

PCR技术

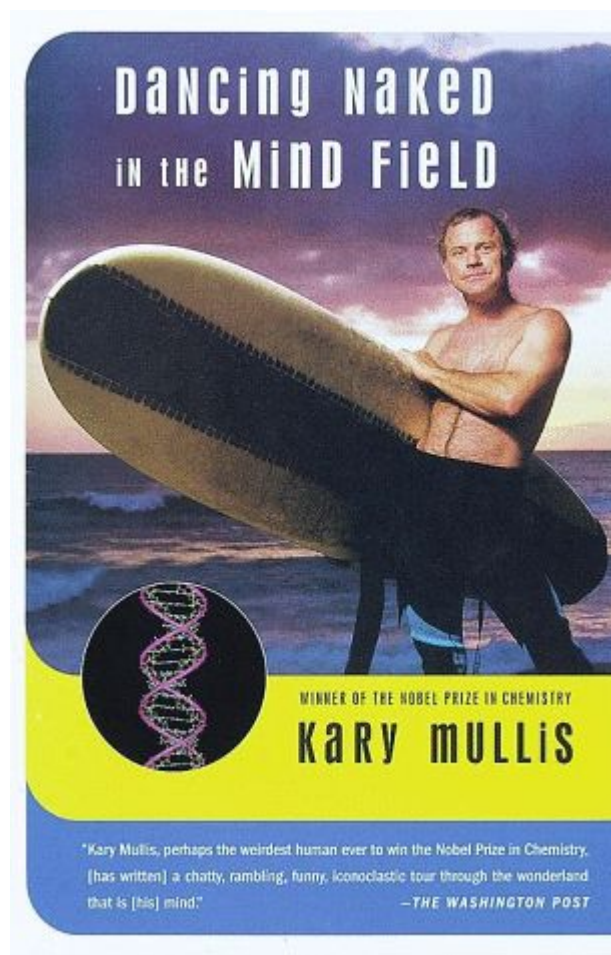
一、聚合酶链式反应（PCR）概述

（一）概念

聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaciton, PCR)，即PCR技术，是近年来发展起来的一种在体外快速扩增特定基因或DNA序列的方法。

(二) 发展历程

- 1971年 Kje11 Kleppe提出PCR原始雏形概念
- 1983年 Kary Mullis发明PCR技术
- 1987年 获得专利
- 1993年 诺贝尔化学奖



PCR的基本原理

- 试管中进行的DNA复制反应，依据
 - ①DNA半保留复制的机理；
 - ②体外DNA分子于不同温度下可**变性**和**复性**的性质；
- 通过人为控制体外合成系统的温度，使
 - ①**双链DNA变成单链**，
 - ②**单链DNA与人工合成的引物退火**，
 - ③**DNA聚合酶使引物沿着单链模板延伸为双链DNA。**

PCR反应的步骤

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：

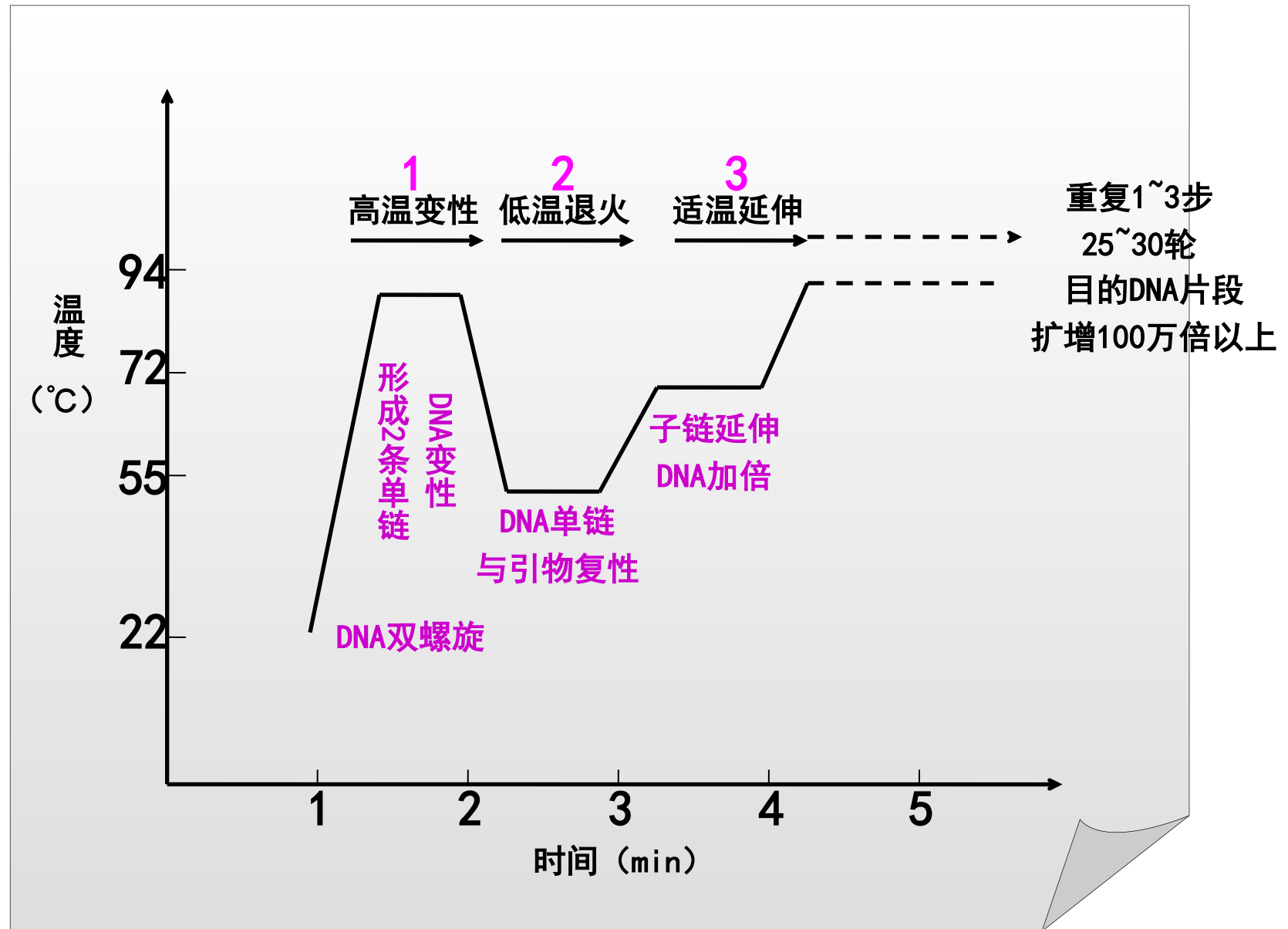
1、**模板DNA的变性**：模板DNA经加热至93℃左右一定时间后，使模板DNA双链或经PCR扩增形成的双链DNA解离，使之成为单链，以便它与引物结合，为下轮反应作准备；

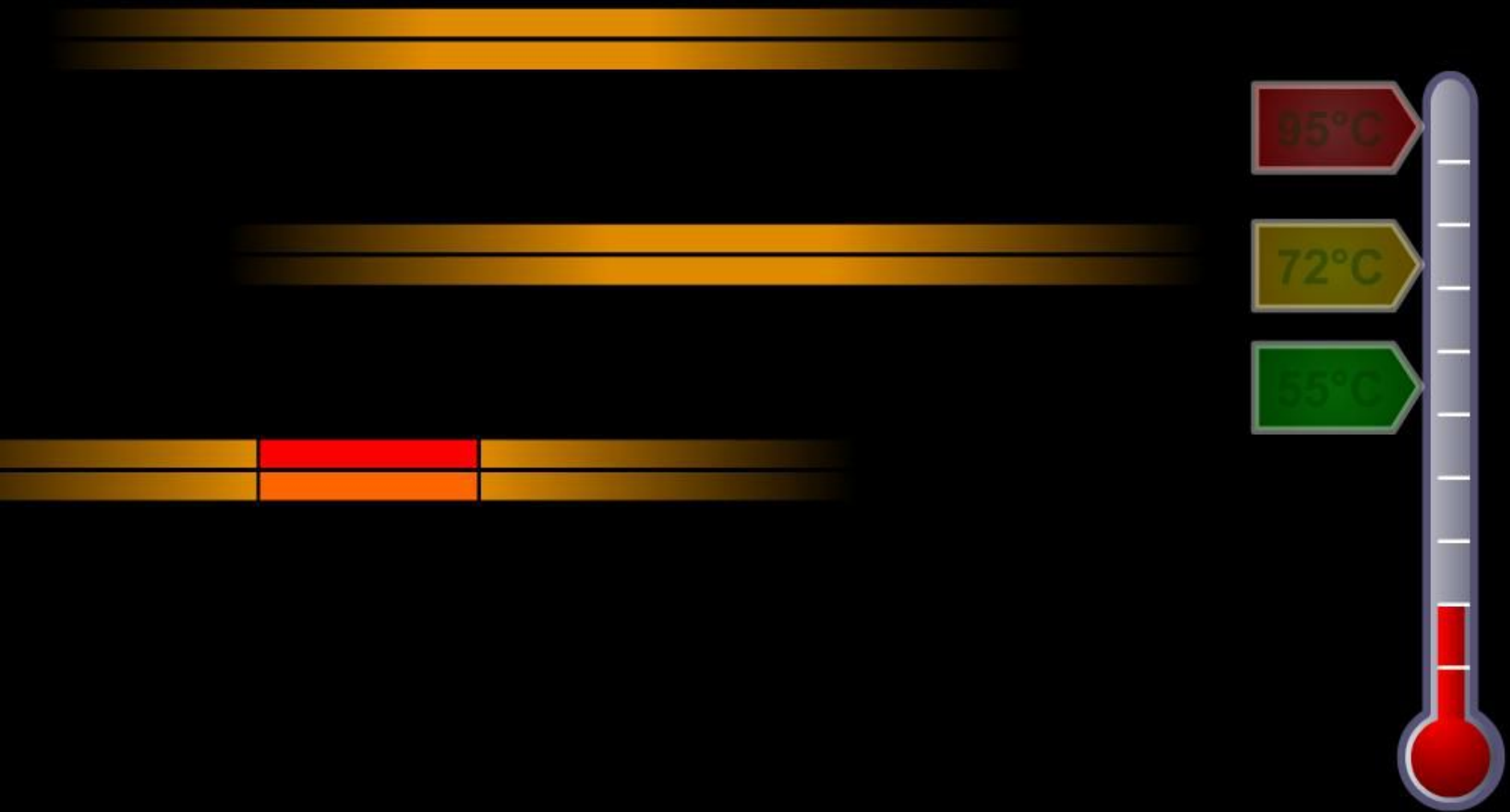
2、**模板DNA与引物的退火(复性)**：模板DNA经加热变性成单链后，温度降至55℃左右，引物与模板DNA单链的互补序列配对结合；

