维普资讯 http://www.cqvip.com

聚合酶链反应及其应用

生物化学教研室 刘先俊 综述 吕懿娟 审校

聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction)简称PCR。它由引物介导的在体外将特定DNA序列在DNA聚合酶的作用下进行扩增的方法。为要从生物材料中获得某一段特定的DNA序列(基因),往往需要经过非常繁琐的步骤并花费大量的时间,PCR技术的发明则是在该方面取得了重大突破。这种技术无需构建含目的基因的重组载体以及转化细胞后进行扩增、筛选和提纯等复杂程序,并能克服传统方法的诸多不足。自PCR技术首次报道以来[1],已在很多方面得到广泛应用。尤其是近年来耐热的DNA聚合酶(Taq DNA Polymerase)的应用,使PCR方法不仅具有快速、灵敏、简便的特点,而且其特异性、重复性以及被扩增片段的长度都有较大的提高[2]。本文对近年来PCR方法的改进及应用作一介绍。

一、PCR的原理和方法

PCR技术在体外酶促扩增DNA片段的原理类似于体内天然DNA的复制机制[3],利用DNA聚合酶以解链的单股DNA为模板,以四种脱氧核糖核苷三磷酸作为底物模仿体内DNA的复制过程。主要在附加的一对引物间诱发的5′→3′方向的聚合反应。PCR方法包括下列三步反应的重复循环:

1. 模板DNA的变性

将作为PCR模板的双链DNA置于94℃左右的高温条件下使其变性。此时,DNA的双链解开形成单股的DNA并游离于反应体系中。

2. 引物与模板的退火

在降低温度过程中,加入反应体系中的两种引物将分别退火到相应互补的DNA链上。由于加入反应体系中的引物比模板DNA的分子数大为过量。因此,引物与模板DNA形成复合物的机率远高于模板DNA分子的自身复性。

3. 扩增步骤

在DNA聚合酶的最适温度下,在有四种脱氧核苷三磷酸存在时,DNA链会沿着引物——模板复合物从引物的3′端向前延伸。

以上描述的变性、退火和延伸即为PCR的一轮循环。整个PCR过程一般需要进行25~35轮的循环反应。随着PCR的进行,新合成的产物又可成为下一轮循环的模板。理论上讲,合成产物的数量每经过一轮循环都将增加一倍,可按2^n计算(n为循环次数)。而实际扩增效率通常低于理论值。一般扩增产物的倍率可按下列公式计算:$Y=(1+x)^n$,Y为产物倍率,X为平均效率,n为循环次数。如果按75%效率计算,单拷贝基因经过25轮循环之后,基因拷贝数就超过10^6。

PCR原理可用下图表示:(如图1)。

早期用于PCR的DNA聚合酶是大肠杆菌DNA聚合酶I的Klenow酶[1,4]。由于该酶不耐热,在每次PCR循环中DNA变性时均被灭活而需补加新的Klenow酶。Klenow酶催化DNA聚合反应时错误率较高且扩增片段的长度也有限[2]。随后,Koehavong

