

普通 PCR、原位 PCR、反向 PCR 和反转录 PCR 的基本原理和操作步骤

普通 PCR

1 概述

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction), 简称 PCR, 是一种分子生物学技术, 用于放大特定的 DNA 片段。可看作生物体外的特殊 DNA 复制。DNA 聚合酶 (DNA polymerase I) 最早于 1955 年发现, 而较具有实验价值及实用性的 Klenow fragment of E. Coli 则是于 70 年代的初期由 Dr. H. Klenow 所发现, 但由于此酶不耐高温, 高温能使之变性, 因此不符合使用高温变性的聚合酶链式反应。现今所使用的酶(简称 Taq polymerase), 则是于 1976 年从温泉中的细菌 (Thermus aquaticus) 分离出来的。它的特性就在于能耐高温, 是一个很理想的酶, 但它被广泛运用则于 80 年代之后。PCR 最初的原始雏形概念是类似基因修复复制, 它是于 1971 年由 Dr. Kjell Kleppe 提出。他发表了第一个单纯且短暂性基因复制 (类似 PCR 前两个周期反应) 的实验。而现今所发展出来的 PCR 则于 1983 由 Dr. Kary B. Mullis 发展出的, Dr. Mullis 当年服务于 PE 公司, 因此 PE 公司在 PCR 界有着特殊的地位。Dr. Mullis 并于 1985 年与 Saiki 等人正式发表了第一篇相关的论文。此后, PCR 的运用一日千里, 相关的论文发表质量可以说是令众多其它研究方法难望其项背。随后 PCR 技术在生物科研和临床应用中得以广泛应用, 成为分子生物学研究的最重要技术。Mullis 也因此获得了 1993 年诺贝尔化学奖。

2 PCR 原理

PCR 技术的基本原理类似于 DNA 的天然复制过程, 其特异性依赖于与靶序列两端互补的寡核苷酸引物。PCR 由变性--退火--延伸三个基本反应步骤构成: ①模板 DNA 的变性: 模板 DNA 经加热至 93°C 左右一定时间后, 使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离, 使之成为单链, 以便它与引物结合, 为下轮反应作准备; ②模板 DNA 与引物的退火(复性): 模板 DNA 经加热变性成单链后, 温度降至 55°C 左右, 引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合; ③引物的延伸: DNA 模板--引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下, 以 dNTP 为反应原料, 靶序列为模板, 按碱基互补配对与半保留复制原理, 合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链, 重复循环变性--退火--延伸三过程就可获得更多的“半保留复制链”, 而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需 2~4 分钟, 2~3 小时就能将待扩目的基因扩增放大几百万倍。

3 PCR 反应体系与反应条件

3.1 标准的 PCR 反应体系

10×扩增缓冲液	10μl
4 种 dNTP 混合物	200μl
引物	10 ~ 100μl
模板 DNA	0.1 ~ 2μg

Taq DNA 聚合酶	2.5 μ l
Mg ²⁺	1.5mmol/L
加双或三蒸水	100 μ l

3.2 PCR 反应五要素

参加 PCR 反应的物质主要有五种即引物(PCR 引物为 DNA 片段, 细胞内 DNA 复制的引物为一段 RNA 链)、酶、dNTP、模板和缓冲液 (其中需要 Mg²⁺)。[PCR 步骤]

标准的 PCR 过程分为三步:

- 1.DNA 变性 (90°C-96°C): 双链 DNA 模板在热作用下, 氢键断裂, 形成单链 DNA
- 2.退火 (25°C-65°C): 系统温度降低, 引物与 DNA 模板结合, 形成局部双链。
- 3.延伸 (70°C-75°C): 在 Taq 酶 (在 72°C左右, 活性最佳) 的作用下, 以 dNTP 为原料, 从引物的 5'端→3'端延伸, 合成与模板互补的 DNA 链。

每一循环经过变性、退火和延伸, DNA 含量即增加一倍。现在有些 PCR 因为扩增区很短, 即使 Taq 酶活性不是最佳也能在很短的时间内复制完成, 因此可以改为两步法, 即退火和延伸同时在 60°C-65°C间进行, 以减少一次升降温过程, 提高了反应速度。