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。

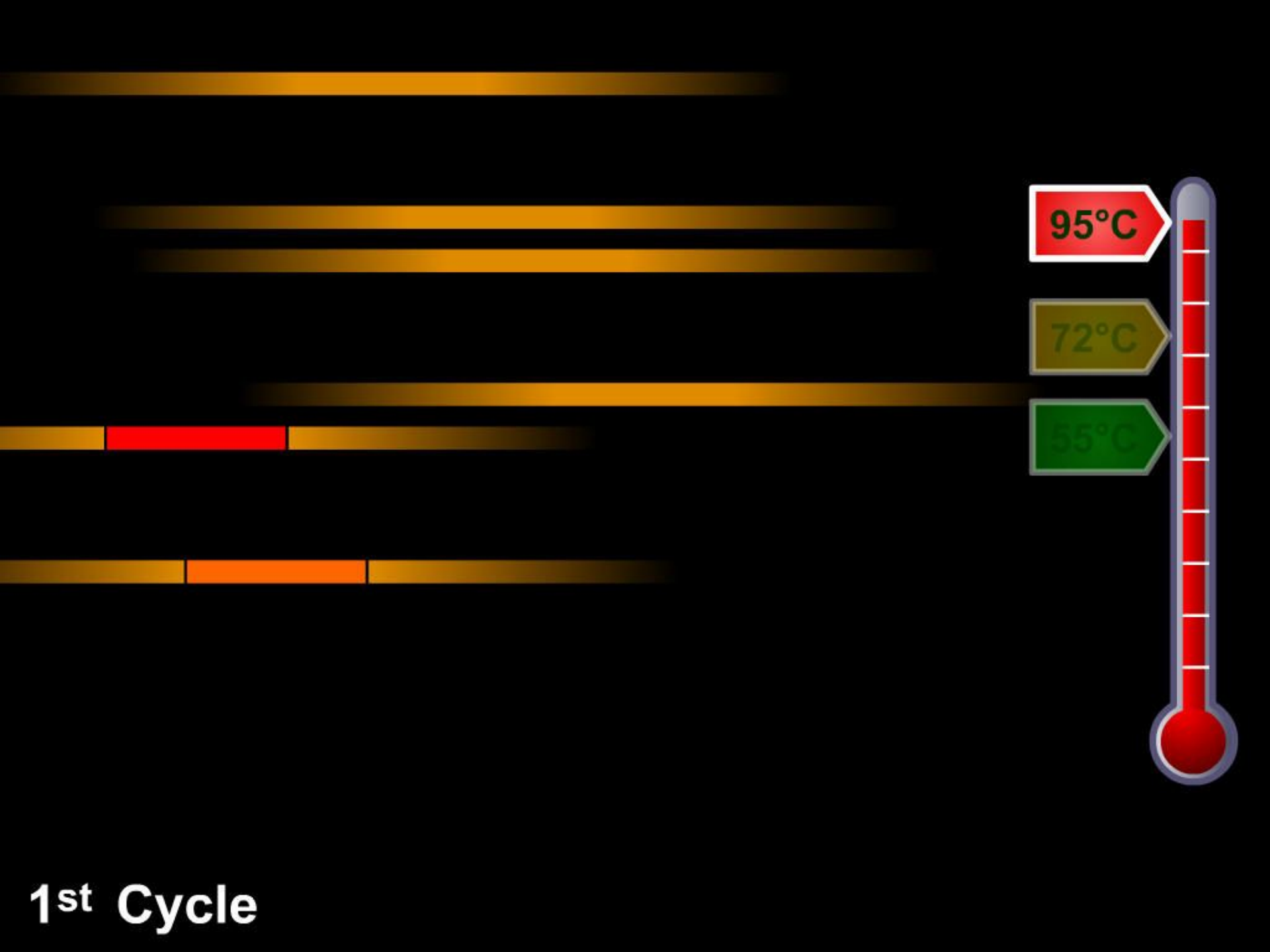
重复循环变性—退火—延伸三过程，就可获得更多的“半保留复制链”，而且这种新链又可成为下次循环的模板。每完成一个循环需2~4分钟，2~3小时就能将待扩目的片段富集 $10^6 \sim 10^9$ 倍。所需循环次数取决于样品中模板的拷贝。

