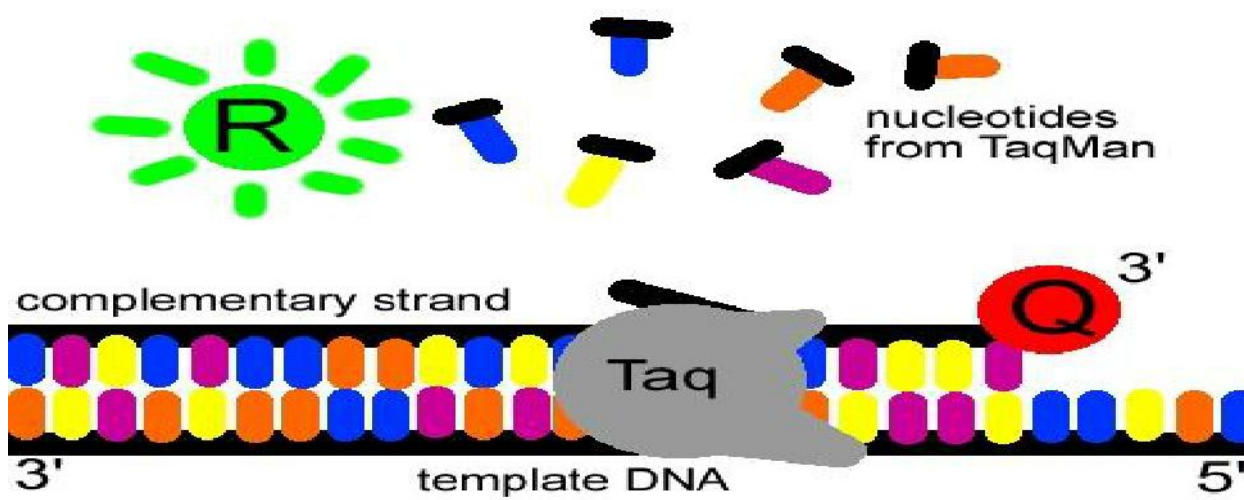
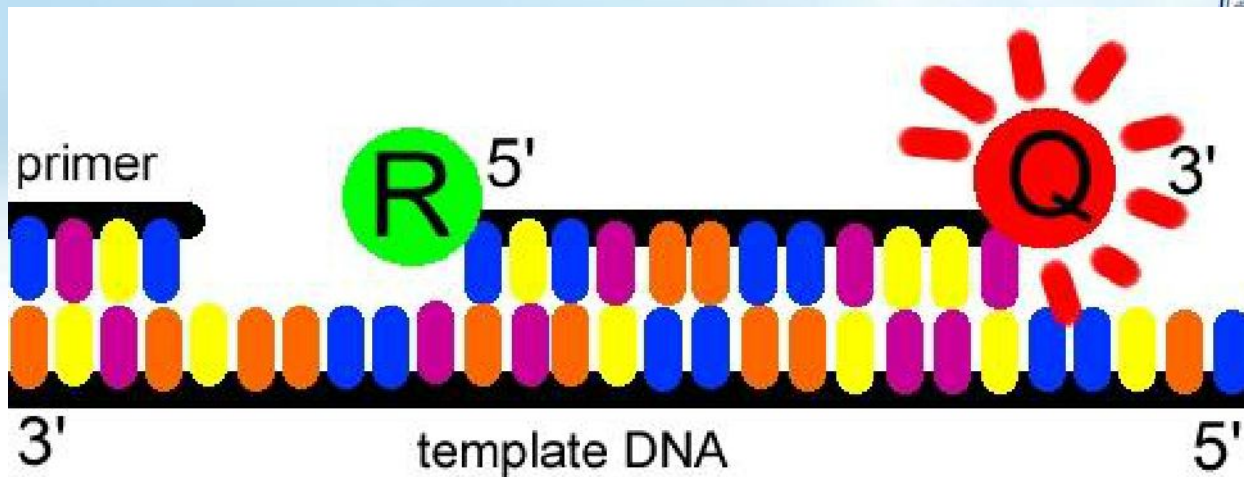
标准曲线



