维普资讯 http://www.cqvip.com

重庆医科大学学报 1993年第18卷第3期

聚合酶链反应，PCR，医学，应用，进展

(24)
238-242

PCR技术及其在医学上应用的新进展

生物化学教研室 陈嵩 综述 吕越娟 审校

Q503

中图分类号 R398.5

1985年Saiki[1]等首次报道了聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）技术，可以快速扩增微量DNA片断。1988年Gelfand[2]等用Thermus aquaticus耐热性DNR聚合酶（Taq酶）代替大肠杆菌DNA聚合酶的Klenow片断，使PCR技术走上了实用道路。随着基本方法的不断完善，它已成为医学研究领域及临床诊断的重要手段。本文对PCR方法及其在医学上应用的新进展作一介绍。

一 PCR技术的基本原理

PCR是一种特定DNA序列的体外酶促合成方法。用二个分别与该序列两条链上端互补的寡核苷酸为引物，引物的3′—OH末端即为DNA聚合酶酶促合成DNA的起点，经模板变性，引物退火及引物延伸等三个步骤的多次循环，各步分别在不同的温度下进行（92—95℃，40—65℃和72℃）。其结果使特定DNA片断呈指数级积累，片断的末端是由引物的5′末端决定，片断的长度由两引物5′—末端之间的靶DNA序列所限定。由于上一个周期中引物延伸产物可作为下一周期的模板，所以靶DNA拷贝数目在PCR过程中近似$(1+x)^n$倍数递增。x是扩增效率，n为PCR循环次数。但扩增反应并不能无限地进行，经过一定次数的循环后，被扩增的DNA片断不再呈指数级积累而进入线性增长期或静止期，此阶段称为平台期（Plateu）。PCR反应到达平台期的时间主要取决于样品中最初靶序列的拷贝数和扩增的DNA总量。

PCR可扩增双链（ds）或单链（ss）DNA，也可以RNA为模板，经过逆转录和PCR过程扩增cDNA。由于引物参入PCR产物及引物与对应链目的区域之间配对的不严格性，故新的序列特异性突变，限制性内切酶切点，调节序列和标记物可由引物带入PCR产物，为PCR技术的应用开辟新的途径。

二 方法学的改进

1. 反应的误差发生率

最初用于PCR的DNA聚合酶是大肠杆菌DNA聚合酶Ⅰ的Klenow片断。由于Klenow片断不耐热，所以必须在每个PCR周期中添加新鲜的Klenow片断。Gelfand等起用Taq酶从而简化了PCR程序，提高了反应特异性和反应总产量，但Taq酶无3′-5′外切核酸酶校正活性，因而在催化DNA合成时有较高的错误率$(2\times10^{-4}/bp)$[2]、在每次循环它常发生A·T转换为G·C，大概每20—30次循环后必须导致0.3—0.8%累加的突变率。除点突变外，不同的DNA片断的扩增还会产生人为的重组[4]。这些都会给研究人员造成一种假象。所以，应认识到由PCR获得的克隆不会与经典克隆具有同等的价值。若要求由PCR扩增的DNA序列具有高度忠实性，则可用T_4 DNA聚合酶代替Taq酶。因为T_4 DNA聚合酶合成的错误

维普资讯 http://www.cqvip.com

率低于10^{-7}/bp[5]。如果启始的DNA物质仅只有一个分子或损害很厉害（如古代标本），那么这些克隆最好用几种不同的PCR反应，这样可在大分子片断中发现由最初几次循环而引起的突变[3]。然而T_4 DNA聚合酶耐热性差，因而限制了它的应用。近来，有报道从Thermococcus Litorolis分离出耐热的VENT DNA聚合酶具有3′-5′外切核酸酶活性，而且合成DNA的错误率亦低[6]。对此酶的3′—5′外切核酸酶活性降解单链分子（如引物或引物退火前的PCR产物）是否影响扩增反应，尚需要进一步研究。