PCR的基本步骤

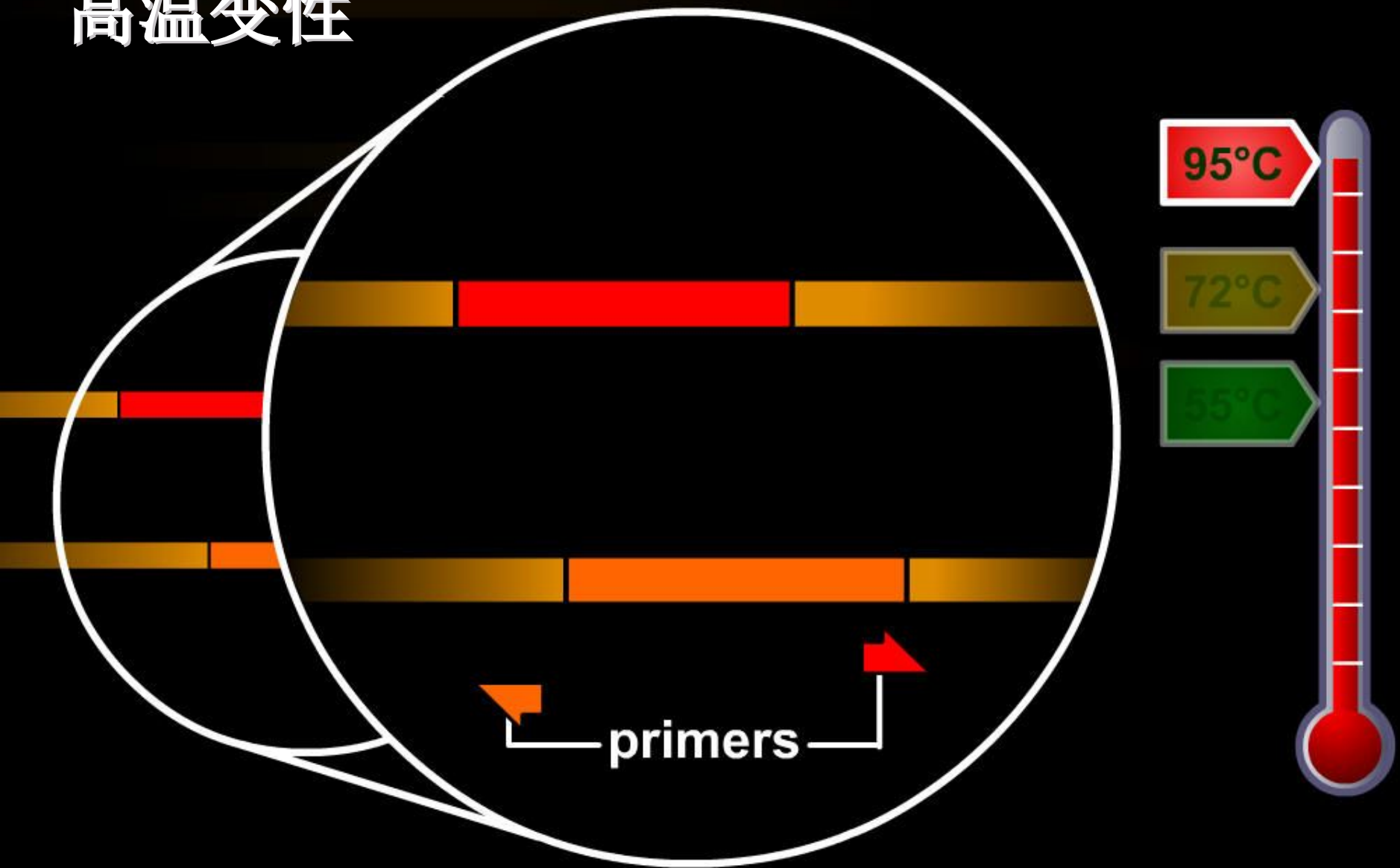




1st Cycle

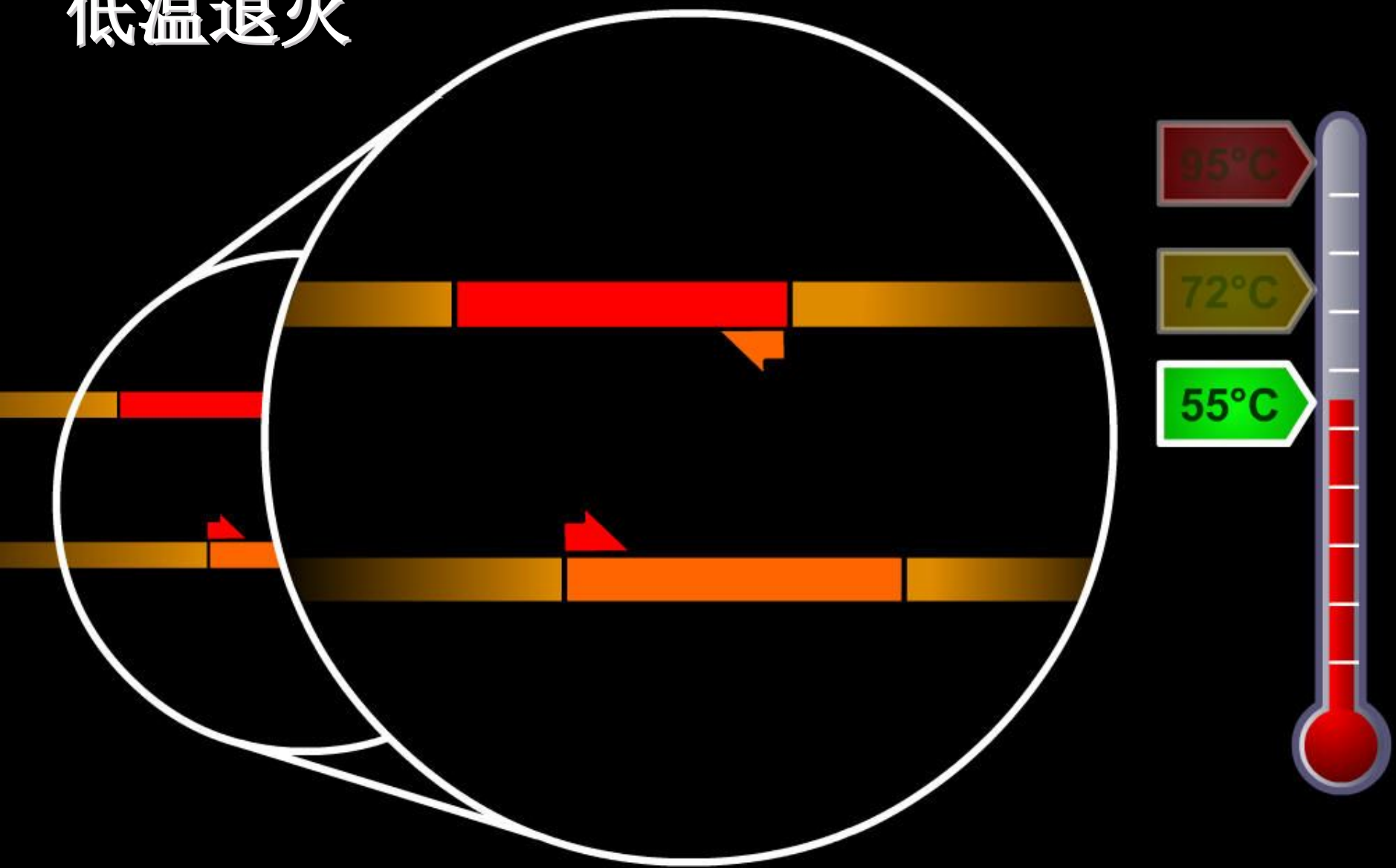


高温变性



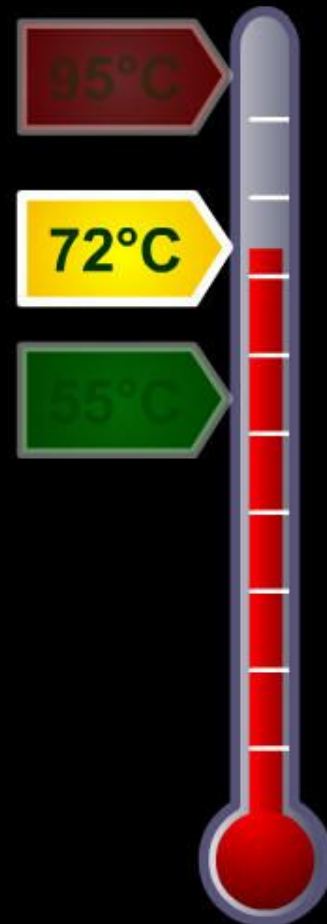
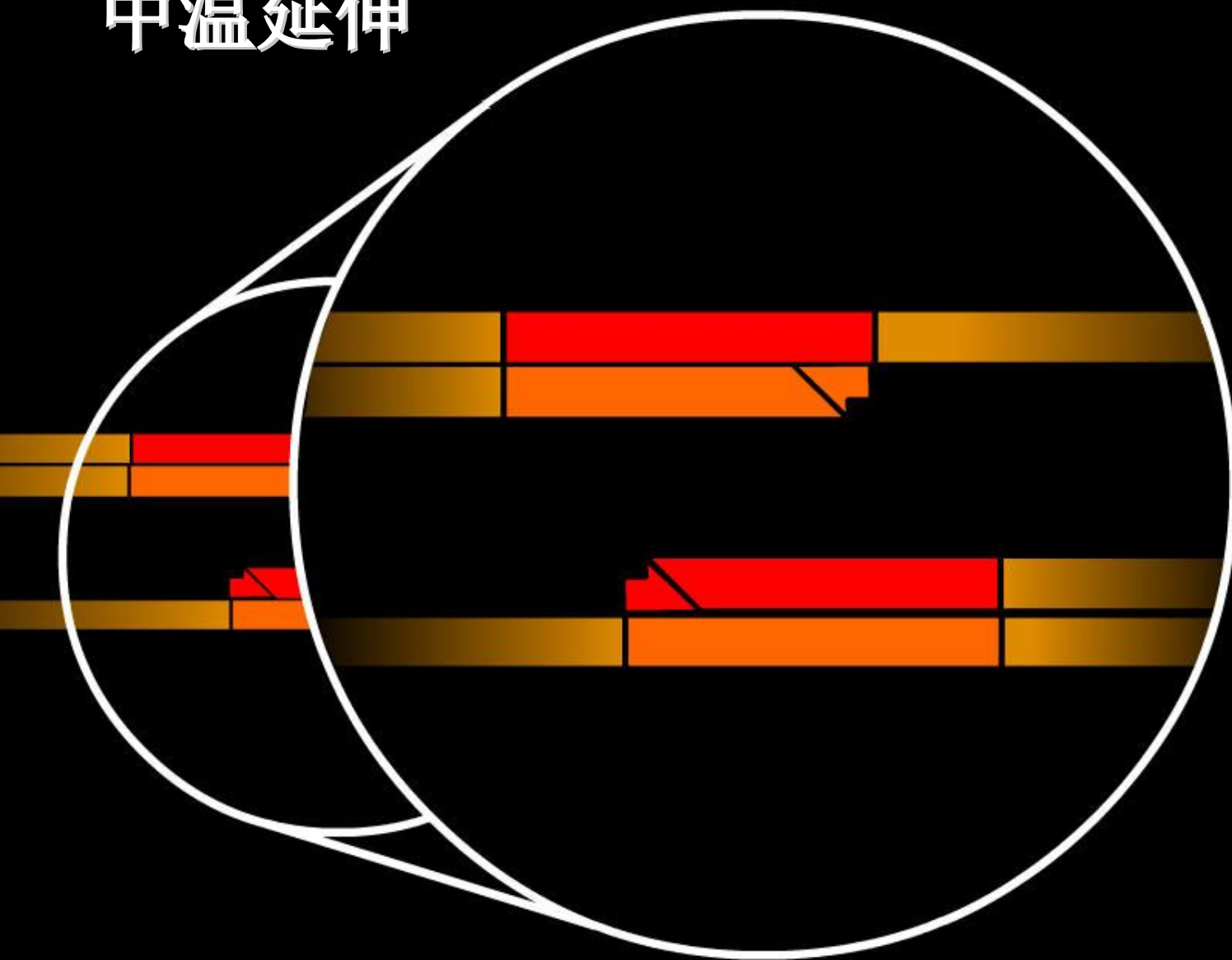
1st Cycle