4 PCR 反应特点

4.1 特异性强 PCR 反应的特异性决定因素为:

- ①引物与模板 DNA 特异正确的结合;
- ②碱基配对原则;
- ③Taq DNA 聚合酶合成反应的忠实性;
- ④靶基因的特异性与保守性。

其中引物与模板的正确结合是关键。引物与模板的结合及引物链的延伸是遵循碱基配对原则的。聚合酶合成反应的忠实性及 Taq DNA 聚合酶耐高温性, 使反应中模板与引物的结合(复性)可以在较高的温度下进行, 结合的特异性大大增加, 被扩增的靶基因片段也就能保持很高的正确度。再通过选择特异性和保守性高的靶基因区, 其特异性程度就更高。

4.2 灵敏度高

PCR 产物的生成量是以指数方式增加的, 能将皮克(pg=10⁻¹²)量级的起始待测模板扩增到微克(μ g=10⁻⁶)水平。能从 100 万个细胞中检出一个靶细胞; 在病毒的检测中, PCR 的灵敏度可达 3 个 RFU(空斑形成单位); 在细菌学中最小检出率为 3 个细菌。

4.3 简便、快速

PCR 反应用耐高温的 Taq DNA 聚合酶, 一次性地将反应液加好后, 即在 DNA 扩增液和水浴锅上进行变性-退火-延伸反应, 一般在 2~4 小时完成扩增反应。扩增产物一般用电泳分析, 不一定要用同位素, 无放射性污染、易推广。

4.4 对标本的纯度要求低

不需要分离病毒或细菌及培养细胞, DNA 粗制品及 RNA 均可作为扩增模板。可直接用临床标本如血液、体腔液、洗嗽液、毛发、细胞、活组织等 DNA 扩增检测。

5 PCR 常见问题

5.1 假阴性, 不出现扩增条带

PCR 反应的关键环节有①模板核酸的制备, ②引物的质量与特异性, ③酶的质量及, ④PCR 循环条件。寻找原因亦应针对上述环节进行分析研究。

模板: ①模板中含有杂蛋白质, ②模板中含有 Taq 酶抑制剂, ③模板中蛋白质没有消化除净, 特别是染色体中的组蛋白, ④在提取制备模板时丢失过多, 或吸入酚。⑤模板核酸变性不彻底。在酶和引物质量好时, 不出现扩增带, 极有可能是标本的消化处理, 模板核酸提取过程出了毛病, 因而要配制有效而稳定的消化处理液, 其程序亦应固定不宜随意更改。

酶失活: 需更换新酶, 或新旧两种酶同时使用, 以分析是否因酶的活性丧失或不够而导致假阴性。需注意的是有时忘加 Taq 酶或溴乙锭。

引物: 引物质量、引物的浓度、两条引物的浓度是否对称, 是 PCR 失败或扩增条带不理想、容易弥散的常见原因。有些批号的引物合成质量有问题, 两条引物一条浓度高, 一条浓度低, 造成低效率的不对称扩增, 对策为: ①选定一个好的引物合成单位。②引物的浓度不仅要看 OD 值, 更要注重引物原液做琼脂糖凝胶电泳, 一定要有引物条带出现, 而且两引物带的亮度应大体一致, 如一条引物有条带, 一条引物无条带, 此时做 PCR 有可能失败, 应和引物合成单位协商解决。如一条引物亮度高, 一条亮度低, 在稀释引物时要平衡其浓度。③引物应高浓度小量分装保存, 防止多次冻融或长期放冰箱冷藏部分, 导致引物变质降解失效。④引物设计不合理, 如引物长度不够, 引物之间形成二聚体等。

Mg²⁺浓度: Mg²⁺离子浓度对 PCR 扩增效率影响很大, 浓度过高可降低 PCR 扩增的特异性, 浓度过低则影响 PCR 扩增产量甚至使 PCR 扩增失败而不出扩增条带。

反应体积的改变: 通常进行 PCR 扩增采用的体积为 20ul、30ul、50ul。或 100ul, 应用多大体积进行 PCR 扩增, 是根据科研和临床检测不同目的而设定, 在做小体积如 20ul 后, 再做大体积时, 一定要摸索条件, 否则容易失败。