此外，具有3′—5′外切核酸酶活性的DNA聚合酶可能不适用于序列特异的引物扩增反应，因为它可去除引物3′—末端的错配碱基。最近，Tse等经过实验证明Taq酶具有逆转录酶活性[7]，并建立逆转录PCR（PT-PCR）法，即用PCR直接cDNA克隆以分析异常的mRNA，也有助于建立单体系的RNA扩增和序列分析。在用Taq酶进行DNA扩增分析时，DNA溶液，组织提取液，细胞悬液中的RNA应加以处理，否则会出现非特异性产物。

2、反应特异性

最初的PCR方法用Klenow片断虽能从基因组中将特定的DNA片断扩增200,000倍，但事实上，只有约1%PCR产物是靶DNA片断[8]。因此，需要用特异的探针作以后分析。Taq酶介导的PCR由于提高了引物退火温度和延伸温度，最大限度地减少了模板错配使反应特异性明显提高。Edcert等报道提高退火温度和降低Mg^{++}浓度能够增加反应特异性。

引物浓度也是影响反应特异性的重要因素。在PCR反应体系中引物浓度过高，而模板浓度很低时，易形成引物二聚体（primer—dimer）。如果两引物的3′—末端互补的话，便容易出现引物二聚体。无论怎样，如果引物二聚体成为PCR反应的障碍，可减少引物的用量来克服。

人们在研究Taq酶性质时发现在低于其最适温度时仍具有较好的延伸活性。因此，在PCR反应的初期，由于非特异性退火于部分单链区域的引物能被延伸并于72℃前停止。如果这些非特异性退火和延伸的引物3′—末端相对，将导致非特异性扩增，Faloona[10]等提出在反应达到高温度（>70℃）时，加入Taq酶和$MgCl_2$于反应体可以有效减少非特异性扩增，并称之为"热起动"(hot start)，此法也能大大减少引物二聚体形成。1987年Mullis等用大片断Klenow作PCR扩增时，曾采用内引物(nested primers)法来提高反应特异性[8]，扩增出外引物(out primers)延伸产物内部一段特定的序列。但此法需在外引物伸延反应完成后减少原外引物浓度及加入内引物，因而增加了前次反应产物对第二次扩增反应的污染机会。Higuchi提出把外引物的5′末端设有G-C夹子结构，而内引物则很短（或富含AT）。这种外引物退火及延伸温度较高，而内引物则较低。将两者同时加入反应体系，初始在较高温度下进行PCR过程，使外引物退火及延伸。经过几次周期后，降低退火温度使内引物退火，再经n+x周期后，降低变性温度以阻止前PCR产物变性使之不能作外引物的反应模板。Higuchi用此方法从70,000个细胞背景DNA中扩增出一条HIV序列。

3、污染问题

目前PCR技术在临床诊断中并未得到广泛运用的一个重要原因是在于该方法灵敏度高，极易因微量污染而带来的假阳性[12]。临床实验室的污染源主要包括外源性DNA，临床标本之间的交叉污染以及先前PCR产物的遗留物（carry—over），而后者被认为是主要的[12]。为减少实验室污染的频率和程度，Kwok等提出一系列PCR操作的卫生指导[14]。其中包括隔离不同的工作区，使用一次性吸管，反应试剂分装，尤其是应