r = 实测数据与所得标准曲线的线性吻合度

2009年3月

上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院





实时定量RT-PCR检测CEA基因拷贝数在 监测胃肠癌微转移中的应用



2009年3月

上海交通大学医学院



- CEA基因在消化系统上皮腺癌，尤其是直肠癌和胃癌中高表达，因此在肿瘤细胞内可检测到其转录本。
- 在正常成人人体内极少表达。

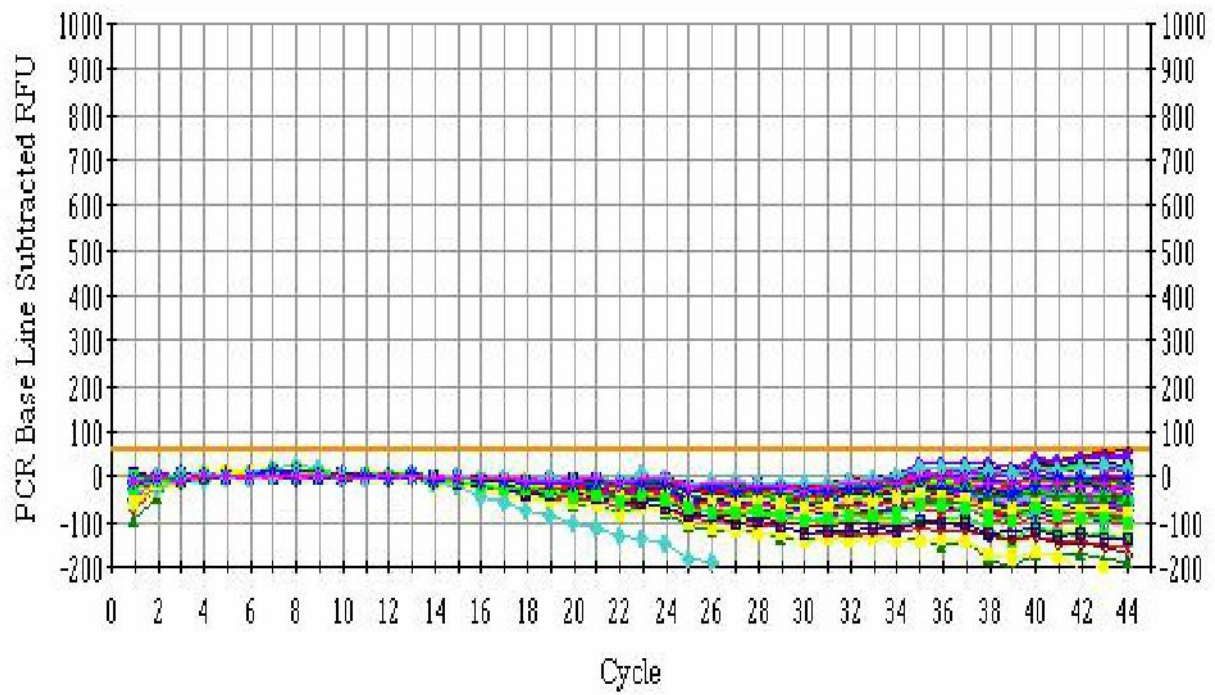


2009年3月

上海交通大学医学院



正常成人人体内CEA基因表达状况

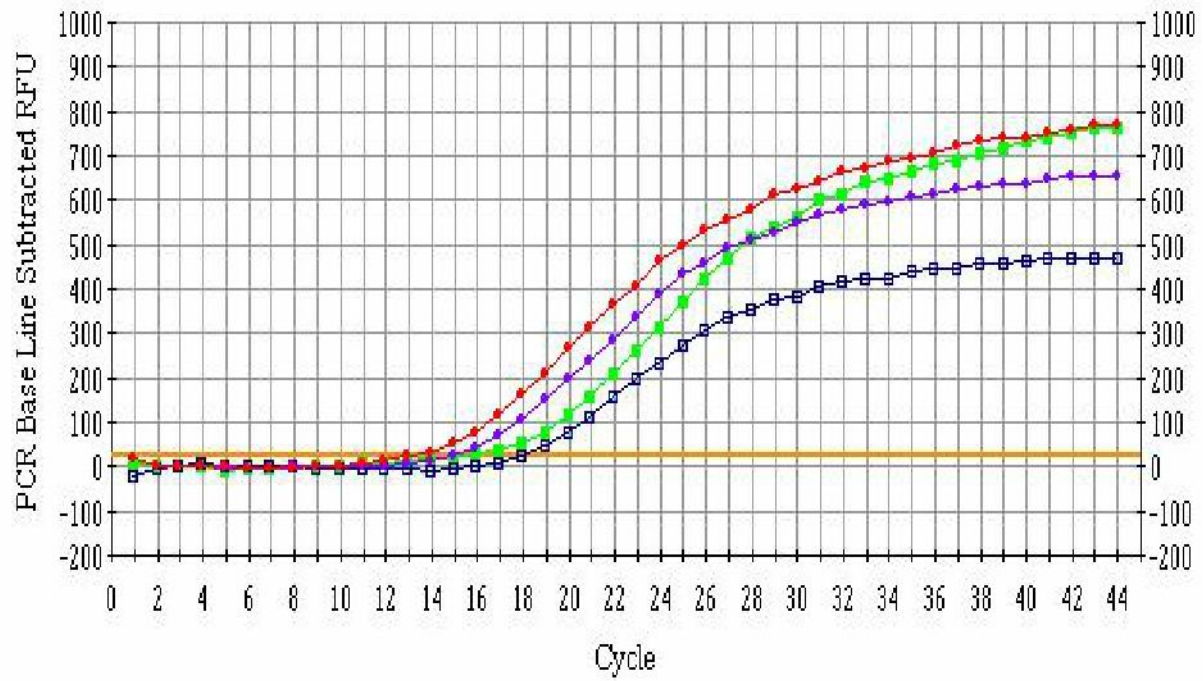


2009年3月

上海交通大学医学院



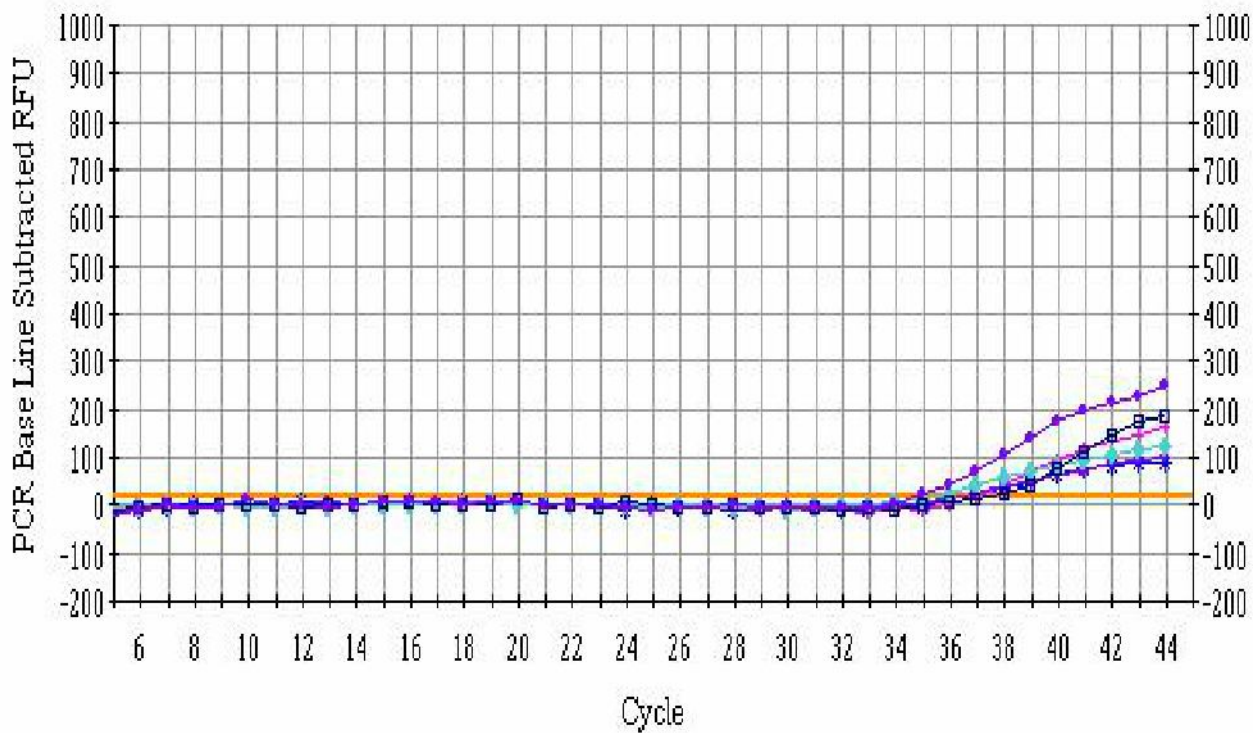
胃肠癌肿瘤组织中CEA基因表达状况



2009年3月

上海交通大学医学院

胃肠癌患者外周血中CEA基因表达状况



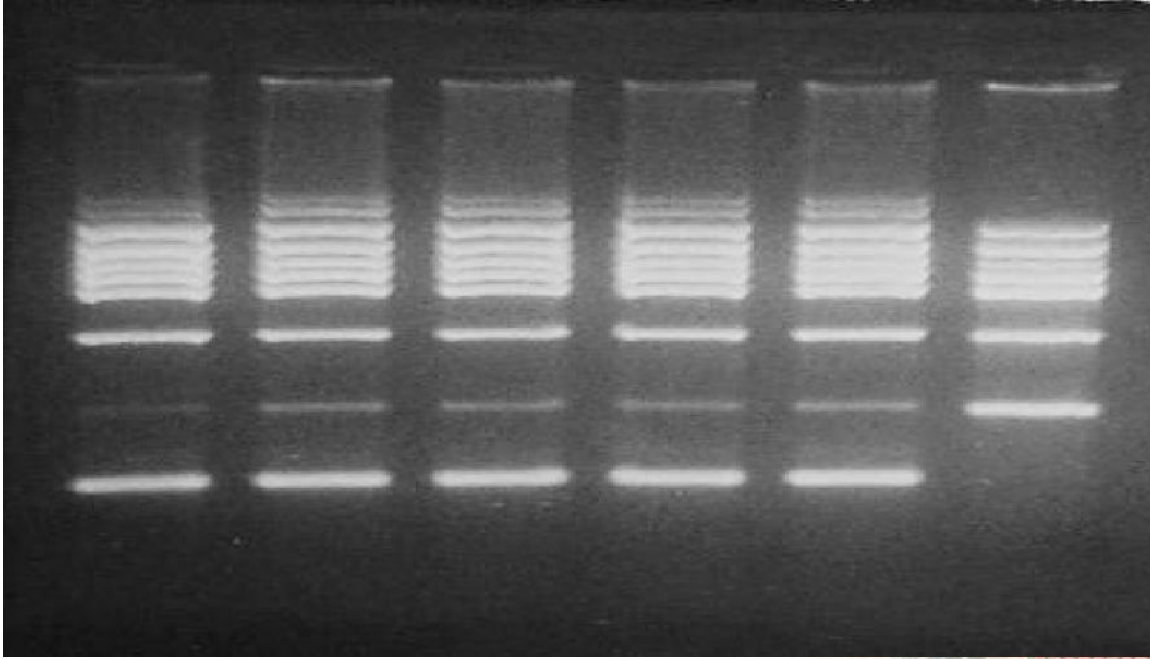
2009年3月

上海交通大学医学院



三、多重PCR (Multiplex PCR)

