

聚合酶链式反应 (PCR)

聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 是体外酶促合成特异 DNA 片段的一种方法, 为最常用的分子生物学技术之一。典型的 PCR 由 (1) 高温变性模板; (2) 引物与模板退火; (3) 引物沿模板延伸三步反应组成一个循环, 通过多次循环反应, 使目的 DNA 得以迅速扩增。其主要步骤是: 将待扩增的模板 DNA 置高温下 (通常为 93°C - 94°C) 使其变性感成单链; 人工合成的两个寡核苷酸引物在其合适的复性温度下分别与目的基因两侧的两条单链互补结合, 两个引物在模板上结合的位置决定了扩增片段的长短; 耐热的 DNA 聚合酶 (Taq 酶) 在 72°C 将单核苷酸从引物的 3' 端开始掺入, 以目的基因为模板从 5' → 3' 方向延伸, 合成 DNA 的新互补链。

PCR 能快速特异扩增任何已知目的基因或 DNA 片段, 并能轻易在皮克 (pg) 水平起始 DNA 混合物中的目的基因扩增达到纳克、微克、毫克级的特异性 DNA 片段。因此, PCR 技术一经问世就被迅速而广泛地用于分子生物学的各个领域。它不仅可用于基因的分离、克隆和核苷酸序列分析, 还可以用于突变体和重组体的构建, 基因表达调控的研究, 基因多态性的分析, 遗传病和传染病的诊断, 肿瘤机制的探索, 法医鉴定等诸多方面。通常, PCR 在分子克隆和 DNA 分析中有着以下多种用途:

- (1) 生成双链 DNA 中的特异序列作为探针;
- (2) 由少量 mRNA 生成 cDNA 文库;
- (3) 从 cDNA 中克隆某些基因;
- (4) 生成大量 DNA 以进行序列测定;
- (5) 突变体的分析;
- (6) 染色体步移;
- (7) RAPD、AFLP、RFLP 等 DNA 多态性分析等。

一、试剂准备

1. DNA 模版
2. 对应目的基因的特异引物
3. 10×PCR Buffer
4. 2mM dNTPmix: 含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2mM
5. Taq 酶

二、操作步骤

1. 在冰浴中, 按以下次序将各成分加入一无菌 0.5ml 离心管中。

10×PCR buffer	5 μ l
dNTP mix (2mM)	4 μ l
引物 1 (10pM)	2 μ l
引物 2 (10pM)	2 μ l
Taq 酶 (2U/ μ l)	1 μ l
DNA 模板 (50ng-1 μ g/ μ l)	1 μ l
加 ddH ₂ O 至	50 μ l

视 PCR 仪有无热盖, 不加或添加石蜡油。

2. 调整好反应程序。将上述混合液稍加离心, 立即置 PCR 仪上, 执行扩增。一般: 在 93℃ 预变性 3-5min, 进入循环扩增阶段: 93℃ 40s → 58℃ 30s → 72℃ 60s, 循环 30-35 次, 最后在 72℃ 保温 7min。
3. 结束反应, PCR 产物放置于 4℃ 待电泳检测或 -20℃ 长期保存。
4. PCR 的电泳检测: 如在反应管中加有石蜡油, 需用 100 μ l 氯仿进行抽提反应混合液, 以除去石蜡油; 否则, 直接取 5-10 μ l 电泳检测。

三、PCR 反应体系的组成与反应条件的优化

PCR 反应体系由反应缓冲液 (10×PCR Buffer)、脱氧核苷三磷酸底物 (dNTPmix)、耐热 DNA 聚合酶 (Taq 酶)、寡聚核苷酸引物 (Primer1, Primer2)、靶序列 (DNA 模板) 五部分组成。各个组份都能影响 PCR 结果的好坏。

1. 反应缓冲液: 一般随 Taq DNA 聚合酶供应。标准缓冲液含: 50mM KCl, 10mM Tris-HCl (pH8.3 室温), 1.5mM MgCl₂。Mg²⁺ 的浓度对反应的特异性及产量有着显著影响。浓度过高, 使反应特异性降低; 浓度过低, 使产物减少。在各种单核苷酸浓度为 200μM 时, Mg²⁺ 为 1.5mM 较合适。若样品中含 EDTA 或其它螯合物, 可适当增加 Mg²⁺ 的浓度。在高浓度 DNA 及 dNTP 条件下进行反应时, 也必须相应调节 Mg²⁺ 的浓度。据经验, 一般以 1.5-2mM (终浓度) 较好。