维普资讯 http://www.cqvip.com

该有少量低浓度靶DNA的阳性对照和多种试剂空白对照及病原体阴性对照。

近来，采用酶学方法和光化学法消除前次PCR产物的污染，其原理皆是通过破坏能引起扩增的遗留靶模板。在酶学法中[15]，先用dUTP替代前次扩增反应混合物中的TTP使PCR产物只含U而不含T。然后把尿嘧啶DNA糖基酶（UDG）加入待扩增的反应体系，它从含尿嘧啶DNA的磷酸酯链上去除尿嘧啶，而对含胸腺嘧啶的模板DNA无作用。缺失了尿嘧啶的DNA将阻止DNA聚合酶继续合成并且缺失部位易被酸或碱水解。UDG可在变性温度（95℃）下失活，故不影响以后的PCR过程。在光化学法中[16]，利用4′-amino-methyl-4, 5′-dimethylisopsoralen(4′-AMDMIP)的光化学性质消除先前反应产物的污染。在扩增反应前把(4′-AMDMIP)加入PCR反应体系，它不干扰引物退火或Taq酶活性，而且具有耐热性。经过扩增后，用长波紫外光照射反应混合物，Isopsoralen被活化为Psoralen而DNA未被破坏。活化的Psoralen与双链DNA的嘧啶残基形成环丁烷复合物，阻止DNA聚合酶在DNA链上移动。这两种方法均不破坏单链模板DNA，因而对分子杂交无影响，还可进行克隆和序列分析。

4. PCR产物的分析

已往采用同位素标记，Southern blot，分子杂交等均较繁琐。Saiki等描述的反向斑点印迹有效地把非同位素检测和PCR扩增相结合[17]，使遗传变异的分析大为简化。Wahlerg[18]等利用DNA固相技术对PCR扩增产物进行分析，其设计原理如图1，此方法简单，并可定量和操作自动化。为减少非特异性扩增对检测结果的干扰，Keller[19]等采用与扩增DNA片断内部的序列相配对的寡核苷酸作为捕获探针，把分子杂交技术和固相分析法相结合。最近，Nickerson[20]等报告了一种酶联免疫—寡核苷酸连接分析

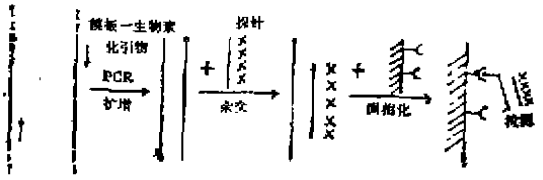


图1 PCR固相分析法的原理

(ELISA-OLA)，其灵敏度高于上述方法，更重要的是假阳性或假阴性低。总之，不断涌现的简便而快捷的检验手段，为临床实验室广泛使用PCR技术打开了方便之门。

三 医学上应用的新进展

1. 遗传病产前诊断：

Saiki等曾用PCR技术通过扩增β-珠旦白序列，然后用同位素标记探针杂交或限制性内切酶分析对镰刀细胞形贫血作产前诊断。现在，运用非同位素标记等位基因特异性寡核苷酸探针(ABO)对扩增DNA作斑点杂交[21]。这种方法也用于β-地中海贫血，HLA多态性及其他遗传疾病。近来，Nickerson[20]等采用寡核苷酸连接分析(OLA)，其灵敏度大大提高，而且可自动化操作。对于许多因多个等位基因突变引起的遗传疾病，如囊性纤维化，如果把每一扩增标本固定在几张NC膜上，再各与几个ABO探针杂交，其操作过程复杂。Saiki[17]等采用"反向斑点印迹"将多个寡核苷酸探针固定于一张NC膜上而与标记的PCR产物杂交，使多点等位基因突变分析更迅速而又精确。此方法也用于多种β-地中海贫血及更复杂的分子病研究。目前，PCR技术已用于多种遗传性疾病的诊断[22]。

2. HLA多态性基因分型

HLA Ⅱ类基因区的特异性等位基因与许多自身免疫疾病遗传易感性密切相关。在HLA Ⅱ类基因区，所有多态性基因位于第二外显子。已往通过血清试验，借助细胞学检查及RFLR分析得以识别。但对编码顺序多态性的直接分析仍有困难。使用与第二外