- 在同一反应体系中加入多对引物，同时扩增一份DNA样本中多个不同序列的靶片段。



DMD 基因外显子缺失的检测

2009年3月

上海交通大学医学院



五、差异显示PCR

(differential display PCR, DD-PCR)

- ❖ 一种以逆转录PCR为基础的研究基因表达差异的技术。
- ❖ DD-PCR主要用于肿瘤和多种疾病的分子遗传学研究，是目前筛选基因表达差异比较有效的方法之一。

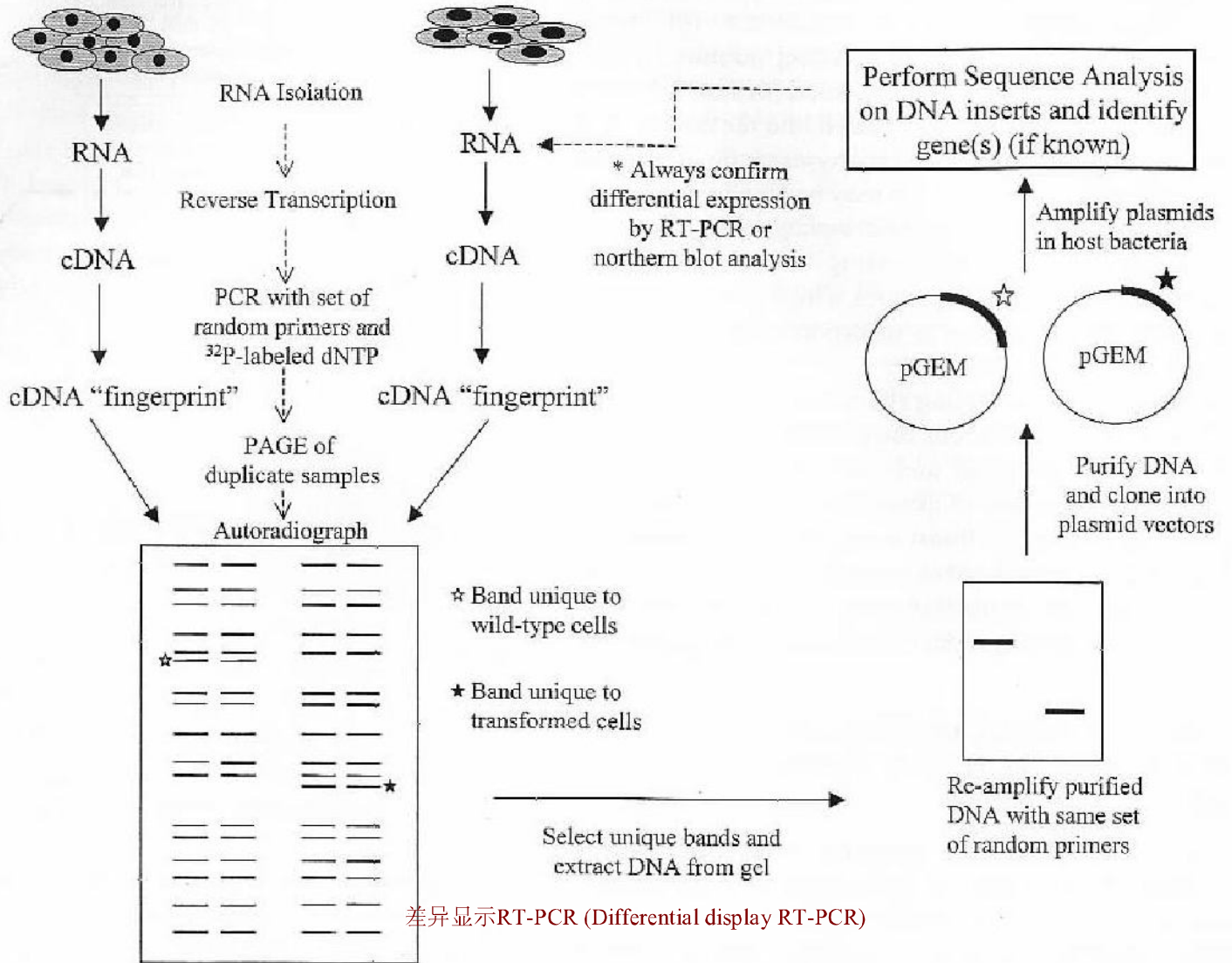


2009年3月

上海交通大学医学院

Wild-type Cell Line

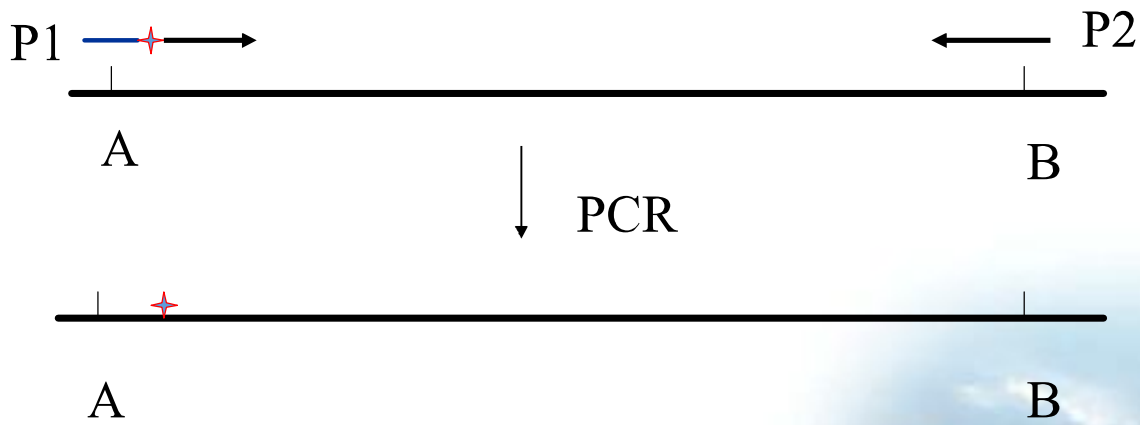
Transformed Derivative





六、PCR诱导定点突变

❖ (一) 引入点突变



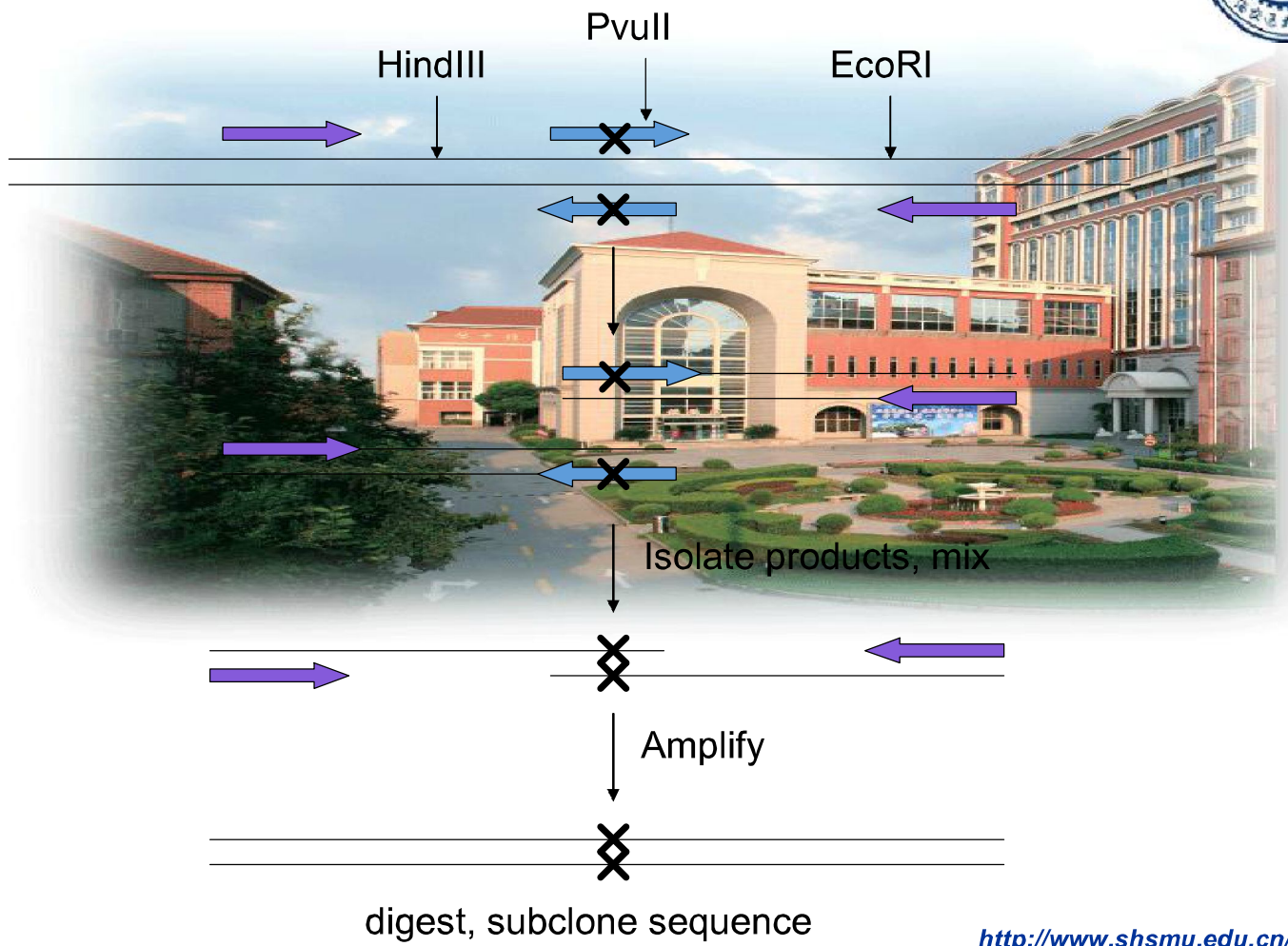
用酶A和B消化，将突变位点引入PCR产物（末端）

2009年3月

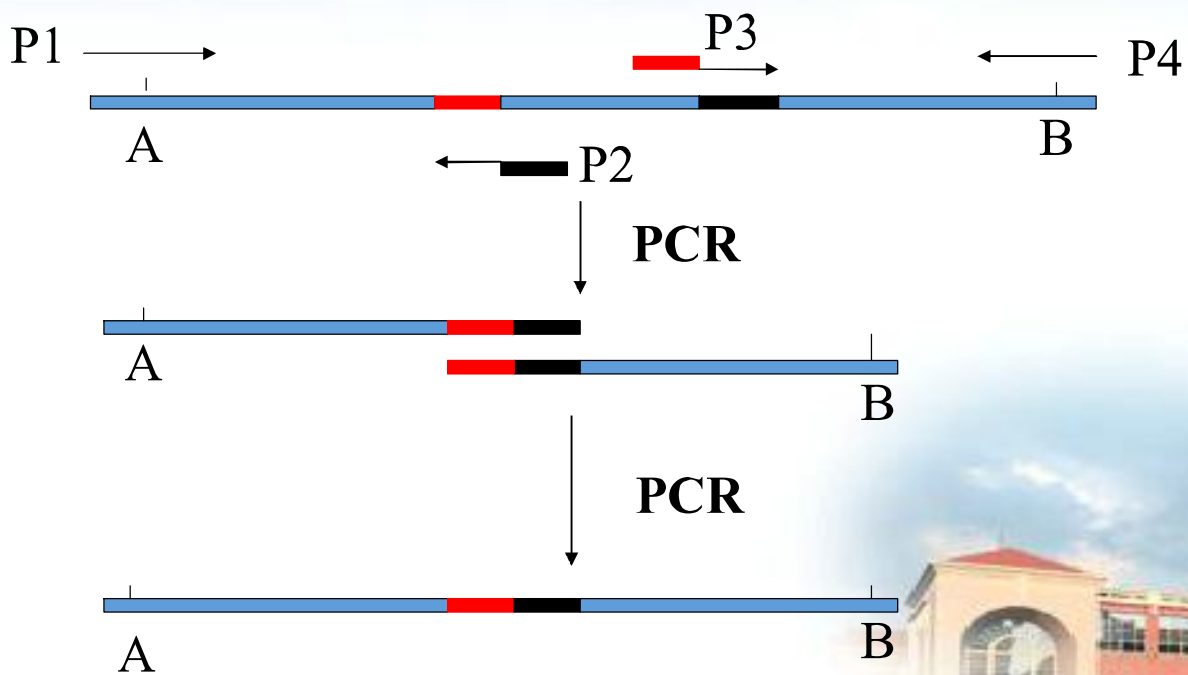
上海交通大学医学院



PCR mutagenesis (将突变位点放在PCR产物中间)



(二) 引入片段性缺失



2009年3月

上海交通大学医学院

讲课内容



1

第一节 PCR技术

2

第二节 以PCR为基础的相关技术

3

第三节 PCR 产物的检测



2009年3月

上海交通大学医学院



第三节 PCR产物的检测