物理原因: 变性对 PCR 扩增来说相当重要, 如变性温度低, 变性时间短, 极有可能出现假阴性;退火温度过低, 可致非特异性扩增而降低特异性扩增效率退火温度过高影响引物与模板的结合而降低 PCR 扩增效率。有时还有必要用标准的温度计, 检测一下扩增仪或水浴锅内的变性、退火和延伸温度, 这也是 PCR 失败的原因之一。

靶序列变异: 如靶序列发生突变或缺失, 影响引物与模板特异性结合, 或因靶序列某段缺失使引物与模板失去互补序列, 其 PCR 扩增是不会成功的。

5.2 假阳性

出现的 PCR 扩增条带与目的靶序列条带一致, 有时其条带更整齐, 亮度更高。

引物设计不合适: 选择的扩增序列与非目的扩增序列有同源性, 因而在进行 PCR 扩增时, 扩增出的 PCR 产物为非目的性的序列。靶序列太短或引物太短, 容易出现假阳性。需重新设计引物。

靶序列或扩增产物的交叉污染: 这种污染有两种原因: 一是整个基因组或大片段的交叉污染, 导致假阳性。这种假阳性可用以下方法解决: 操作时应小心轻柔, 防止将靶序列吸入加样枪内或溅出离心管外。除酶及不能耐高温的物质外, 所有试剂或器材均应高压消毒。所用离心管及样进枪头等均应一次性使用。必要时, 在加标本前, 反应管和试剂用紫外线照射, 以破坏存在的核酸。二是空气中的小片段核酸污染, 这些小片段比靶序列短, 但有一定的同

源性。可互相拼接，与引物互补后，可扩增出 PCR 产物，而导致假阳性的产生，可用巢式 PCR 方法来减轻或消除。

5.3 出现非特异性扩增带

PCR 扩增后出现的条带与预计的大小不一致，或大或小，或者同时出现特异性扩增带与非特异性扩增带。非特异性条带的出现，其原因：一是引物与靶序列不完全互补、或引物聚合形成二聚体。二是 Mg^{2+} 离子浓度过高、退火温度过低，及 PCR 循环次数 过多有关。其次是酶的质和量，往往一些来源的酶易出现非特异条带而另一来源的酶 则不出现，酶量过多有时也会出现非特异性扩增。其对策有：必要时重新设计引 物。减低酶量或调换另一来源的酶。降低引物量，适当增加模板量，减少循环次 数。适当提高退火温度或采用二温度点法(93℃变性，65℃左右退火与延伸)。

5.4 出现片状拖带或涂抹带

PCR 扩增有时出现涂抹带或片状带或地毯样带。其原因往往由于酶量过多或酶的质量差，dNTP 浓度过高， Mg^{2+} 浓度过高，退火温度过低，循环次数过多引起。其对策有：减少酶量，或调换另一来源的酶。②减少 dNTP 的浓度。适当降低 Mg^{2+} 浓 度。增加模板量，减少循环次数。

原位 PCR

在科学研究中，每一项新技术的创立都会带来一系列新的研究成果问世，从而推动着各学科的发展。纵观形态研究领域，50 年代电子显微镜引入形态学观察领域，带来了从细胞水平到亚细胞水平的深入研究；60-70 年代，免疫组织化学与免疫细胞化学技术的广泛应用，又将观察的水平由亚细胞结构推向了蛋白质分子水平，使细胞内众多的活性物质得以进行细胞或亚细胞水平的定位，对医学生物学的发展无疑产生了深刻的影响。70 年代，分子生物学技术在形态学中的广泛应用，随着原位杂交技术的出现，使组织细胞内特定的 DNA 或 RNA 序列能够被定位，将蛋白质水平又提高到基因水平即核酸分子的观察和定位，从而使人类对许多生命现象在基因水平上的认识得以深化；80 年代，分子生物学领域中一项具有强大生命力的技术 PCR——多聚酶链反应技术问世了，很快地就被引入形态学观察的领域，使细胞内低拷贝或单拷贝的特定 DNA 或 RNA 得以进行定位及观察。这一技术的问世，必将带来更多的研究成果，使形态学的研究又向前迈出一大步。