低温退火

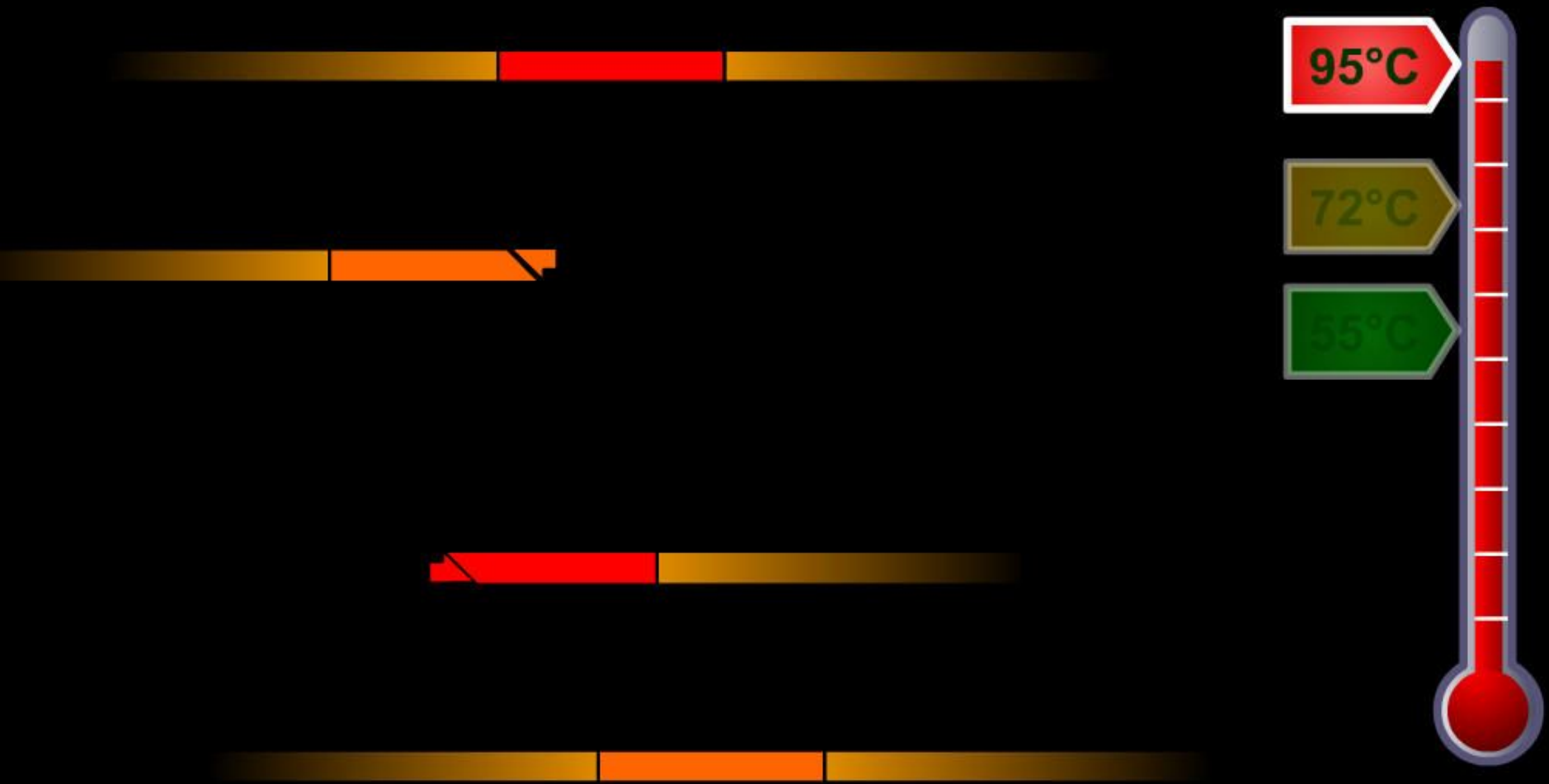


1st Cycle

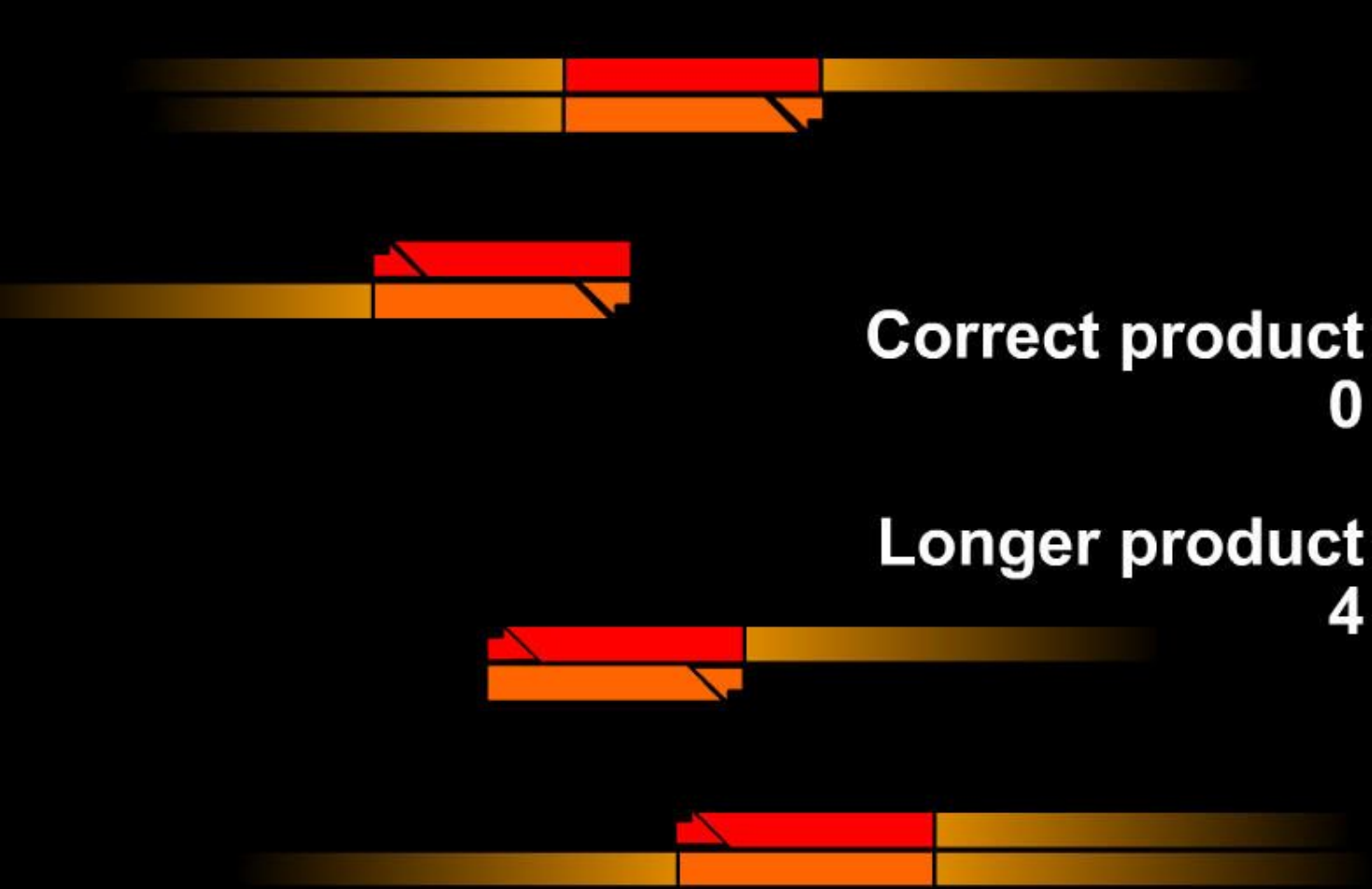
中温延伸



1st Cycle

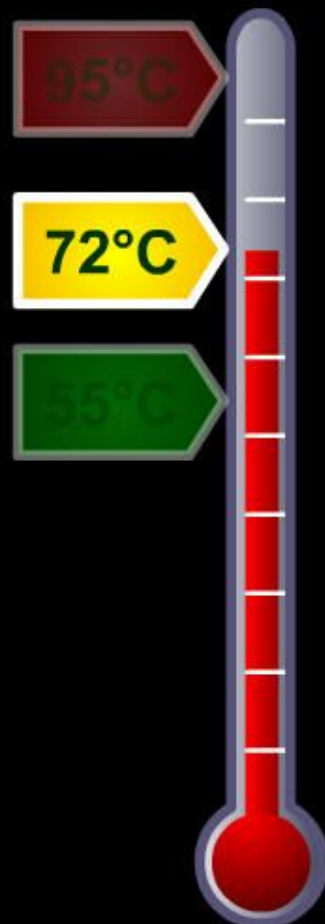


2nd Cycle

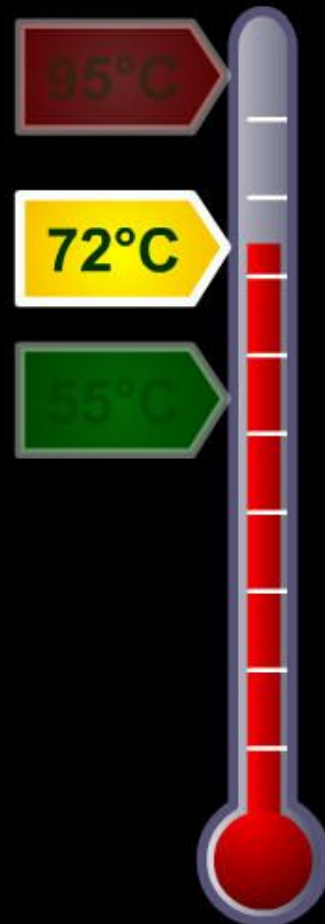
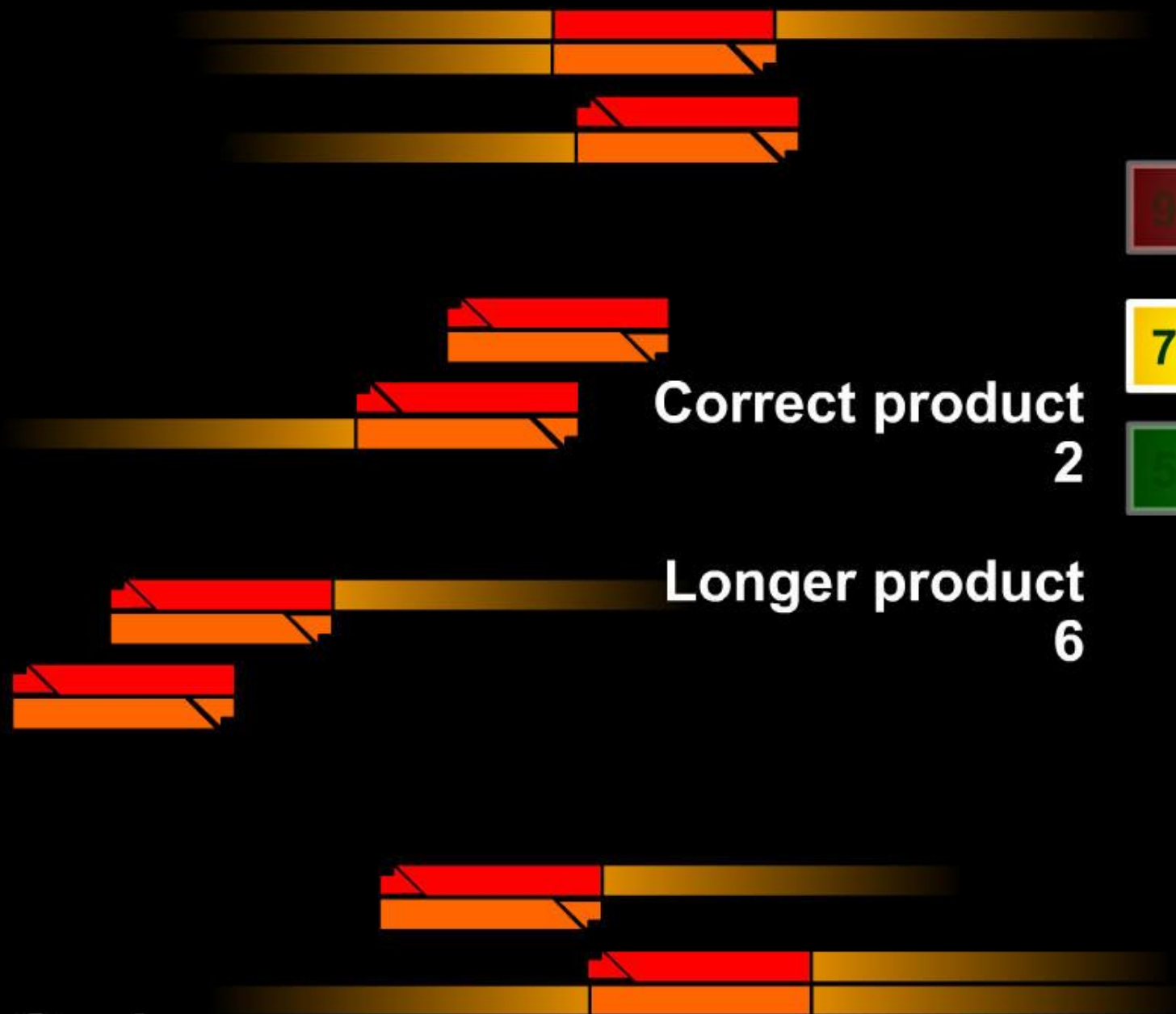


Correct product
0

Longer product
4

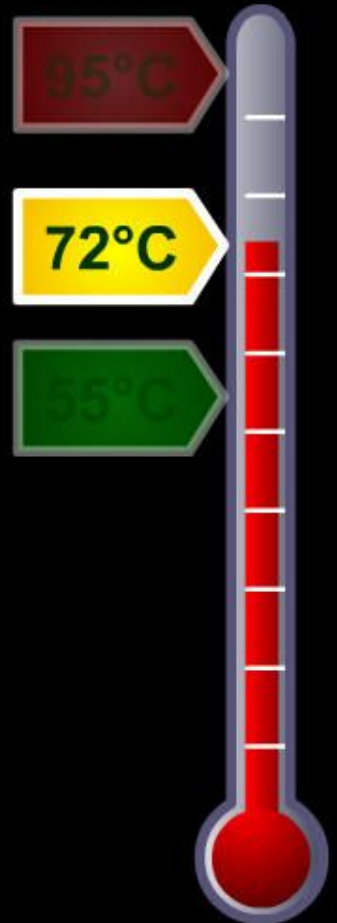


3rd Cycle





4th Cycle





1



4



22



4

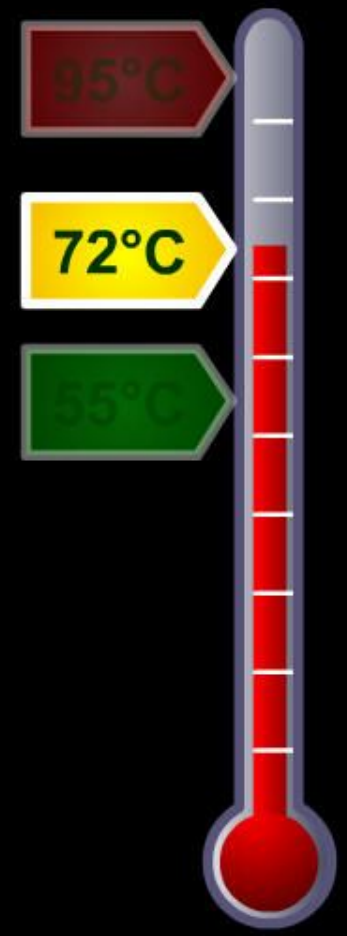


1

5th Cycle

Correct product
22

Longer product
10





1



6



114



6



1

7th Cycle



1



10



2026



10



1

11th Cycle



1



24



33

55

43

82



24



1

25th Cycle



1



29



1073741744



29



1

30th Cycle

三、PCR的反应动力学

$$Y = Y_0 * (1+X)^n$$

Y: 扩增拷贝数量
Y₀: 起始模板数量
X: 扩增效率
n: 扩增循环数

PCR 理论方程

PCR的三个反应步骤反复进行，使DNA扩增量呈指数上升。**平均扩增效率**的理论值为100%，但在实际反应中平均效率达不到理论值。反应初期，靶序列DNA片段的增加呈指数形式，随着PCR产物的逐渐积累，被扩增的DNA片段不再呈指数增加，而进入线性增长期或静止期，即出现“**停滞效应**”，这种效应称**平台期**。

四、PCR反应体系的主要成分和作用

- DNA聚合酶
- 模板
- 引物
- dNTP
- 缓冲体系

（一）DNA聚合酶

Taq DNA聚合酶来源于嗜热水生菌的重组体，与一般的聚合酶所不同的是在高温状态仍具有活性。

可分为两大类：

1、具有校正功能的（有3'→5'核酸酶活性）

比如：Vent, pfu, pwo等

2、不具有校正功能的（无3'→5'核酸酶活性）

比如：一般的Taq DNA聚合酶

（二）模板

核酸模板的量与纯化程度，是PCR成败与否的关键环节之一，传统的DNA纯化方法通常采用SDS和蛋白酶K来消化处理标本。一般临床检测标本，可采用快速简便的方法溶解细胞，裂解病原体，消化除去染色体的蛋白质使靶基因游离，直接用于PCR扩增。RNA模板提取一般采用异硫氰酸胍或蛋白酶K法，要防止RNase降解RNA。