<http://www.shsmu.edu.cn/>



- ❖ PCR-限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP)
- ❖ 等位基因特异性寡核苷酸
(allele specific oligonucleotide, ASO)
- ❖ 单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP)
- ❖ 变性梯度凝胶电泳 (DGGE)
- ❖ 融点曲线分析 (melting curve analysis)
- ❖ PCR产物的序列分析

2009年3月

上海交通大学医学院





一、PCR-RFLP

利用正常序列或突变序列是否处于限制性内切酶的酶切位点而设计。若点突变处于某一限制性内切酶的酶切位点内，可在突变点两侧设计引物，使PCR产物含有该突变序列。用相应的内切酶对正常产物和突变产物进行水解并作电泳分离，可根据水解片段的大小和电泳位置区分二者。



2009年3月

上海交通大学医学院



MstII restriction sites around β -globin gene



Possible RFLP Data

Normal	Carrier	Sickle Cell	
			1.4kbp
			1.2kbp

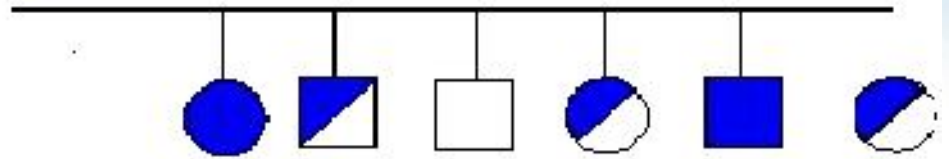
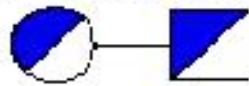
copyright M.W.King 1996