维普资讯 http://www.cqvip.com

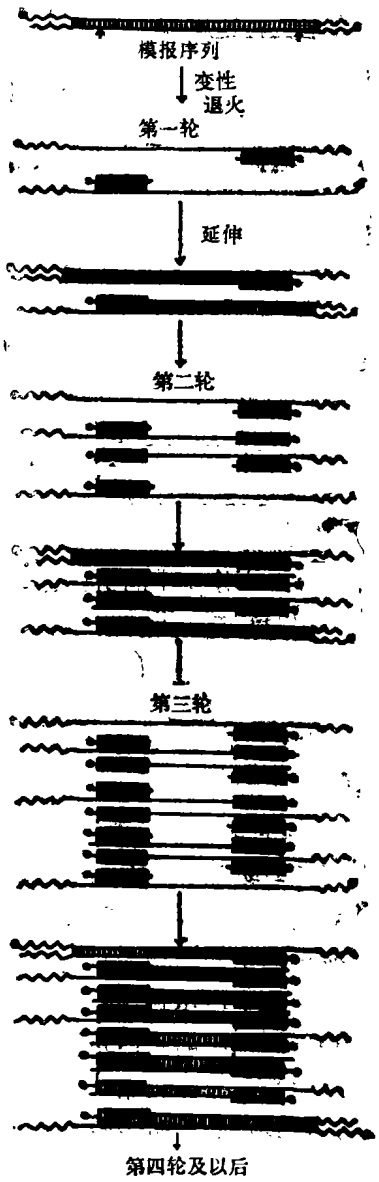


图1 聚合酶链反应。(图中小长方块表示引物) 产物按2^n积聚

等人[5]应用T4DNA聚合酶，尽管该酶催化DNA聚合时有较低的错误率，但该酶仍对热不稳定。Taq DNA聚合酶是从嗜高温性细菌Thermus aquaticus中提取出来[6]，可在较高温度时酶的活性仍不致完全丧失。其最适温度是70℃～75℃，从而使反应特异性大大提高[2]。此外，它还能合成较长的DNA片段[2,7]。自从自动的DNA扩增仪问世以来，PCR大多采用Taq DNA聚合酶。

早期的PCR方法用于扩增已知序列的DNA片段，而且所设计的引物与模板DNA完全匹配[1]。近年来，为了满足多种研究需要而对PCR方法进行修改。Sommer等人[8]的研究表明，在用Taq DNA聚合酶而引物长度为20～24bp时，引物3′端仅需少量的碱基与模板DNA完全配对就可成功地进行PCR扩增。随后发现，引物3′端单一碱基与模板的误配对也可成功扩增[9]。因此，在引物的5′端或引物内部人工引入某些特定序列如限制性内切酶的识别序列[10]，某种启动子序列[11]或者起始密码、终止密码以及其它序列[12,13]等，这些序列可能与模板不完全互补，但由于在模板引物退火时可允许有少量误配，原则上只要对引物退火到模板上的专一性不产生太大的影响，PCR仍能有效地扩增。在扩增之后，被引入的序列会出现在新合成的产物中，以便于随后的克隆，表达或作其它分析用。

二、在分子生物学中的应用

1. 核酸序列分析

核酸序列分析时，可先用PCR对含量极微的待测样品进行扩增，产生适量的模板拷贝。将PCR产物克隆到M_{13}载体中，以链终止法测序[10,14]；或用双链PCR产物直接测序[4,5]；也可用PCR技术扩增出单链DNA用链终止法测序[16,17]。

2. 定位诱变

定位诱变技术在分子生物学和生物化学中已广泛用于研究基因表达调控以及蛋白质结构与功能的关系。早期用于定位诱变的方法既费时且效率低。PCR方法的问世使定位诱变方法得到很大改进[18,19]。对于基因外边缘的诱变可在引物的5′端引入特定序列（见前）以达到定位诱变的目的，这也是应用最多的定位诱变方法。对于基因片段中间的诱变，Kadowaki等人[20]设计的四引物法通过

维普资讯 http://www.cqvip.com

引物突变点的掺入并用PCR扩增。这些定位诱变方法可使产物的突变率达99%以上，这是传统方法所不能比拟的。

3. 扩增外部未知序列 (genome walking)

PCR技术可用来扩增位于已知序列侧翼的未知DNA序列[21,22]即在基因组中从已知序列向未知序列游动。用一种或几种限制性内切酶酶解基因组DNA，将酶切片段连接到任一克隆载体上。用DNA的已知区域来设计特异引物，另一个引物是与载体DNA互补的合成寡核苷酸链，进行PCR扩增。尽管基因组DNA的各种酶解片段都可能与载体DNA连接且载体特异的引物也可与它们结合，但PCR扩增的特异性受特异引物的限制，仅仅特异片段能达到指数级扩增。它克服了传统的鸟枪克隆的烦杂工作，具有简便、快速和准确的特点。

4. 扩增cDNA序列

利用不同种属相同基因的同源性和已知某种种属的基因序列或蛋白质序列来扩增另一种属的相同基因片段[23,24]。该法首先将细胞总mRNA提取出来合成cDNA，根据不同种属相同基因的同源性，利用某一种属的已知基因的保守序列或蛋白质的氨基酸保守序列来设计特异引物，再利用mRNA的5′端或3′端的共同结构合成另一个非特异引物，可对特异基因的cDNA片段进行扩增，最后通过序列分析可得到目的基因片段的全序列。