维普资讯 http://www.cqvip.com

显子保守部位互补的引物进行PCR，对来自病人和对照组的Ⅱ类等位基因的顺序分析以及寡核苷酸探针杂交比较两组人群的等位基因的分布。由于血清分型（如DRW6)已被证实在遗传上是异源的，根据顺序分析可揭示与特定疾病更为高度相关的等位基因[22]。例如，DRW6对自身免疫性皮肤病即找常性天疱（py）的相对危险率（RR）是2.5:1，而特定的等位基因即DQβ1.3的相对危险率为～100。与血清学或RFLR分析Ⅱ类多态性不同，根据PCR分析不仅揭示二个等位基因是不同的，并可了解它们如何不同和在何处不同。例如，易感的DQβ1.3等位基因仅在第57位缬氨酸由天门冬氨酸取代，意味着该残基在易感性上是关键。此外，用分型和亚型二者的寡核苷酸探针与DQa'和DPβ，座位多态性外显子的扩增产物作HLA分型[23-24]。这种基因标记对组织移植中供体和受体的组织配型具有重要意义。

3. 癌基因的研究

B细胞滤泡性淋巴瘤患者往往有（14:18)染色体易位，且染色体断点聚集在染色体的极窄小部位，可用一般PCR法检出。Ph'染色体阳性的慢性髓系白血病（CML)），急性淋巴细胞白血病(ALL)等病例，染色体各断点相距过远，不易由PCR扩增和分析。幸而，融合（fasion）mRNA转录本(bar-abl)为白血病细胞所专有，以一个互补于bar顺序的引物和一个互补于(abl)顺序引物扩增特异性"融合"顺序可检测出Ph'染色体易位的存在[25]。此法可监视治疗后最大量残留病根。

用PCR扩增和斑点杂交以及反向斑点杂交技术探测出多种癌症有ras癌基因的突变，如胰腺和结肠癌等有高比例ras基因突变。在第17对染色体的P53肿瘤抑制因子基因[26]，第18对染色体的DCC部位（结肠癌中缺失）及第5对染色体的MCC部位（结肠癌中错位）通过PCR扩增及序列分析发现它们都有特异性突变。除此之外，在Li-Frawmeni综合症患者也发现P53突变体。这些肿瘤抑制基因部位的各种突变的检测对于建立简单的诊断方法提出了挑战。

4. 病毒性传染病的诊断

诊断病毒性传染病的方法主要是通过血清学试验和细胞培养。然而，整合入细胞的病毒基因往往处于潜伏状态，它并不表达。有些病毒不能在体外生长，因些限制了这些方法的运用范围。Ou G.Y[27]等用PCR方法有效地从人类单核细胞中检出HIV-1的前病毒序列，其灵敏度达一个拷贝/10^4—10^5个细胞。Rorgors[28]和Imagawa[29]等分别用PCR方法对受HIV感染母亲的新生婴儿及具有爱滋病高危性而血清学试验阴性的人群进行检测以明确他们是否感染HIV。此外，PCR技术可用于疾病的病原检测。例如，McDonnell[30]等从恶性结膜和角膜组织中发现HPV；Lode[31]等在血清学试验阴性患者血中扩增出一种HIV型的特异性DNA片断。

运用PCR技术在Burker's淋巴瘤、鼻咽癌，成人T细胞白血病，肝细胞癌及宫颈癌中分别检测出EB病毒，人类T细胞白血病病毒，乙肝病毒及人类乳头瘤状瘤病毒的DNA同源序列。检测这些病毒在肿瘤发病机理的研究中提供有价值的预防和诊断情况。

5. 法医学

人类基因组DNA由于存在着数量可变的串联重复序列（VNTR）而呈高度多态性(Polymarhism)，对于基因组内VNTR区域的研究使法医学个体识别得以革新。应用RFLR分析，需有足够量相对未降解的高分子量的DNA，才得到个体特异的DNA"指纹"。然而实践中很难得到。采用PCR技术可从一根头发，单个二倍体细胞，甚至单个精子以鉴别其DNA多态性。1988年Jeffery[13]小组直接在VNTR区域的两侧设计一对引物，对高度多态性的VNTR进