RFLP诊断镰状细胞贫血

2009年3月

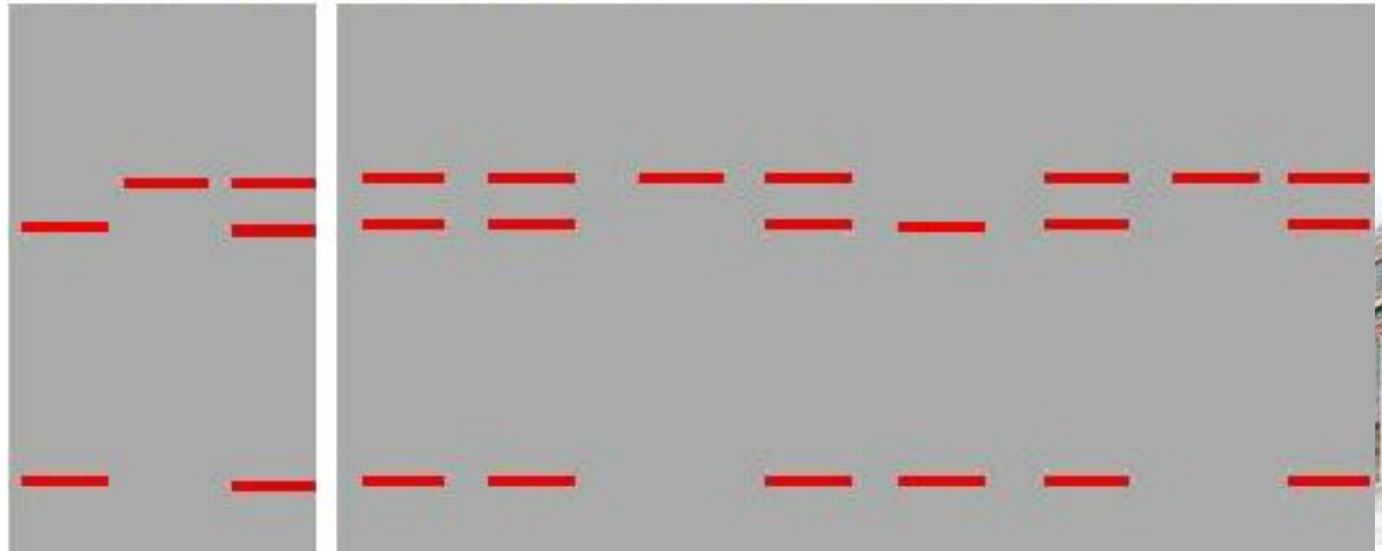
上海交通大学医学院

Inheritance of an Autosomal Recessive Disease Allele Determined by RFLP Analysis



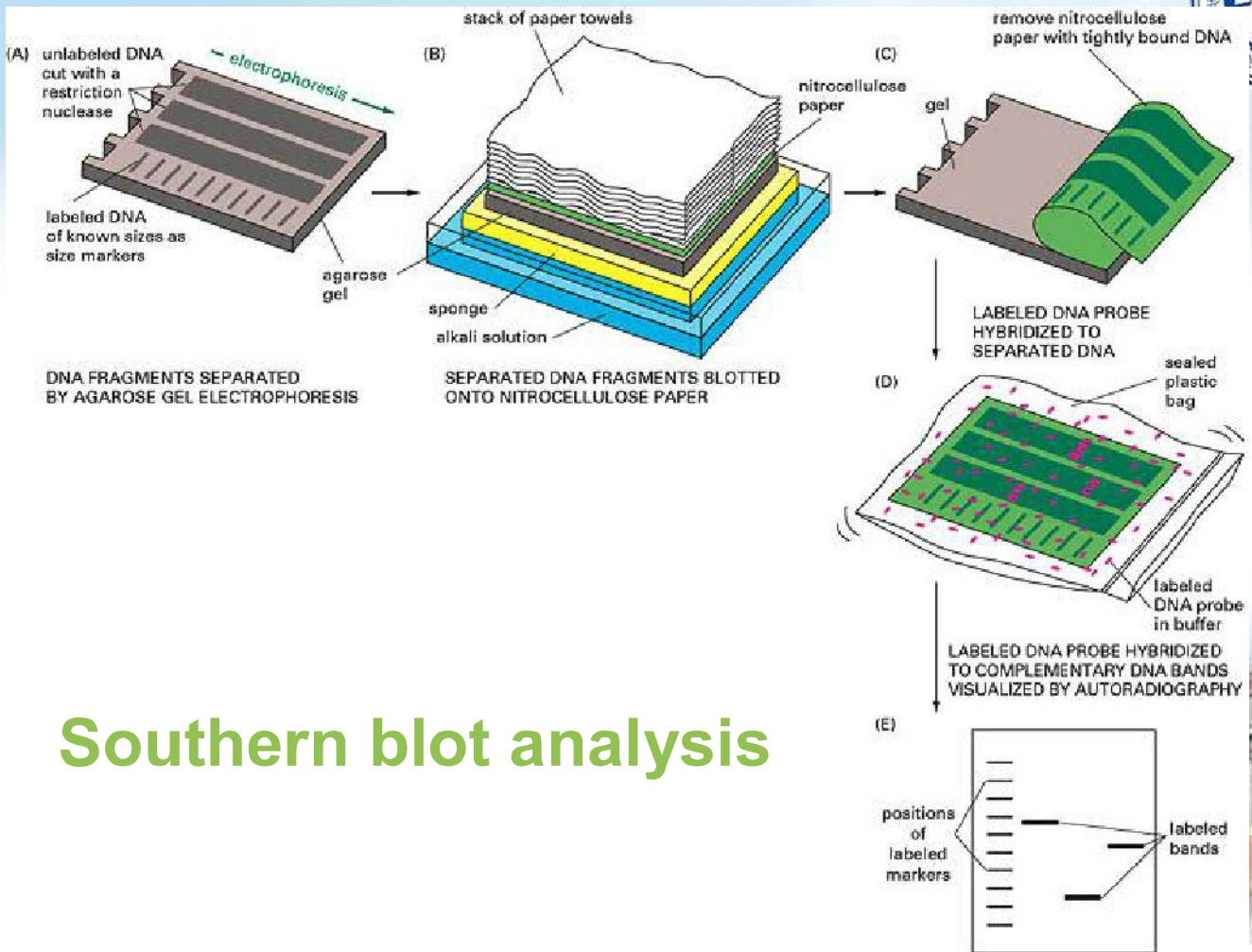
Genotypes

AA aa Aa Aa Aa aa Aa Aa aa Aa



2009年3月

上海交通大学医学院

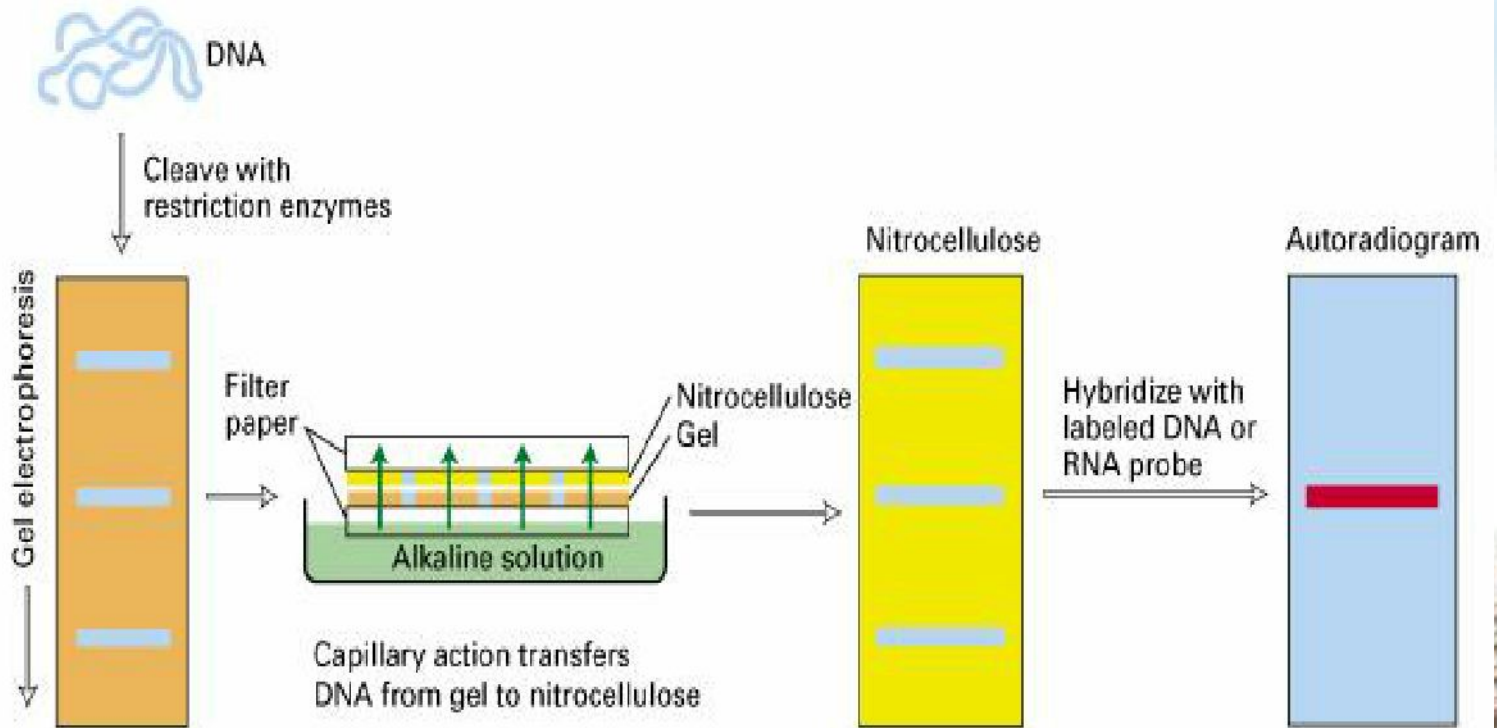