5. 锚位PCR(Anchored PCR)

当仅知DNA某一端序列时，可用锚位PCR进行扩增[25,26]。该法利用已知序列端的DNA设计特异引物，在待扩增序列的另一端加入多聚G尾，根据加入的多聚G尾设计另一个非特异引物多聚C——锚引物(anchor primer)从而可对该段DNA序列进行PCR扩增。该技术对那些一端序列已知而另一端序列可变的基因研究特别有用。

6. 用于基因表达调控的研究

PCR用于基因表达调控的研究，除用定位诱变技术改变特定位置的核苷酸序列从而观察其表达情况外，Kinzer等人[27]将基因组DNA先用超声波处理或用内切酶MboII完全酶切后再用Klenow酶补齐产生平头末端的DNA片段，平均约200～300bp左右，然后与捕获接头(Catch Linker)连接，再用内切酶XhoI酶切。这种捕获接头是体外合成的20个碱基的寡核苷酸链。以上述DNA片段为模板，以捕获接头为引物进行PCR扩增。扩增后的产物通过加入一种特定的蛋白质或核酸与目的基因片段特异结合而将目的基因片段选择出来以研究基因表达的调控。

三、在临床医学中的应用

1. 疾病诊断

由于PCR方法的快速性和敏感性，使得许多因基因缺陷导致的疾病的诊断（包括产前诊断）成为可能，尤其是哪些用常规方法不可能诊断的疾病。近年来，PCR方法结合放射性标记的探针、非放射性探针以及固相化探针的应用[28,30]，使得诊断不仅快速、准确，而且操作过程大为简化。如镰刀形红细胞贫血[1]，β-地中海贫血[16]，苯丙酮酸尿症[28]，血友病A[31]，结构变异胰岛素所致的糖尿病[32]等。

2. 分析限制性内切酶片段长度多态性

限制性内切酶片段长度多态性是指某一DNA区域内由于基因缺失、插入、碱基突变等引起的限制性内切酶识别序列位点发生改变或消失从而使DNA的这一区域经限制性内切酶水解后产生的酶切片段长度的不一致。传统的研究方法是用一种或多种限制性

维普资讯 http://www.cqvip.com

内切酶消化，再作Southern转移，相应的探针杂交而观察片段的大小。不仅操作复杂、费时而且需要样品量多。应用PCR技术扩增含有限制性内切酶识别位点的特定DNA区域，利用PCR产物作限制性内切酶酶解分析，就可快速、准确地检测出该区域的限制性内切酶片段长度多态性[33,34]。

3. 病毒感染性疾病的诊断

传统的诊断病毒感染性疾病的方法是检测完整的病毒颗粒或用免疫学方法。它们费时长，灵敏度低。用PCR方法可使未形成病毒颗粒的单个DNA分子迅速扩增，有助于早期诊断。如人类免疫缺陷病毒[35,36]，人类嗜T淋巴细胞性白血病病毒[34]，人疱疹病毒[37]以及肝炎病毒[38]等。

4. 胎儿性别诊断

由于PCR技术可对单个细胞的DNA进行扩增。因此，它有可能在体外用来测定人胚胎受精卵在植入子宫内膜前的性别[39]。性别诊断的一般方法是利用PCR技术扩增Y染色体特异的149bp的DNA片段和Alu重复序列的300bp的DNA片段，PCR产物在琼脂糖电泳后观察，若出现149bp和300bp两条DNA带，说明受试者为男性；若只出现300bp的DNA带，说明受试者为女性[31]。该法与传统方法比较，不仅可早期作出诊断，而且方法简便。

5. 疾病发病机理的研究和肿瘤基因突变等的特异性检测

疾病发病机理的研究是临床医学研究的重要课题。许多疾病的发病机理目前仍未完全清楚如糖尿病，肿瘤等。PCR问世无疑为研究这些疾病的发病机理提供了一条途径[40,41]。如Cariello等人[40]应用PCR来研究自身免疫性疾病与人类主要组织相容性抗原(HLA)类型的关系。Horn等人[41]应用PCR对胰岛素依赖型糖尿病和非糖尿病个体的高度多态HLA类型Ⅱ位点的序列分析发现DQ_B位点的等位基因具有很高的可疑性(Susceptibility)。