维普资讯 http://www.cqvip.com

行扩增获得成功。他们认为在等位基因长度差别不大和扩增产物较短（<1kb）的座位可获得最忠实和最有效扩增。随后，Jefferys等报导了扩增长度达10kb的VNTR等位基因。起码6种不同VNTR座位可从微克量的人类DNA一同扩增，并可用一组座位特异探针与扩增产物的Southern blot杂交而同时被检测。这种DNA指纹结果具有接近10^{-5}的个体特异度。Horn[9]等用PCR扩增了D17S30区域获得成功。最近，Bruce[11]等用银染和聚丙烯酰胺凝胶（PAGE）分析DNA指纹谱，不需要制备探针，同位素标记及酶切等繁锁步骤。

一个Y染色体特异性的标志物也可被PCR扩增，男性特异的产物可直接在溴化乙锭染色的胶上观察到或通过斑点印迹进行分析。

结束语

PCR代表一种"试管内克隆"类型，它能够在一个简单的自动化反应中扩增一种特异的DNA片断，促进了生物学研究不同领域的分子分析，并逐步在临床推广。由于PCR使DNA分析更加简便易行，如同Chargeff描绘分子生物学是无执照的生物化学实践，PCR技术"使DNA序列民主化"或使分子生物学的实践无需执照。随着反应试剂，仪器和PCR程序的不断发展，研究人员和临床工作者将能够更容易了解各种核酸序列所携带的信息，继续开拓这门有效技术新的应用并不断使之完善。

参考文献

[1] Saiki R K, et al. Science 1985, 239: 1350
[2] Gelfand D H, et al. Science 1983, 239:487
[3] Karlovsky P, et al. TIBS 1990, 15: 419
[4] Pääbo S, et al. J Bio Chem 1990, 265:4718
[5] Eckert, et al. Nucl Acid Res 1990, 18:37
[6] Erlich H A, et al. Science 1991, 252:1643
[7] Tse W T, et al. Gene 1990, 88:293
[8] Scharf S J, et al. Science 1986, 233: 1076
[9] Horn G T, et al. Nucl Acid Res 1989, 17:2140
[10] Faloona F, et al. Paper presented at the sixth international conference on AIDS. 20 to 24 June 1990
[11] Bruce B, et al. Am J Hum Genet 1991, 48:137
[12] Persing D H, et al. J Clin Microbiol 1991, 29:1281
[13] Jeffery A J, et al. Nucl Acid Res 1988, 16:10953
[14] Kwok S, et al. Nature 1989, 339:237
[15] Longo M C, et al. Gene 1990, 93:125
[16] Isaacs S T, et al. Nucl Acid Res1991, 9:109
[17] Saiki R K, et al. proc Natl Acad Sci USA 1989, 86:6230
[18] Wahlerg J, et al. Natl Acad Sci USA 1990, 87:6569
[19] Keller J, et al. J Clin Meroliol 1990, 28:1411
[20] Nickerson DA, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1990, 87:8923
[21] Saiki R K, et al. N Engl J Med 1988, 319:537
[22] Scharf S J, et al. Proc Natl Acad Sci USA 1988, 85:3504
[23] Bagawan T L, et al. Bio Technology 1988, 6:943
[24] Erlich H, et al. Eur J Immunogenet 1991, 18:33
[25] Kawasaki E S, et al. Pro Natl Acad Sci USA 1988, 85:5698
[26] Nigro J M, et al. Nature 1989, 342: 705
[27] Ou C Y, et al. Lancet 1988, 2:538
[28] Rogers M F, et al. N Engl J Med 1989, 320:1649
[29] Imagawa D T, et al. N J Engl Med 1989, 320:1458
[30] McDonnell J M, et al. N Megl Med 1989, 320:1442
[31] Lod e M, et al. Lancet 1988, 2:418

（收稿日期 1992-11-30）