1 基本原理

原位 PCR 技术的基本原理，就是将 PCR 技术的高效扩增与原位杂交的细胞定位结合起来，从而在组织细胞原位检测单拷贝或低拷贝的特定的 DNA 或 RNA 序列。

PCR 技术是在 DNA 聚合酶的作用下，经过模板的变性、退火和引物延伸三种循环，将引物引导下的特异性靶序列迅速地进行扩增，经过扩增的靶序列（一般能扩增 106 倍），很容易在凝胶电泳或 Southern 印记杂交中显示出来，因此，PCR 技术具有灵敏度高，特异性强的优势，随着热循环自动化的提高与稳定也使得 PCR 技术的操作简便易行。但是，PCR 技术是在液相中进行的，在扩增前，需将细胞破坏，从中提取核酸作为模板，因此很难将 PCR 的结果与组织细胞的形态结构联系起来，同时，也很难判断含特异性靶序列的细胞类型。

原位 PCR 技术成功地将 PCR 技术和原位杂交技术结合起来，保持了两项技术的优势又

弥补了各自的不足。原位 PCR 技术的待检标本一般先经化学固定，以保持组织细胞的良好形态结构。细胞膜和核膜均具有一定的通透性，当进行 PCR 扩增时，各种成分，如引物，DNA 聚合酶，核苷酸等均可进入细胞内或细胞核内，以固定在细胞内或细胞核内的 RNA 或 DNA 为模板，于原位进行扩增。扩增的产物一般分子较大，或互相交织，不易穿过细胞膜或在膜内外弥散，从而被保留在原位。这样原有的细胞内单拷贝或低拷贝的特定 DNA 或 RNA 序列在原位以呈指数极扩增，扩增的产物就很容易被原位杂交技术检查。

2 基本类型

根据在扩增反应中所用的三磷酸核苷原料或引物是否标记，原位 PCR 技术可分为直接法和间接法两大类，此外，还有反转录原位 PCR 技术等。

2.1 直接法原位 PCR 技术

直接法原位 PCR 技术是将扩增的产物直接携带标记分子，即使用标记的三磷酸腺苷或引物片断。当标本进行 PCR 扩增时，标记的分子就掺入到扩增的产物中，显示标记物，就能将特定的 DNA 或 RNA 在标本（原位）中显现出来。

常用的标记物有放射性同位素 ³⁵S，生物素和地高辛，用放射性自显影的方法或用亲和组织化学及免疫组织化学的方法去显示标记物所在位置。

直接法原位 PCR 技术的优点是操作简便，流程短，省时。缺点是特异性较差，易出现假阳性，扩增效率也较低，特别是在石蜡切片上，上述缺点更为突出。因为在制片过程中，无论是固定，脱水还是包埋，都会导致 DNA 的损害，而受损的 DNA 可利用反应体系中的标记三磷酸核苷进行修复，这样标记物就会掺入到 DNA 的非靶序列中，造成假阳性。若用标记引物的方法进行直接法原位 PCR，其扩增的效率比不标记更低。

2.2 间接法原位 PCR 技术

间接法原位 PCR 技术师现在细胞内进行特定 DNA 或 RNA 扩增，再用标记的探针进行原位杂交，明显提高了特异性，是目前应用最为广泛的原位 PCR 技术。

间接法原位 PCR 与直接法不同的是，反应体系与常规 PCR 相同，所用的引物或三磷酸腺苷均不带任何标记物。即实现先扩增的目的，然后用原位杂交技术去检测细胞内已扩增的特定的 DNA 产物，因此，实际上是将 PCR 技术和原位杂交技术结合起来的一种新技术，故又称之为 PCR 原位杂交(PCR in situ hybridization , PISH)。

间接法 PCR 技术的优点是特异性较高，扩增效率也较高。缺点是操作步骤较直接法繁琐。

2.3 原位反转录 PCR 技术

原位反转录 PCR(in situ reverse transcription PCR, In Situ RT-PCR)是将液相的 RT-PCR 技术应用到组织细胞标本中的一种新技术，与 RT-PCR（液相）不同点在于，进行原位反转录 PCR 反应之前，组织标本要先用 DNA 酶处理，以破坏组织中的 DNA 酶，这样才能保证扩增的模板是从 mRNA 反转录合成的 cDNA，而不是细胞中原有的 DNA。其它基本步骤与液相的 RT-PCR 相似。