此外，PCR还可用来对肿瘤基因突变的检测[42,43]有利于早期诊断。

四、法医学中的应用

由于PCR所需的模板量少，因而可对头发[44]，精细胞[45]的DNA以及有部份降解的DNA样品[46,47]进行扩增。这在法医学鉴定上特别有用。可根据罪犯在现场留下的极少量犯罪证据如几根头发，少量精液或血斑，应用PCR技术将样品扩增后也能作出鉴定。

五、考古学及生物进化研究中的应用

PCR技术对模板的完整要求不高，对部份降解的DNA样品也能成功扩增[46,47]，因而在考古学研究上也有应用价值。此外，在生物进化的研究上，已发现PCR具是特殊的应用价值[48,49]。

参考文献

[1] Saiki, R K, et al. Science 1985; 230:1350

[2] Saiki, R K. et al. Science 1988; 239:487

[3] Christan, O, et al. Biotechniques 1988; 6:162

[4] Mullis, K B, et al. Methods In Enzymol. 1987; 155:335

[5] Koehavong, P, et al. DNA 1988; 7:63

[6] Chien, A, et al. Bacterial 1976; 127:1550

[7] Jeffreys, A C, et al. Nucleic Acids Res. 1988; 16:10953

[8] Sommer, R, et al. Nucleic Acids Res. 1989; 17:6749

维普资讯 http://www.cqvip.com

[9] Wu, D Y, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:2759
[10] Scharf, S J, et al. Science 1986; 233:1076
[11] Stoflet, E S, et al. Science 1988; 239:491
[12] Higuchi, R, et al. Nucleic Acids Res. 1988; 16:7351
[13] Scheffield, V C, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:232
[14] Seino, S, et al. Diabetes 1990; 39:123
[15] Kretz, K A, et al. Nucleic Acads Res. 1989; 17:5864
[16] Innis, M A, et al. Proc. Acad. Sci. USA 1988; 85:9436
[17] Kadowaki, H, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87:658
[18] Valette, F, et al. Nucleic Acids Res. 1989; 17:723
[19] Hemsley, A, et al. Nucleic Acids Res. 1989; 17:6545
[20] Kadowaki, H, et al. Gene 1989; 76:161
[21] Ochman, H, et al. Genetics 1988; 120:621
[22] Shyamala, V, et al. Gene 1989; 84:1
[23] Cai, Q P, et al. Endorcrinology 1989; 3:2005
[24] Mack, D H, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:6977
[25] Frohman, M A, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:8998
[26] Loh, E Y, et al. Science 1989; 243:217
[27] Kinzler, K W, et al. Nucleic Acids Res. 1989; 17:3645
[28] Dilella, A G, et al. Lancet 1988; 1:497
[29] Saiki, R K, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:6230
[30] Saiki, R K, et al. N. Engl. J. Med. 1988; 319:537
[31] Kogan, S C, et al. N. Engl. J. Med. 1987; 317:985
[32] Migano, M, et al. Diabetes 1988; 37:862
[33] Boerwinkle, E, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:212
[34] Duggan, D, et al. Blood 1988; 71:1027
[35] Kwok, S, et al. J. Virol. 1987; 61:1690
[36] Ou, C, et al. J. Exp. Med. 1988; 239:295
[37] Shibata, D K, et al. J. Exp. Med. 1988; 167:225
[38] Kaneko, S et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86:312
[39] Handyside, A H, et al. Lancet 1989; 1:347
[40] Cariello, N F, et al. Hum. Genet. 1988; 42:726
[41] Horn, H, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:6012
[42] Janssen, J W G, et al. Nucleic Acids Res. 1987; 15:5669
[43] Lee, M S, et al. Science 1987; 237:175
[44] Higuchi, R, et al. Nature 1988; 382:543
[45] Li, H, et al. Nature 1988; 335:414
[46] Paabo, S, et al. J. Biol. Chem. 1989; 264:9709
[47] Bugawan, T, L, et al. Biotechnique 1988; 6:943
[48] Roth, M, et al. Science 1988; 241:1354
[49] Doetschman, T, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1988; 85:8583

(收稿日期1990-10-06)