（三）引物

引物是PCR特异性反应的关键，PCR产物的特异性取决于引物与模板DNA互补的程度。理论上，只要知道任何一段模板DNA序列，就能按其设计互补的寡核苷酸链做引物，利用PCR就可将模板DNA在体外大量扩增。

设计引物应遵循以下原则：

- 1、引物长度一般15-30个bp，常用为20bp左右。引物过短过长都会使特异性降低。
- 2、引物扩增跨度以200-500bp为宜，特定条件下可扩增长至10kb的片段。
- 3、引物碱基G+C含量以40-60%为宜，G+C太少扩增效果不佳，G+C过多易出现非特异条带。碱基随机分布，避免5个以上的相同核苷酸的成串排列。
- 4、避免引物内部出现二级结构，避免两条引物间互补，特别是3'端的互补，否则会形成引物二聚体，产生非特异的扩增条带。

- 5、引物3'端的碱基，特别是最末及倒数第二个碱基，应**严格要求配对**，以避免因末端碱基不配对而导致PCR失败。
- 6、引物中有或能加上**合适的酶切位点**，被扩增的靶序列最好有适宜的酶切位点，这对酶切分析或分子克隆很有好处。
- 7、引物应与核酸序列数据库的其它序列**无明显同源性**。**引物量**以最低引物量产生所需要的结果为好，引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增，且可增加引物之间形成二聚体的机会。

（四）dNTP的质量与浓度

dNTP的质量与浓度和PCR扩增效率有密切关系。在PCR反应中，dNTP应为50~200 $\mu\text{mol/L}$ ，尤其是注意4种dNTP的浓度要相等(等摩尔配制)，如其中任何一种浓度不同于其它几种时(偏高或偏低)，就会引起错配。浓度过低又会降低PCR产物的产量。

（五）PCR反应缓冲液

组成：50mM KCl

10mM Tris.Cl (pH 8.4)

1.5mM MgCl₂

Mg²⁺是Taq酶活性所必需的金属离子。dNTP能与Mg²⁺结合，使游离的Mg²⁺浓度降低。Mg²⁺浓度过高，反应特异性降低，出现非特异扩增，浓度过低会降低Taq DNA聚合酶的活性，使反应产物减少。

（六）PCR反应标准体系

反应物质	所用体积
两种引物（各）	2 μL
10 $\times$ PCR 缓冲液	10 μL
dNTPs	5 μL
模板	1 μL
Taq 酶	0.5 μL
去离子水	补至 100 μL

五、PCR的反应条件控制

(一) PCR反应的温度和时间控制

1、变性温度与时间

变性温度低，解链不完全是导致PCR失败的最主要原因。一般情况下， $93^{\circ}\text{C} \sim 94^{\circ}\text{C}$ 1min足以使模板DNA变性，若低于 93°C 则需延长时间，但温度不能过高，因为高温环境对酶的活性有影响。此步若不能使靶基因模板或PCR产物完全变性，就会导致PCR失败。