2. dNTP : 高浓度 dNTP 易产生错误掺入, 过高则可能不扩增; 但浓度过低, 将降低反应产物的产量。PCR 中常用终浓度为 50-400μM 的 dNTP。四种脱氧三磷酸核苷酸的浓度应相同, 如果其中任何一种的浓度明显不同于其它几种时 (偏高或偏低), 就会诱发聚合酶的错误掺入作用, 降低合成速度, 过早终止延伸反应。此外, dNTP 能与 Mg²⁺ 结合, 使游离的 Mg²⁺ 浓度降低。因此, dNTP 的浓度直接影响到反应中起重要作用的 Mg²⁺ 浓度。

3. Taq DNA 聚合酶: 在 100μl 反应体系中, 一般加入 2-4U 的酶量, 足以达到每 min 延伸 1000-4000 个核苷酸的掺入速度。酶量过多将导致产生非特异性产物。但是, 不同的公司或不同批次的产品常有很大的差异, 由于酶的浓度对 PCR 反应影响极大, 因此应当作预试验或使用厂家推荐的浓度。当降低反应体积时 (如 20μl 或 50μl), 一般酶的用量仍不小于 2U, 否则反应效率将降低。

4. 引物: 引物是决定 PCR 结果的关键, 引物设计在 PCR 反应中极为重要。要保证 PCR 反应能准确、特异、有效地对模板 DNA 进行扩增, 通常引物设计要遵循以下几条原则:

(1) 引物的长度以 15-30bp 为宜，一般 (G+C) 的含量在 45-55%， T_m 值高于 55℃
[$T_m=4(G+C)+2(A+T)$]。应尽量避免数个嘌呤或嘧啶的连续排列，碱基的分布应表现出是随机的。

(2) 引物的 3' 端不应与引物内部有互补，避免引物内部形成二级结构，两个引物在 3' 端不应出现同源性，以免形成引物二聚体。3' 端末位碱基在很大程度上影响着 Taq 酶的延伸效率。两条引物间配对碱基数少于 5 个，引物自身配对若形成茎环结构，茎的碱基对数不能超过 3 个由于影响引物设计的因素比较多，现常常利用计算机辅助设计。

(3) 人工合成的寡聚核苷酸引物需经 PAGE 或离子交换 HPLC 进行纯化。

(4) 引物浓度不宜偏高，浓度过高有两个弊端：一是容易形成引物二聚体 (primer-dimer)，二是当扩增微量靶序列并且起始材料又比较粗时，容易产生非特异性产物。一般说来，用低浓度引物不仅经济，而且反应特异性也较好。一般用 0.25-0.5pM/μl 较好。

(5) 引物一般用 TE 配制成较高浓度的母液 (约 100μM)，保存于 -20℃。使用前取出其中一部分用 ddH₂O 配制成 10μM 或 20μM 的工作液。

5. 模板：PCR 对模板的要求不高，单、双链 DNA 均可作为 PCR 的样品。虽然 PCR 可以用极微量的样品 (甚至是来自单一细胞的 DNA) 作为模板，但为了保证反应的特异性，一般还宜用 μg 水平的基因组 DNA 或 10⁴ 拷贝的待扩增片段作为起始材料。原材料可以是粗制品，某些材料甚至仅需用溶剂一步提取之后即可用于扩增，但混有任何蛋白酶、核酸酶、Taq DNA 聚合酶抑制剂以及能结合 DNA 的蛋白，将可能干扰 PCR 反应。

6. PCR 循环加快，即相对减少变性、复性、延伸的时间，可增加产物的特异性。

四、注意事项

1. PCR 反应应该在一个没有 DNA 污染的干净环境中进行。最好设立一个专用的 PCR 实验室。

2. 纯化模板所选用的方法对污染的风险有极大影响。一般而言, 只要能够得到可靠的结果, 纯化的方法越简单越好。

3. 所有试剂都应该没有核酸和核酸酶的污染。操作过程中均应戴手套。

4. PCR 试剂配制应使用最高质量的新鲜双蒸水, 采用 0.22 μ m 滤膜过滤除菌或高压灭菌。

5. 试剂都应该以大体积配制, 试验一下是否满意, 然后分装成仅够一次使用的量储存, 从而确保实验与实验之间的连续性。

6. 试剂或样品准备过程中都要使用一次性灭菌的塑料瓶和管子, 玻璃器皿应洗涤干净并高压灭菌。

7. PCR 的样品应在冰浴上化开, 并且要充分混匀。