3 基本步骤

原位 PCR 技术的基本步骤包括标本的制备。原位扩增（PCR）及原位检测等基本环节，现分述如下（重点以石蜡切片为例）。

3.1 标本的制备

原位 PCR 技术可应用于细胞悬液、细胞涂片、冰冻切片以及石蜡切片。相比较而言，以悬浮的完整细胞做原位 PCR 效果最好，石蜡切片效果最差。随着技术方面的一些问题被解决，近年也有从石蜡切片中得到满意的 PCR 效率的报道。效果不好的原因是多方面的，如：玻片上做 PCR，热传导较差，热对流不均匀，TaqDNA 酶被玻璃片吸附等，更为主要的原因，可能是标本经制片后，细胞缺乏完整的胞浆或核膜，扩增产物易发生弥漫而导致扩增的产物在原位不易保留。绝大多数的病理标本都是以福尔马林固定，石蜡包埋的形式保存的，若能很好地解决石蜡切片原位 PCR 的有关技术问题，意义显然是十分重大的。

组织细胞的固定 一般认为组织细胞以 10% 的缓冲福尔马林或 4% 的多聚甲醛固定后进行原位 PCR 效果较好。固定的时间一般不宜过长，视组织的大小，一般以 4℃ 4-6 小时为宜。

切片的厚度 一般而言，切片若厚一些，原位 PCR 的效果也较好一些，因为切片越厚，靶 DNA 的含量也就越多，同时膜结构也较多，防止扩增产物弥散的作用也越明显。但厚切片细胞重叠多，形态学观察的效果就差了，分辨率也将下降。

玻片的处理 为防止石蜡切片在 PCR 和原位杂交过程中脱落，在玻片应作防脱片处理，常用的方法是涂以多聚赖氨酸或用硅烷化处理，一般能防止组织脱落。

蛋白酶的消化作用 在进行原位扩增之前，组织标本需经蛋白酶处理。经蛋白酶消化的组织细胞，可增加其通透性，充分允许反应体系中的各成分进入细胞内，并能很好的暴露靶序列，以利于扩增。常用的蛋白酶有蛋白酶 K，胰蛋白酶或胃蛋白酶。蛋白酶消化的程度就要根据组织固定的程度进行调整。蛋白酶消化后，要注意加热以灭活酶的活性或通过充分的洗涤将酶完全去除，因为只要有少量的残留酶存在，都将对随后进行的 PCR 反应体系的数量 TaqDNA 酶产生毁灭性的影响。

蛋白酶消化处理组织细胞可提高通透性，有利于后续进行的各反应成分进入细胞内或核内，但同时也使得扩增产物的弥散机会增多，有可能带来假阳性或假阴性的结果。

原位扩增 (PCR)

原位扩增即在组织细胞标本上进行 PCR 反应，其基本原理与液相 PCR 完全相同。

引物 PCR 所用的引物一般为 15-30bp 为宜，扩增的片断为 100-1000bp 左右。原位 PCR 宜用较短的引物。从石蜡切片中提取的 DNA 很少超过 400bp，RNA 很少超过 200bp，较长序列的扩增易引起引物与模板的错配而导致非特异性反应的出现。

反应体系 原位 PCR 的反应体系与常规的液相 PCR 基本相同，由于是在经过固定的组织切片上进行，为获得较好的扩增效果，有人主张反应体系中的引物，TaqDNA 聚合酶以及 Mg^{2+} 的浓度均应高于液相的 PCR 反应体系。在反应体系中要加入牛血清白蛋白 (BSA)，以防止 TaqDNA 聚合酶与玻片的结合而降低了扩增效率。

热循环 原位 PCR 的热循环可在专门的热循环仪上进行，操作简便。也可在一般的 PCR 热循环仪上进行，通常在样品台上覆盖一层铝箔，制成平台，样品台上的空间用矿物油或水充填，将载玻片至于平台上，即可进行热循环的步骤。