Southern blot analysis

2009年3月

上海交通大学医学院

Southern blot analysis



2009年3月

上海交通大学医学院



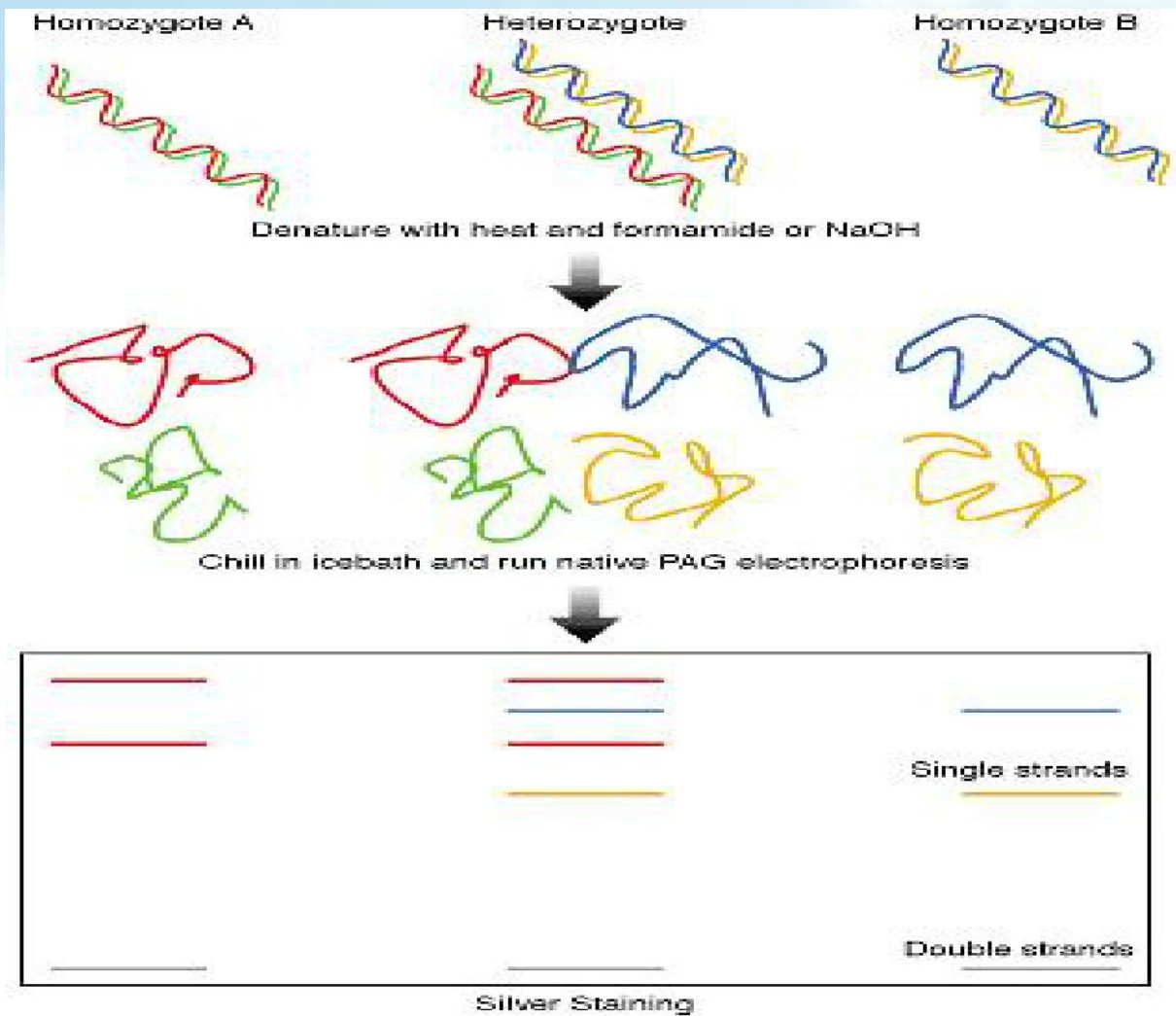
PCR-SSCP

单链DNA分子具有特定的二级空间构象，取决于该分子本身的碱基组成。突变DNA的PCR产物经变性后产生与正常DNA空间构象不同的两条单链在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中时，不同构象的单链片段具有不同的电泳迁移率，从而能区别正常与突变的DNA