2、退火(复性)温度与时间

退火温度与时间，取决于引物的长度、碱基组成及其浓度，还有靶基序列的长度。引物的复性温度可通过以下公式帮助选择合适的温度：

$$T_m \text{值(解链温度)} = 4(G+C) + 2(A+T)$$

$$\text{复性温度} = T_m \text{值} - (5 \sim 10^{\circ}\text{C})$$

在 T_m 值允许范围内，选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合，提高PCR反应的特异性。复性时间一般为30~60sec，足以使引物与模板之间完全结合。

3、延伸温度与时间：

PCR反应的延伸温度一般选择在70~75℃之间，常用温度为72℃，过高的延伸温度不利于引物和模板的结合。

PCR延伸反应的时间，可根据待扩增片段的长度而定，一般1Kb以内的DNA片段，延伸时间1min是足够的。3~4kb的靶序列需3~4min；扩增10Kb需延伸至15min。延伸时间过长会导致非特异性扩增带的出现。对低浓度模板的扩增，延伸时间要稍长些。

（二） PCR反应的循环次数控制

循环次数决定PCR扩增程度。PCR循环次数主要取决于模板DNA的浓度。一般的循环次数选在30~40次之间，循环次数越多，非特异性产物的量亦随之增多。

六、PCR反应的特点

1、特异性强

PCR反应的特异性决定因素为引物与模板DNA特异正确的结合、碱基配对原则、TqDNA聚合酶合成反应的正确度、靶基因的特异性与保守性。

2、灵敏度高

PCR产物的生成量是以指数方式增加的。

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2~4h完成扩增反应。

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粗制品及总DNA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、活组织等粗制的DNA扩增检测。

七、防止**PCR**错误扩增的措施

- 1、隔离操作、戴不受污染的手套
- 2、试剂的配制、分装和保存
- 3、开盖前先离心，小心开盖和上盖。
- 4、加样时最后加模板DNA
- 5、设立对照实验
- 6、注意其他操作过程中可能造成的污染

八、PCR常见问题及解决办法

（一）扩增不出特异性带

1、原因

- （1）引物设计有问题（引物位置错误，引物之间太强的相互作用）
- （2）反应体系有问题
- （3）退火温度太高

2、解决办法

- （1）确认引物正确性
- （2）用保证能扩增出来的引物验证反应体系
- （3）采用梯度PCR功能，寻找最适合的退火温度

（二）扩增带很弱

1、原因

- （1）反应体系效率低
- （2）退火温度太高
- （3）很多非特异性扩增
- （4）大量引物二聚物的形成

2、解决办法

- （1）用已确认的引物验证
- （2）采用梯度PCR功能寻最适的退火温度
- （3）采用定量PCR的熔点曲线功能分析，提高退火温度，改变反应体系的PH值

（三）非特异性扩增带很多

1、原因

- （1）退火温度太低
- （2）反应体系有问题

2、解决办法

- （1）采用梯度PCR功能寻找最佳反应温度
- （2）更换反应体系

（四）引物二聚物太多

1、原因

- （1）引物设计有问题
- （2）反应体系有问题
- （3）退火温度太低

2、解决办法

- （1）重新设计引物
- （2）调整和更换反应体系
- （3）用梯度PCR寻找最佳的退火温度

（五）结果的重现性差

1、原因

反应体系发生了变化

2、解决办法

用荧光定量PCR仪熔点曲线功能分析PCR的结果，
看非特异性产物和引物二聚物

九、常规PCR技术及几类PCR新技术

温度梯度PCR

热启动PCR

Touch-down PCR

RT-PCR

荧光定量PCR

兼并引物PCR

免疫-PCR (immuno-PCR)

MSP甲基化特异 PCR

不对称PCR

原位PCR

连接酶链反应

RACE-PCR

AFLP

巢氏PC

反向PCR

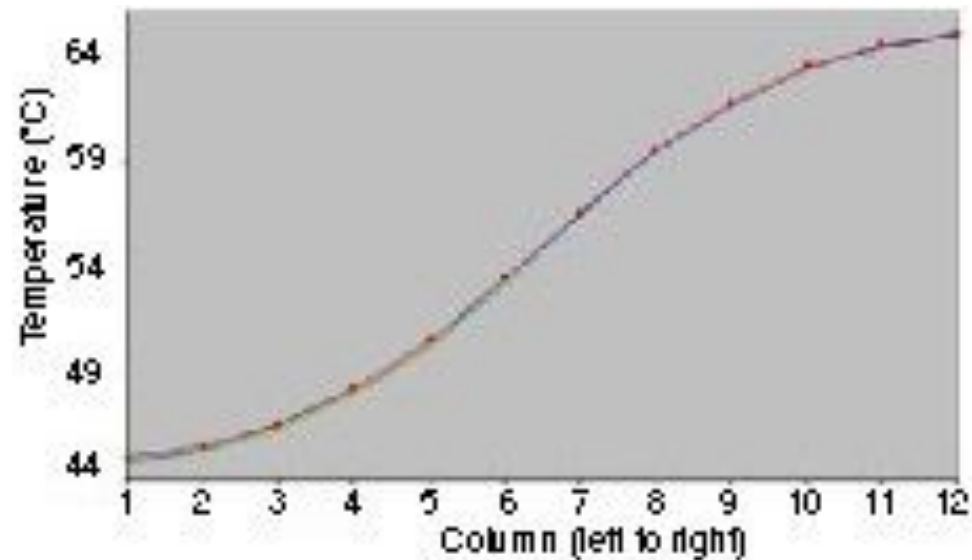
（一）温度梯度PCR

1、概念：

通过对复性温度比引物的 T_m 值低2-10℃的范围内进行系列PCR预实验来对复性条件进行优化.

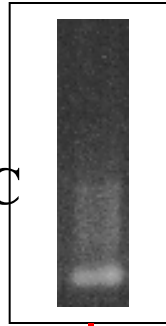
温度梯度PCR

**Thermal Image of 45-65°C
Gradient
across a PTC-200
with a 96-well Alpha**



温度梯度PCR优化复性温度

**Unoptimized
Annealing temperature 50°C**



Gradient optimization of 12
different temperatures across
the block, tested between
48°C and 68°C

48°C



68°C

**Optimized
Annealing
Temperature 62.6°C**



实验目的

- 掌握PCR反应的原理及技术。
- 掌握PCR反应的操作方法。

实验原理

- 聚合酶链式反应（**polymerase chain reaction**）简称**PCR**技术，是一种体外**扩增特异DNA片段**的技术。
- 利用**PCR**技术可在短时间内获得数百万个特异的**DNA**序列的拷贝。**PCR**技术在分子克隆、遗传病的基因诊断等方面得到广泛的应用。
- **PCR**技术实际上是在模板**DNA**、引物和4种脱氧核苷酸存在的条件下依赖于**DNA**聚合酶的酶促合成反应。
- **PCR**技术的特异性取决于引物和模板**DNA**结合的特异性。

实验仪器、材料与试剂

（一）仪器

- 1. PCR仪
- 2. 台式离心机
- 3. 微量取液器

(二) 材料

- 模板DNA
- 引物：APO A1-GST2(载体： pGEX-6P-1)

PrimerGST6p1-APOA1-Up:

5' GGAATTCATGGATGAACCCCCCCCAGAGCC -3'

EcoRI

PrimerGST6p1-APOA1-down:

5' CGCGTCGACTCA CTG GGT GTT GAG CTT CT-3'

Sall

(三) 试剂

- 1. 10x PCR buffer
- 2. dNTPs 2.5mM
- 3. Taq 酶 5u/ μ l
- 4. 引物1和2(2 μ mol/L)
- 5. 模板

实验步骤

1. 在0.2ml Eppendorf管内配制20 μ l反应体系

ddH₂O: 8.5ul

10x PCR buffer: 2ul

dNTPs (2.5mM) : 4ul

引物1 (2uM): 1ul

引物2 (2uM): 1ul

模板: 1ul

MgCl₂ 2ul

Taq 酶: 0.5ul

2. 按下述循环程序进行扩增

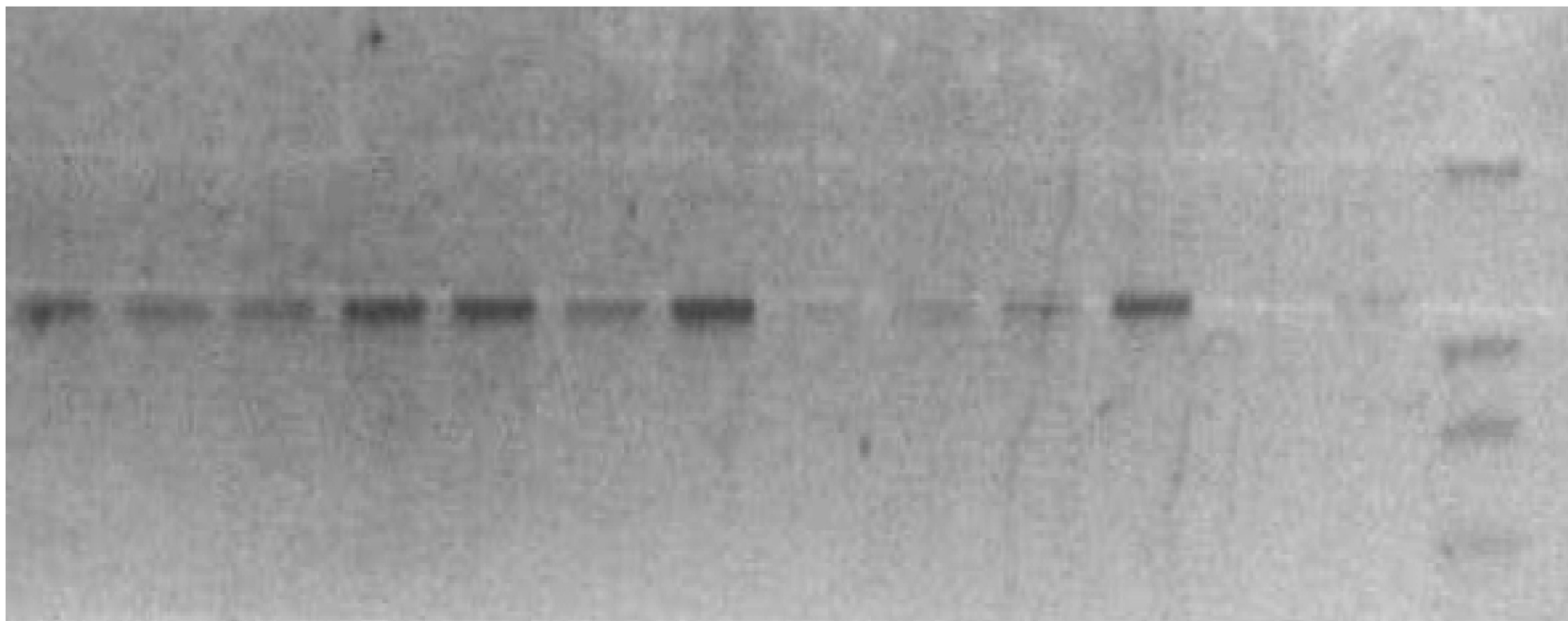
- 94℃ 5分钟， 1个循环；
- 94℃ 30秒， 52℃ 30秒， 72℃ 30秒， 30个循环；
- 72℃ 延伸10 分钟。
- 4℃ 保温。