为了保证进行充分的扩增，原位 PCR 热循环中每一步骤的时间可比常规 PCR 略长些，另外，也可采用热启动 (hot start) 的方法，即玻片加热到 80-94℃ 时，再立即加入 TaqDNA 聚合酶。

为了保证反应体系在热循环过程不过多丢失，可用清亮的指甲油，矿物油或 PAP 笔把盖片四周封闭起来。

洗涤 原位扩增结束后，标本应清洗，以除去弥散到细胞外的扩增产物。洗涤不充分，会导致扩增产物在检测时显现，造成背景过深或假阳性结果的出现。但是，洗涤过度，也会造成细胞内扩增的产物被洗脱，是阳性信号减弱或丢失。

有作者在扩增后用 4%多聚甲醛 2 小时或 2%戊二醛 5 分钟进行后固定，以使扩增的产物在检测时能很好地保留在细胞内，提高检测的敏感性和特异性。

原位检测 原位 PCR 的扩增产物检测方法，取决于原位 PCR 的设计方案，直接法则根据标记分子的性质对扩增产物直接进行原位检测。间接法则需用原位杂交的方法进行检测。

4 原位 PCR 技术的应用

原位 PCR 技术的突出优势，就是能在组织细胞原位检测出拷贝数较低的特异性基因序列。按照待测基因的性质，可将原位 PCR 的应用分为检测外源性基因和内源性基因两方面。

4.1 用于外源性基因的检测

4.1.1 病毒基因的检测

感染病毒的细胞常无较好的检测手段，但当原位 PCR 技术应用后，使这一极为困难的问题有望解决。

对 HIV、HPV、HSV、HBV、HCV 等多种病毒的检测，使我们能够成功观察到这些病毒在艾滋病、生殖系统肿瘤、肝炎及肝癌中的作用，能够及时发现受感染的人群。

4.1.2 细菌基因的检测

最突出的应用是在结核杆菌的检测上，当结核病变不够典型时，经过特殊染色的方法很难在镜下找到结核杆菌，而应用原位 PCR 技术可帮助明确诊断，当结核杆菌很少时仍能在镜下被很容易地找出来。

4.1.3 导入基因的检测

在转基因动物的研究中，是否导入了基因，在接受基因治疗的患者体内，是否接受了导入的基因，均可用原位 PCR 技术来证实。因此，原位 PCR 技术成为重要的检测手段。

4.2 用于内源性基因的检测

4.2.1 异常基因的检测

机体内基因的突变、重排、也可用原位 PCR 技术进行检测，原癌基因，抑癌基因的突变，恶性淋巴瘤免疫球蛋白重链基因的重排，对肿瘤的研究和诊断无一均提供了广阔的应用前景。

4.2.2 固有基因的检测

对于机体细胞内只有单个或几个拷贝的低表达固有基因，原位杂交技术因基因拷贝数太少而无能为力，液相 PCR 虽可进行扩增检测出来，但不能确定含有该基因的细胞类型，原位 PCR 技术则弥补了上述两种技术的不足，使得我们能够对人类各种基因进行检测，而完成人类基因图的绘制。

反向 PCR

反向 PCR(reverse PCR)是用反向的互补引物来扩增两引物以外的未知序列的片段,而常规 PCR 扩增的是已知序列的两引物之间 DNA 片段.实验时选择已知序列内部没有切点的限制性内切酶对该段 DNA 进行酶切,然后用连接酶使带有粘性末端的靶序列环化连接,再用一对反向的引物进行 PCR,其扩增产物将含有两引物外未知序列,从而对未知序进行分析研究.

反向 PCR 的目的在于扩增一段已知序列旁侧的 DNA,也就是说这一反应体系不是在一对引物之间而是在引物外侧合成 DNA.反向 PCR 可用于研究与已知 DNA 区段相连接的未知染色体序列,因此又可称为染色体缓移或染色体步移.这时选择的引物虽然与核心 DNA 区两末端序列互补,但两引物 3' 端是相互反向的.扩增前先用限制性内切酶酶切样品 DNA,然后用 DNA 连接酶连接成一个环状 DNA 分子,通过反向 PCR 扩增引物的上游片段和下游片段;现已制备了酵母人工染色体(YAC)大的线状 DNA 片段的杂交探针,这对于转座子插入序列的确定和基因库染色体上 DNA 片段序列的识别十分重要.