不同顺序  不同构象  不同电泳行为

2009年3月

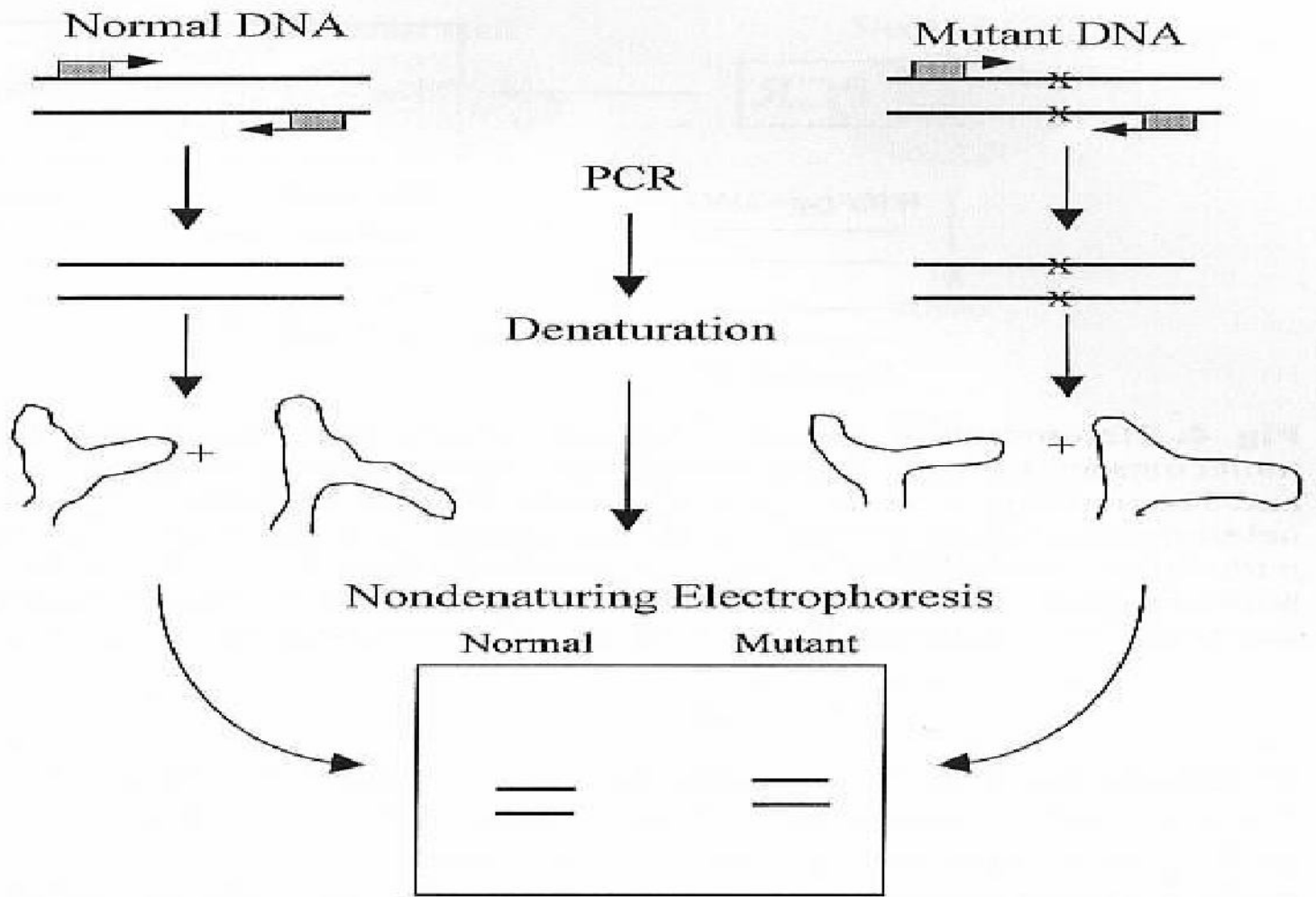
上海交通大学医学院



2009年3月

上海交通大学医学院





2009年3月

上海交通大学医学院



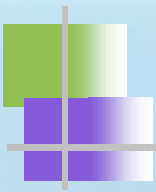
变性梯度凝胶电泳 (DGGE)

DGGE是一种筛选单碱基突变及多态性的方法。DGGE检测突变的原理是基于被检DNA双链的解链温度因该序列存在突变而发生改变从而能区别正常序列和突变序列。

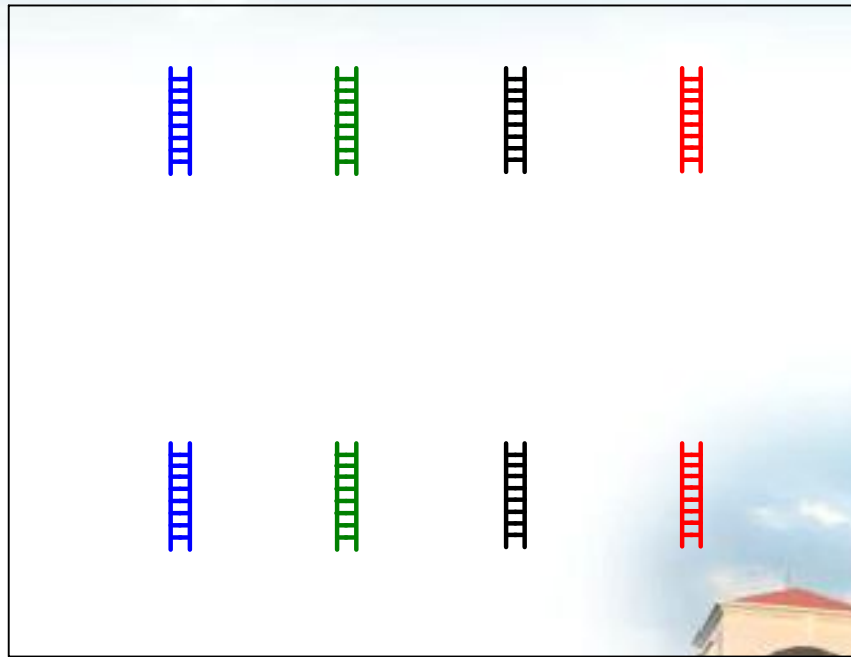
DGGE的突变检出率可达90%~100%。

2009年3月

上海交通大学医学院



H



(-)

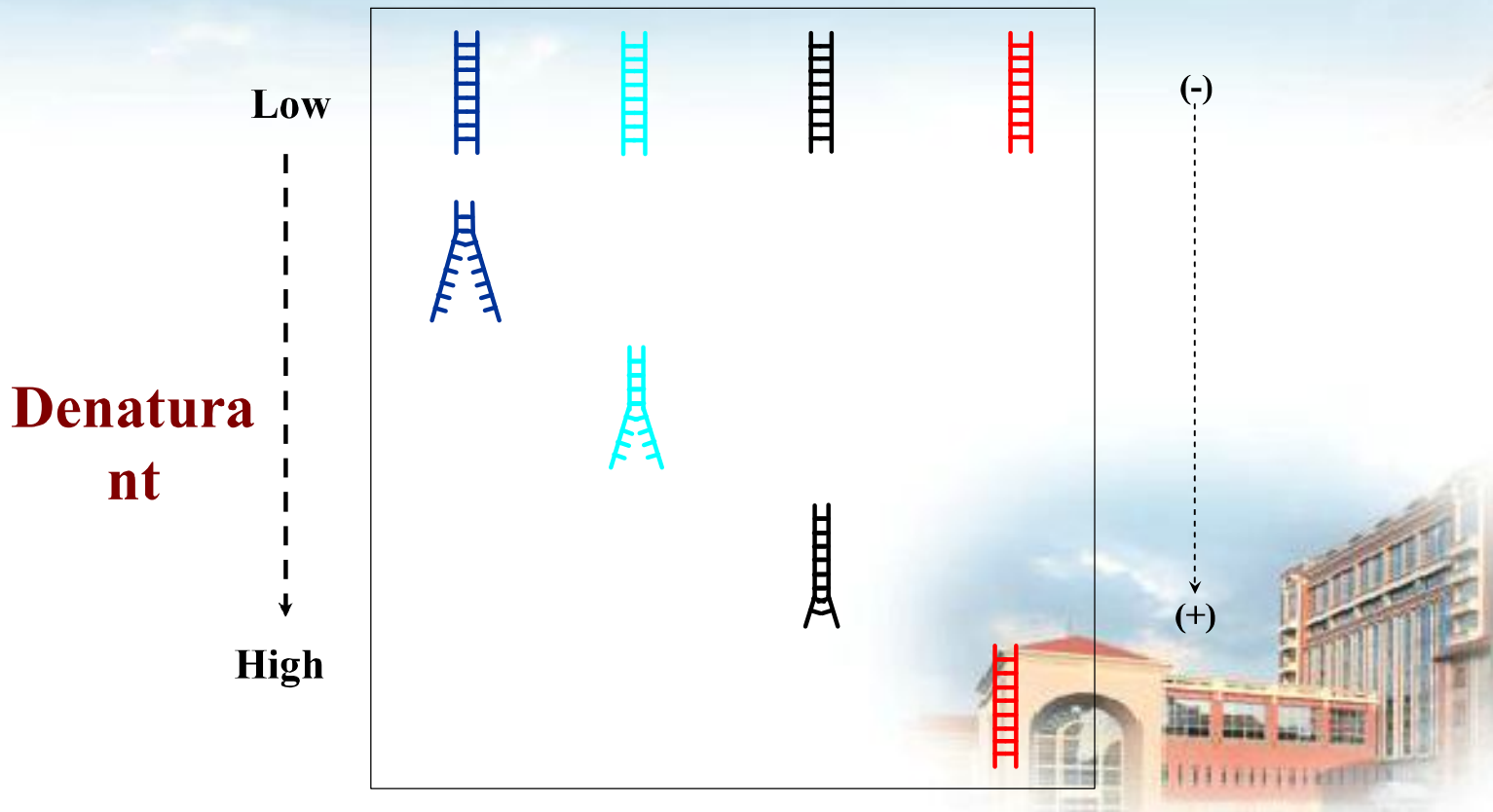
(+)