3. 扩增结束后取**20 μ l**扩增产物，利用琼脂糖电泳检测**DNA**扩增情况,并切胶用于回收.

实验结果与讨论

- PCR体系的配制过程中应尽量减少污染的机会，以免出现目的条带以外的杂带。
- 加样时要认真，吸头垂直进入试剂管，每加完一样要换一个吸头，同时在已加的样品前做个记号以防止错加或漏加，避免污染。
- Taq聚合酶（置于冰盒上）应最后加入，尽量减少室温接触机会。加酶时吸头深入不可过深，酶量不能过多。

电泳结果



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 M

（二）热启动PCR

热启动PCR是除了好的引物设计之外，提高PCR特异性最重要的方法之一。尽管Taq DNA聚合酶的最佳延伸温度在72℃，聚合酶在室温仍然有活性。因此，在PCR反应试剂配制过程中，以及在热循环刚开始，保温温度低于退火温度时会产生非特异性的产物。这些非特异性产物一旦形成，就会被有效扩增。

限制Taq DNA聚合酶活性的常用方法是在冰上配制PCR反应液，并将其置于预热的PCR仪。这种方法简单便宜，但并不能完成抑制酶的活性，因此并不能完全消除非特异性产物的扩增。

➤ 手动热启动法

管底：DNA、预冷buffer、dNTP和dH₂O

管壁：引物

预热：80℃

加Taq酶，离心，开始PCR循环。

➤ 专用热启动酶法

抗体介导的抑制DNA聚合酶法

化学阻断DNA聚合酶法

其他DNA聚合酶抑制剂法

（三）Touch-down PCR

1、概念：

Touch-down PCR又称降落PCR。即选定一个温度范围，如50–35℃，每降1–2℃进行1–2个循环，然后在50度下进行15个循环。

2、原理：

随着退火温度的降低，特异性逐步降低，但特异性条带在温度较高时已经扩增出来，其浓度远远超过非特异性条带，随着退火温度的降低，特异性条带优先被扩增。

3、选择初始复性温度的原则：

起始复性温度应该比引物的 T_m 值高出5-10度，然后每个循环递减1-2度。

4、Touch-down PCR的应用范围

- ✓ 模板DNA浓度较低；
- ✓ 引物简并程度高或特异性低；
- ✓ RT-PCR时使用oligo-dT。

（四）RT-PCR

1、概念：

RNA的多聚酶反应（RT-PCR）是以RNA为模板，联合逆转录反应（reverse transcription, RT）与PCR，可用于检测单个细胞或少数细胞中少于10个拷贝的RNA模板。

2、RNA扩增包括两个步骤：

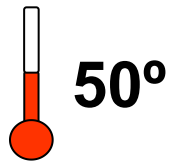
（1）在单引物的介导下和逆转录酶的催化下，合成RNA的互补cDNA

（2）加热后cDNA与RNA链解离，然后与另一引物退火，并由DNA聚合酶催化引物延伸生成双链靶DNA，最后扩增靶DNA

RT-PCR



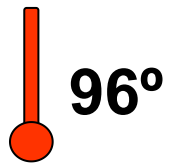
RT-PCR



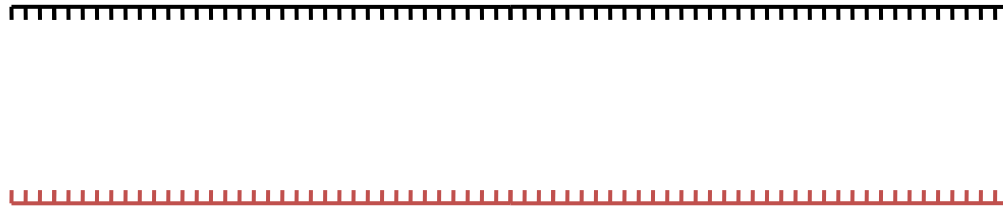
50°



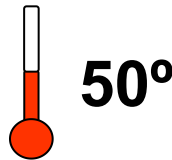
A.
Double
strand
DNA



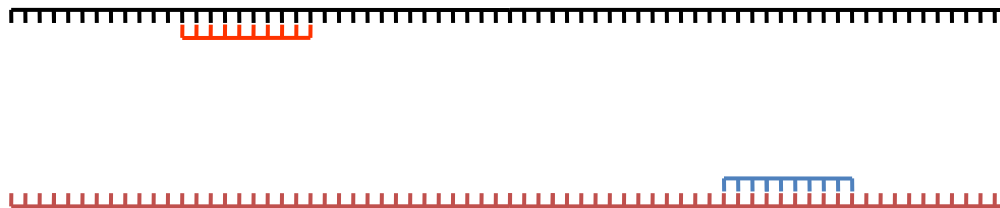
96°



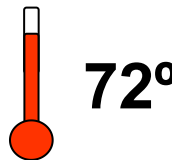
B.
Denature



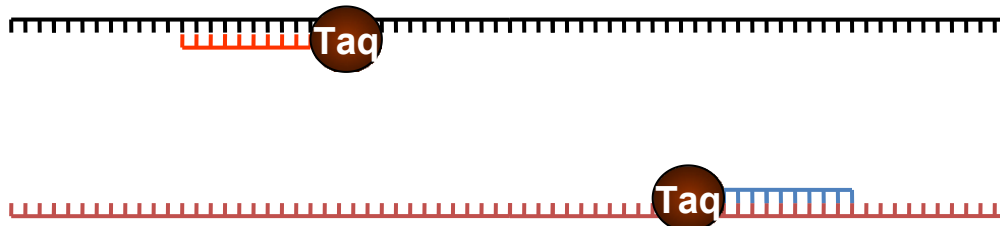
50°



C.
Anneal
primers



72°



D.
Polymerase
binds

3、cDNA第二链的合成方法有以下两种：

(1) 自身引导法

合成的单链cDNA 3'端能够形成一短的发夹结构,这就为第二链的合成提供了现成的引物,当第一链合成反应产物的DNA-RNA杂交链变性后,利用大肠杆菌DNA聚合酶 I Klenow片段或反转录酶合成cDNA第二链,最后用对单链特异性的S1核酸酶消化该环,即可进一步克隆。但自身引导合成法较难控制反应,而且用S1核酸酶切割发夹结构时无一例外地将导致对应于mRNA 5'端序列出现缺失和重排,因而该方法目前很少使用。

(2) 置换合成法

该方法利用第一链在反转录酶作用下产生的cDNA-mRNA杂交链不经变性, 而是dNTP存在下, 利用RNA酶H在杂交链的mRNA链上造成切口和缺口。从而产生一系列RNA引物, 使之成为合成第二链的引物, 在大肠杆菌DNA聚合酶 I 的作用下合成第二链。

该反应有3个主要优点:

- ①非常有效;
- ②直接利用mRNA链, 无须进一步处理和纯化;
- ③不必使用S1核酸酶来切割双链cDNA中的单链发夹环。

4、RT-PCR特殊条件

(1) 模板：

作为模板的RNA分子必须是完整的，并且不含DNA、蛋白质和其他杂质。RNA中即使含有最微量的DNA，经扩增后也会出现非特异性扩增；蛋白若未除干净，与RNA结合后会影响逆转录和PCR；残留的RNase极易将模板RNA降解掉。

(2) 引物:

- 上下游引物设计在跨内含子的两个外显子的3'端和下一个外显子的5'端，这样不会在基因组上扩出来。
- 设计在两个离得远的外显子上，这样从基因组和cDNA上得到的片段长度不一样，可以一物两用。

5、RT-PCR方法：一步法和两步法

(1) 一步法：

在同一缓冲液体系中加入逆转录酶、引物、Taq酶、4种dNTP直接进行mRNA反转录与PCR扩增。另外Taq酶不仅具有DNA多聚酶的作用，而且具有反转录酶活性，可利用其双重作用在同一体系中直接以mRNA为模板进行反转录和其后PCR扩增，从而使mRNA的PCR步骤更为简化。