PCR 只能扩增两端序列已知的基因片段,反向 PCR 可扩增中间一段已知序列,而两端序列未知的基因片段不扩增.

反向 PCR 的目的在于扩增一段已知序列旁侧的 DNA,也就是说这一反应体系不是在一对引物之间而是在引物外侧合成 DNA.反向 PCR 可用于研究与已知 DNA 区段相连接的未知染色体序列,因此又可称为染色体缓移或染色体步移.这时选择的引物虽然与核心 DNA 区两末端序列互补,但两引物 3' 端是相互反向的.扩增前先用限制性内切酶酶切样品 DNA,然后用 DNA 连接酶连接成一个环状 DNA 分子,通过反向 PCR 扩增引物的上游片段和下游片段;现已制备了酵母人工染色体(YAC)大的线状 DNA 片段的杂交探针,这对于转座子插入序列的确定和基因库染色体上 DNA 片段序列的识别十分重要.

该方法的不足是:①需要从许多酶中选择限制酶,或者说必须选择一种合适的酶进行酶切才能得到合理大小的 DNA 片段.这种选择不能在非酶切位点切断靶 DNA.②大多数有核基因组含有大量中度和高度重复序列,而在 YAC 或 Cosmid 中的未知功能序列中有时也会有这些序列,这样,通过反向 PCR 得到的探针就有可能与多个基因序列杂交.

利用反向 PCR 可对未知序列扩增后进行分析,探索邻接已知 DNA 片段的序列,并可将仅知部分序列的全长 cDNA 进行分子克隆,建立全长的 DNA 探针.适用于基因游走、转位因子和已知序列 DNA 旁侧病毒整合位点分析等研究.

用传统的缓冲液和其他提供者推荐的条件裂解 DNA.反向 PCR 所扩增的片段的大小由 PCR 扩增片段的大小决定,目前,PCR 扩增的实际上限为 3-4kb.在许多情况下,首先需要进行 Southern 杂交来确定内切酶用以产生大小适于环化及反向 PCR 的片段的末端片段.能裂解核心区的内切酶使反向 PCR 只能扩增引物所定模板(依赖于引物)的上游或上游区,而不裂解核心区的酶则使两上边侧序列都扩增,并带有由内切酶和环化类型决定的接点(例如,互补突头连接与钝头连接).对于扩增左翼或右翼序列,初试时最好靠近识别上个碱基位位的酶,并已知在核心区有其方便的裂解位点.如果用反向 PCR 从含有大量不同的克隆片段的同一载体中探测杂交探针,建议事先在载体中引入合适的酶切位点.

用 T4 连接酶在稀 DNA 浓度下环化更容易形成单环.在一些实验中,为产生对反向 PCR 大小适当的 DNA 片段需要两种内切酶,但这样所产生的片段末端则不适于连接,

环化前需用 Klenow 或噬菌体 T4DNA 聚合酶修理(钝化)。连接前,需用酚或热变性使内切酶失活。

聚合酶链反应条件与经典所用的相同,例如,94°C-30 秒变性,58°C-30 秒引物退火,Taq 聚合酶 70°C 延伸 3 分钟,进行 30 个循环。可改变 PCR 条件以生产特异产物。将反向 PCR 用于测序时,与核心区末端后部结合的扩增引物更为有用,它使测序引物扩增部分的核心序列与未知边侧序列间的接点更近,减少了扩增引物的干扰。

描述一种大聚合酶链反应应用的方法,使在已知序列的核心区边侧的未知序列成几何级数扩增。用适当的限制性内切裂解含核心区的,以产生适合于扩增大小的片段,然后片段的末端再连接形成环状分子。的引物同源于环上核心区 的末端序列,但其方向性,使链的延长经过环上的未知区而不是分开引物的核心区。这种反向方法可用于扩增本来就在核心区旁边的序列,还可应用于制备未知序列 探针或测定边侧区域本身的上、下游序列。

