

PCR 技术及其在医学上的应用

陈禹保 曾灵芳

(中科院北京科海医疗生物工程公司,100080)

自 50 年代 Waltson-Crick 提出 DNA 双螺旋假说,拉开了分子生物学的序幕。60 年代中心法则(DNA-mRNA-Protein)的提出,对生命本质有了较深层的认识;为进一步探索生物结构与功能的相关性,相继发明了 Southern Blotting Assay, Northern Blotting Assay 及 Western Blotting Assay,从 DNA, RNA 到蛋白进行全面分析;特别是 PCR 技术,给生物学及医学带来了一场革命,广泛应用于生命科学,医学,法医学及农业科学等许多领域。为此,PCR 技术于 1989 年获自然科学奖“年分子”的桂冠,PCR 技术发明人 Kary Mullis 等于 1993 年获诺贝尔化学奖。

1 PCR 原理

1.1 定义:PCR(Polymerase Chain Reaction)即多聚酶链式反应。是由一对特异性引物限制的,在热稳定 DNA 聚合酶的作用下,经变性,退火,延伸三个不同温度的循环处理,将极少量核酸模板高倍放大的一种体外核酸扩增技术。

1.2 技术原理:PCR 反应原理类似体内 DNA 复制,就是在体外合适条件下,以单链 DNA 为模板,以人工设计与合成的寡核苷酸为引物,利用耐热 DNA 聚合酶 5' → 3' 方向掺入单核苷酸来特异地扩增基因或 DNA 片段。整个过程由 20~40 个 PCR 循环组成,每个 PCR 循环由高温变性,低温复性和适温延伸三个步骤组成。高温时,DNA 变性,氢键打开,双链变成单链作为 DNA 扩增的模板;低温时,寡核苷酸引物与单链 DNA 模板特异地互补结合即复性;然后在适宜的温度下,DNA 聚合酶以单链 DNA 为模板,沿 5' → 3' 方向掺入核苷酸,使引物延伸合成模板的互补链,经过多个变性,复性,延伸的 PCR 循环,可使目的基因或 DNA 片段得到有效扩增。

1.3 反应体系的组成:PCR 反应系包括引物,dNTPs, Taq 酶,适当的缓冲液 Mg^{2+} 及核酸模

板。

① 引物:是决定 PCR 扩增特异性的关键因素,引物设计与合成的好坏直接决定 PCR 扩增的成败,因此在进行引物设计和合成应注意以下几个问题:

A. 引物应位于待分析基因组中的高度保守区域,长度以 15→30bp 为宜。

B. 引物内不能形成发夹结构。

C. GC 含量不能太高。

D. 引物间不能互补。

E. 引物内的每种碱基不能有太多的连续重复。

F. 引物间的 T_m 值尽可能接近。

引物退火温度的确定: $T_m = 2AT + 4GC$, 则退火温度以低的 T_m 为基点,在 $\pm 5^\circ\text{C}$ 范围内确定退火温度,每个 PCR 反应体系中的引物浓度一般为 20mol/L 。

② dNTPs:是 PCR 反应所必须的底物,为四种核苷酸的混合物,一般使用浓度为 0.2mol/L 。

③ Taq DNA 聚合酶:最早从温泉细菌中提出,热稳定性好,在 94°C 短时间内活性无多大影响,在 72°C 左右为最适反应温度,在 $100\mu\text{l}$ 反应体系中一般用 2 单位, Taq 酶用量的多少对 PCR 扩增效率及特异性有一定影响。

④ 适当的缓冲液:一般用 10 倍 PCR 缓冲液作贮存液,每种 Taq 酶都有相应的反应缓冲液,不应把不同厂家 Taq 酶与缓冲液交叉使用。

⑤ Mg^{2+} , Taq DNA 聚合酶对 Mg^{2+} 浓度非常敏感,是 Mg^{2+} 依赖性酶,由于 Mg^{2+} 可以与负离子或负离子团(如磷酸根)结合,而 PCR 反应体系中, DNA 模板,引物及 dNTPs 是磷酸根的主要来源,因此要获得最佳反应结果,要对 Mg^{2+} 进行浓度选择,一般为 $2\sim 5\text{mmol/L}$ 。

⑥ 核酸模板:PCR 反应以 DNA 模板进行的扩增反应, RNA 不能直接进行扩增,需经反转录后才能进行。PCR 反应对核酸模板质量要求不高,但必须 Taq 酶的抑制物。

2 PCR 操作

2.1 临床标本处理(模板制备):常见的临床标本有血,胸腹水,脑脊液,痰液,尿大便,分泌物,组织块,培养细胞,石蜡切片等。不同的标本来源,样品处理有一定的区别。同一样品,采用不同的处理方法,有时对检测结果有较大的差异。常见的方法有:

A. 经典的 DNA 及 RNA 提取法:操作步骤繁琐,易产生污染;但注意操作,结果的可靠性好。目前科研上常用此方法,在临床上不易为临床工作人员所接受。

B. 改良 DNA 或 RNA 提取法:操作较为简便,结果可靠。科海医疗生物工程公司首先推荐使用此方法。

C. 直接煮沸法:对标本加入裂解液后,于沸水中煮几分钟,离心后取上清即可用于 PCR 扩增。操作简便,易为临床工作者接受;但易造成假阴性,应引起重视。

D. DNA 及 RNA 的磁分离法:操作简便,结果可靠;但价格贵,不易推广。

2.2 PCR 反应:目前用于临床检测的 PCR 反应体系一般为 $25\mu\text{l}$ (见下):

5 μl 模板		dNTPs, Mg^{2+}
20 μl PCR mix		$10\times$ PCR buffer
1 单位 Taq 酶		Primer

将以上组分混匀,加石蜡油后于 PCR 扩增仪进行自动扩增。一般循环次数为 30~40,作用时间根据要求确定。

94 $^\circ\text{C}$ 预变性 → 55 $^\circ\text{C}$ 退火 → 72 $^\circ\text{C}$ 延伸
94 $^\circ\text{C}$ 变性

2.3 PCR 产物检测:目前常用的方法是直接凝胶电泳法。将扩增产物电泳后,经 EB 染色,于紫外灯下观察,这种方法足以满足临床检测需要。此外,可将杂交法结合起来,以提高特异性和灵敏度。

2.4 PCR 操作注意事项:因为 PCR 能够放大单链的 DNA,因此应注意反应混合物中其他微量 DNA 的污染,污染的 DNA 在某些条件下可能作为 PCR 模板而参与反应,造成非目的基因扩增,而出现假阳性的结果。因此在进

行 PCR 操作时应注意以下问题:

- ① 如果条件允许, PCR 操作应在装备紫外线灯的超净台上进行。
- ② 操作应戴一次性手套。
- ③ 吸头, 离心管一次性用于 PCR。
- ④ 注意样品间的交叉污染及扩增产物污染。
- ⑤ PCR 操作时, 应设阴性对照。

2.5 PCR 常见问题及分析

- ① 阳性模板扩增很好, 但样品无扩增产物
 - A. 样品确是阴性。
 - B. 样品处理不好, 内含 Taq 酶抑制物。
 - C. 变性温度不当。
 - D. 试剂盒的样品处理系统不好。
- ② 阳性模板及样品都无扩增产物的形成
 - A. 阳性模板降解, 样品确是阴性。
 - B. 阳性模板降解, 样品处理不好。
 - C. Taq 酶失活。
 - D. 试剂盒本身的质量问题。
- ③ 阳性模板扩增带较好, 但样品扩增带呈涂布状或几条带
 - A. 退火温度太低。
 - B. Mg^{2+} 太低。
 - C. 引物设计不当。
 - D. 引物, 模板及 Taq 酶比例不当。

3 PCR 衍生技术

自 PCR 技术于 1985 年面世后^[6], 在基因诊断中得到了广泛应用^[4], 并在原有基础上结合各种生化分子生物学技术, 衍生了许多改良技术, 目前有:

3.1 RT-PCR (Reverse Transcription-PCR): 在进行 PCR 反应以前先进行一次反转录。RT-PCR 技术用于研究特定基因的表达或 RNA 病毒的存在。

3.2 不对称 PCR (Asymmetric PCR): 可产生单链 DNA (ssDNA), 这种单链 DNA 产物可提供模板, 进行一系列研究如 DNA 序列分析等。

3.3 多重 PCR (Multiple Primer PCR): 以多个引物同时扩增不同原体或不同亚型基因等,

使检测经济和缩短检测时间。

3.4 PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism): 对 PCR 产物利用特定限制性内切酶消化, 确定内切酶谱。这样可以区别不同的病原体或基因亚型及碱基置换等。

3.5 PCR-SSCP (Single Strand Conformational Polymorphism): PCR 产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳后, 可分别出扩增产物的单链 DNA 带数或迁移率的改变, 以分析基因的多态性或碱基突变, 是目前应用最广的筛选 DNA 点突变的方法。

3.6 PCR-ASO (Allela Specific Oligonucleotides): 人工合成的针对等位基因的寡核苷酸探针与 PCR 产物杂交, 分析等位基因型或多态性。

3.7 RAPD-PCR (Random Amplified Polymorphic DNA)^[5]: 通过任意选择一个或二个引物, 对基因组 DNA 进行扩增。一般是先在不严格条件下, 进行 1~6 个循环的 PCR 扩增随后在严格条件下进行 PCR 扩增。扩增产物可经 1.5%~2% 琼脂糖电泳或在扩增的同时掺入 P32, 然后经 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 放射自显影得到 DNA 指纹图谱。

3.8 错配 PCR (mismatched PCR): 人为在引物导入错配碱基以建立酶切位点与碱基配对, 以检测基因是否有点突变。一般用于点突变非常确定的已知基因检测。

3.9 原位 PCR (in situ PCR)^[6]: 即在组织切片或培养细胞的载片上直接进行 PCR 扩增, 然后用原位杂交或直接检测, 有定位性。目前, 在国外用于 AIDS 病毒的感染及基因表达定位等, 但尚处于探索和完善阶段。

3.10 定量 PCR: 传统的 PCR 反应由于扩增效率的不尽一致, 所以一般认为不能直接对原样本 DNA 量进行估计, 但经过加入内参照或竞争物共扩增则可以对基因的表达量或基因的拷贝数进行定量分析。主要是竞争法和差异法, 北京地坛医院成功地用于 HBV 定量分析。