2009年3月

上海交通大学医学院



Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)



2009年3月

上海交通大学医学院

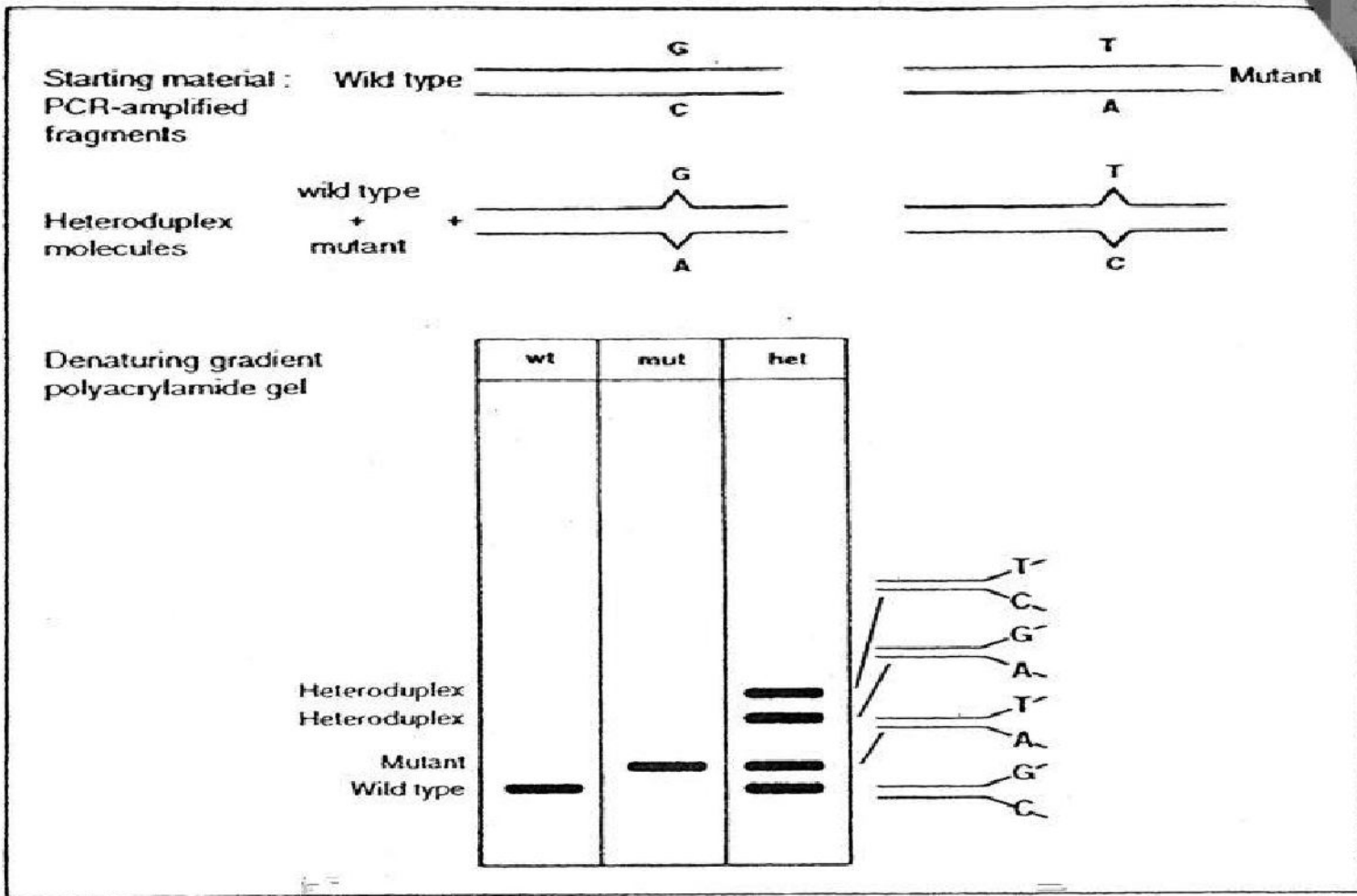
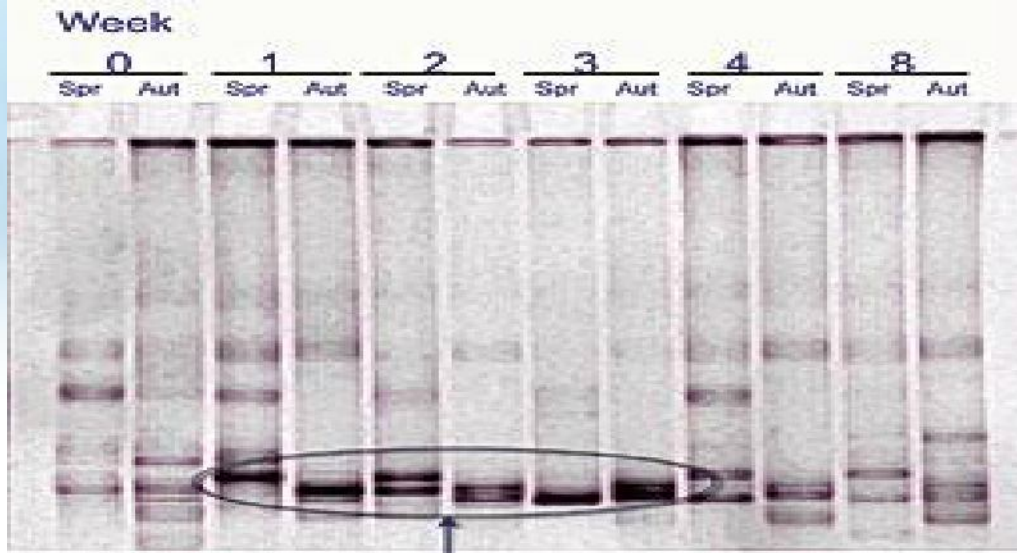


Figure 6

Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE).



A few dominant DGGE bands after 1-3 weeks of biodegradation





熔点曲线分析 (melting curve analysis)

PCR产物的序列分析 (DNA sequencing)



2009年3月

上海交通大学医学院