逆转录 PCR

1 概念

RT-PCR 为反转录 PCR (reverse transcription PCR) 和实时 PCR (real time PCR) 共同的缩写。

逆转录 PCR, 或者称反转录 PCR(reverse transcription-PCR, RT-PCR), 是聚合酶链式反应(PCR)的一种广泛应用的变形。在 RT-PCR 中,一条 RNA 链被逆转录成为互补 DNA,再以此为模板通过 PCR 进行 DNA 扩增。

由一条 RNA 单链转录为互补 DNA(cDNA)称作“逆转录”,由依赖 RNA 的 DNA 聚合酶(逆转录酶)来完成。随后,DNA 的另一条链通过脱氧核苷酸引物和依赖 DNA 的 DNA 聚合酶完成,随每个循环倍增,即通常的 PCR。原先的 RNA 模板被 RNA 酶 H 降解,留下互补 DNA。

RT-PCR 的指数扩增是一种很灵敏的技术,可以检测很低拷贝数的 RNA。RT-PCR 广泛应用于遗传病的诊断,并且可以用于定量监测某种 RNA 的含量。(检测基因表达的方法,参见 Northern Blot 法。)

RT-PCR 有时候也会指代实时 PCR(real-time PCR)。为了与逆转录 PCR 相区别,通常被写作“定量 PCR”(quantitative PCR)或者 RTQ-PCR(real-time quantitative PCR)。

实时 PCR,属于定量 PCR (Q-PCR) 的一种,以一定时间内 DNA 的增幅量为基础进行 DNA 的定量分析。

real time PCR 的定量使用荧光色素,目前有二种方法。一种是在 ds DNA 中插入特异的荧光色素;另一种使用一种能与增幅 DNA 序列中特定寡核苷酸序列相结合的一种荧光探针 (probe)。

real time PCR 与 reverse transcription PCR 相结合,能用微量的 RNA 来找出特定时间、细胞、组织内的特别表达的遗传基因。这两种 RT PCR 的组合又被称之为“定量 RT-PCR (quantitative RT-PCR) ”

2 PCR 各步骤的目的

2.1 预变性:

破坏 DNA 中可能存在的较难破坏的二级结构。使 DNA 充分变性,减少 DNA 复杂结构对扩增的影响,以利于引物更好的和模板结合,特别是对于基因组来源的 DNA 模板,最好不要吝嗇这个步骤。此外,在一些使用热启动 Taq 酶的反应中,还可激活 Taq 酶,从而使 PCR 反应得以顺利进行。

2.2 变性--退火--延伸循环:

2.2.1 模板 DNA 的变性:模板 DNA 经加热至 93°C 左右一定时间后,使模板 DNA 双链或经 PCR 扩增形成的双链 DNA 解离,使之成为单链,以便它与引物结合,为下轮反应作准备;

2.2.2 模板 DNA 与引物的退火(复性):模板 DNA 经加热变性成单链后,温度降至 55°C 左右,引物与模板 DNA 单链的互补序列配对结合;

2.2.3 引物的延伸:DNA 模板--引物结合物在 TaqDNA 聚合酶的作用下,以 dNTP 为反应原料,靶序列为模板,按碱基配对与半保留复制原理,合成一条新的与模板 DNA 链互补的半保留复制链。

3 用 PCR 仪扩增时,(变性,退火,延伸)循环完成后,继续 72 度延伸了 10 分钟的原因:

3.1.延伸时间取决于待扩增 DNA 片段的长度。(当然是在反应体系一定的条件下)例如,使用 taqDNA 聚合酶,72 度时的碱基掺入率为 35-100bp/s,因此延伸速率为 1kb/min。

3.2.根据延伸速率推得,扩增 1kb 以内的 dna 片段 1min 即可,而 3-4kb 则需要 3-4min,依次照推。通常在最后一轮要适当的将延伸时间延长至 4-10min,这样做是使 pcr 反应完全以提高扩增产量。

3.3.继续 72 度延伸了 10 分钟除了可以使 pcr 反应完全以提高扩增产量外,还有一个作用是:在用普通 taq 酶进行 PCR 扩增时在产物末端加 A 尾的作用,可以直接用于 TA 克隆的进行。