特点：所需**样品量少**，可检测出总RNA中小于1ng的低丰度mRNA。可用于临床小样品的检测、低丰度mRNA的cDNA文库的构建及特异cDNA的克隆，并有可能与Taq酶的测序技术相组合。

(2) 两步法:

由于单管反应时RT和PCR都不能在**最佳条件**下进行并且容易**相互干扰**，常只适宜用基因特异引物扩增较短的基因及定量PCR，两步法则是将RT和PCR分别进行。

特点：两步法使得两个反应分开，能够充分发挥各自的特点，更为**灵活**而且**严谨**，适合那些GC含量、二级结构严重的模板或者是未知模板，以及多个基因的RT-PCR。

RT-PCR中的一步法和两步法比较

一步法

- 引物: Gene-specific
- 优点: 方便, 不易污染
- 应用: 大量样本分析
低丰度mRNA的RT-PCR
实时定量RT-PCR

两步法

Oligo(dT)
Random hexamers
Gene-specific

灵活性

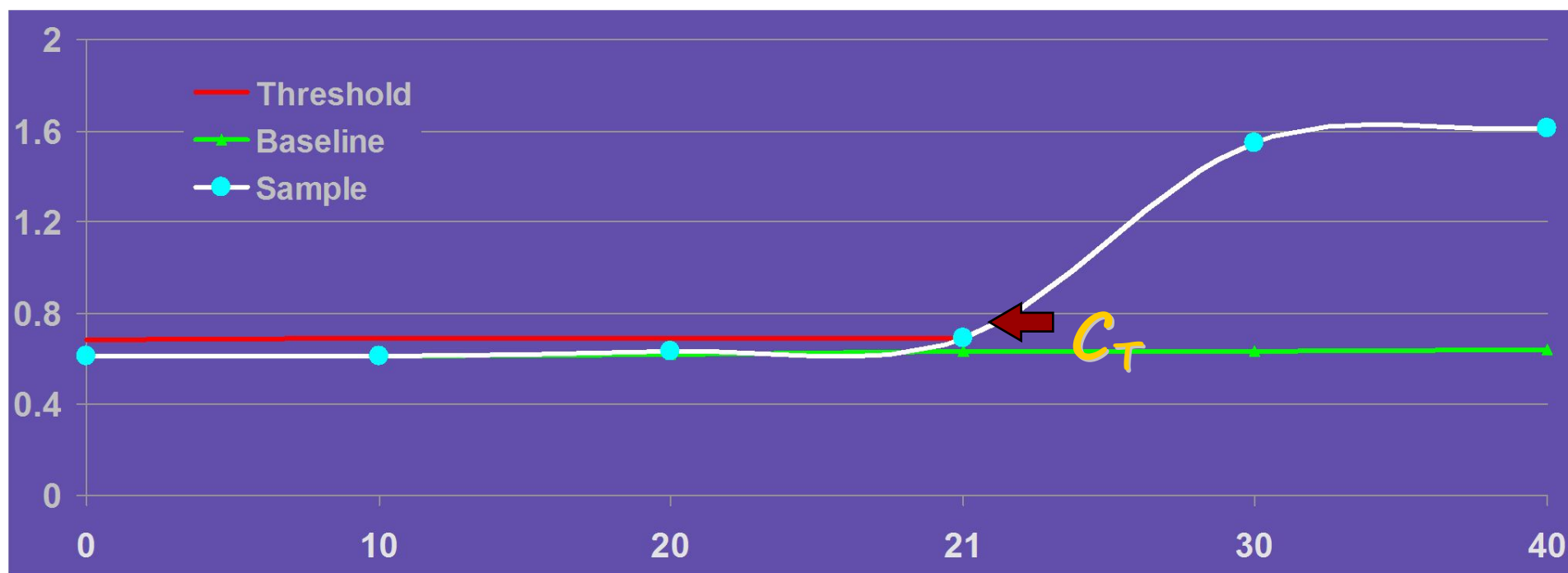
GC含量、二级结构严重的模板或者是未知模板, 以及多个基因的RT-PCR。

（五）荧光定量PCR

1、概念：

在PCR反应体系中加入荧光基团，利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程，最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。

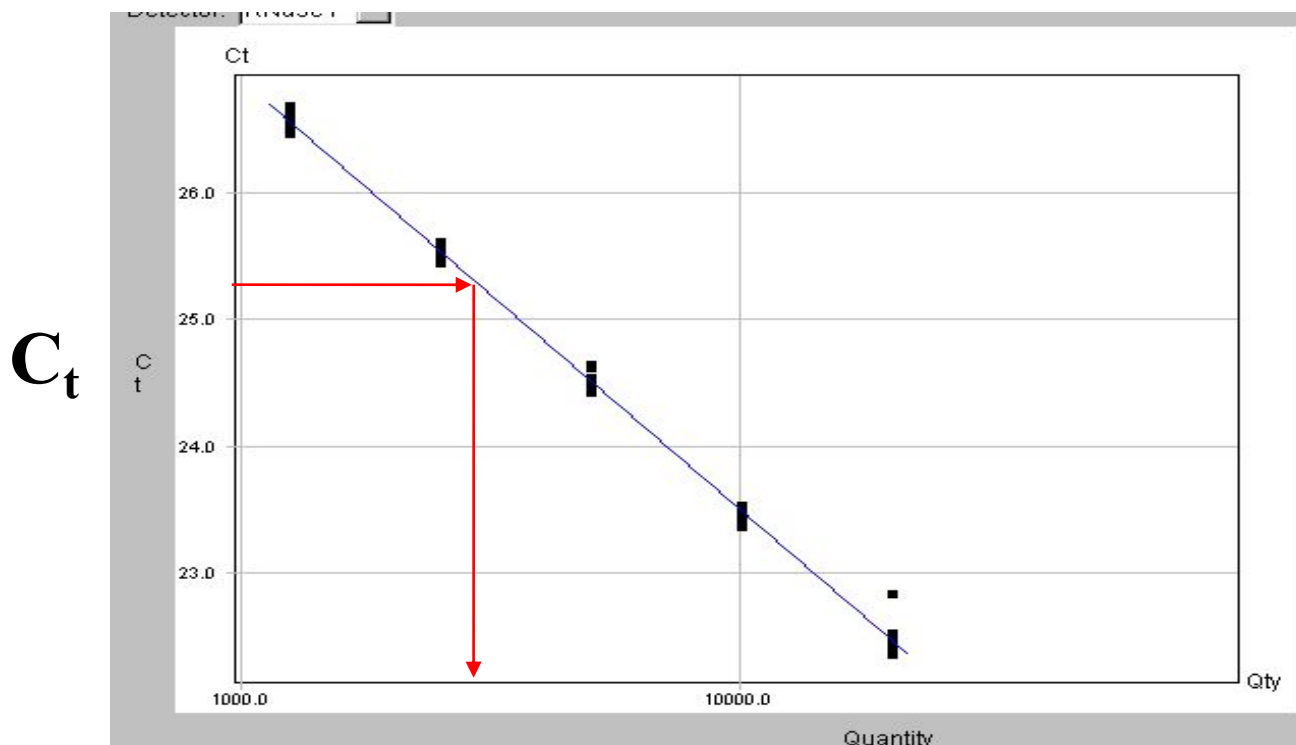
Ct值的定义



扩增产物的相对荧光强度达到设定的阈值时所经过的循环数。

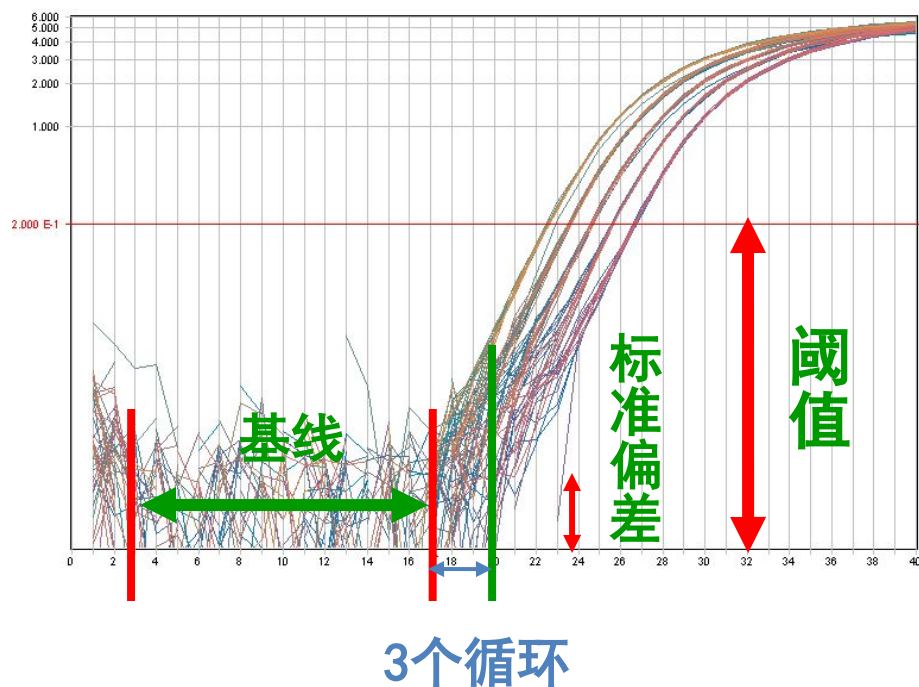
C_T 值与起始DNA拷贝数的关系

$$C_t = -k \log X_0 + b$$



起始DNA拷贝数

基线和阈值的确定



阈值 = 基线（背景）信号
均值 + 基线（背景）信号
标准偏差 $\times 10$

基线的范围：
从第3个循环起到指数增长
开始前3个循环止。
一般取3-15循环。

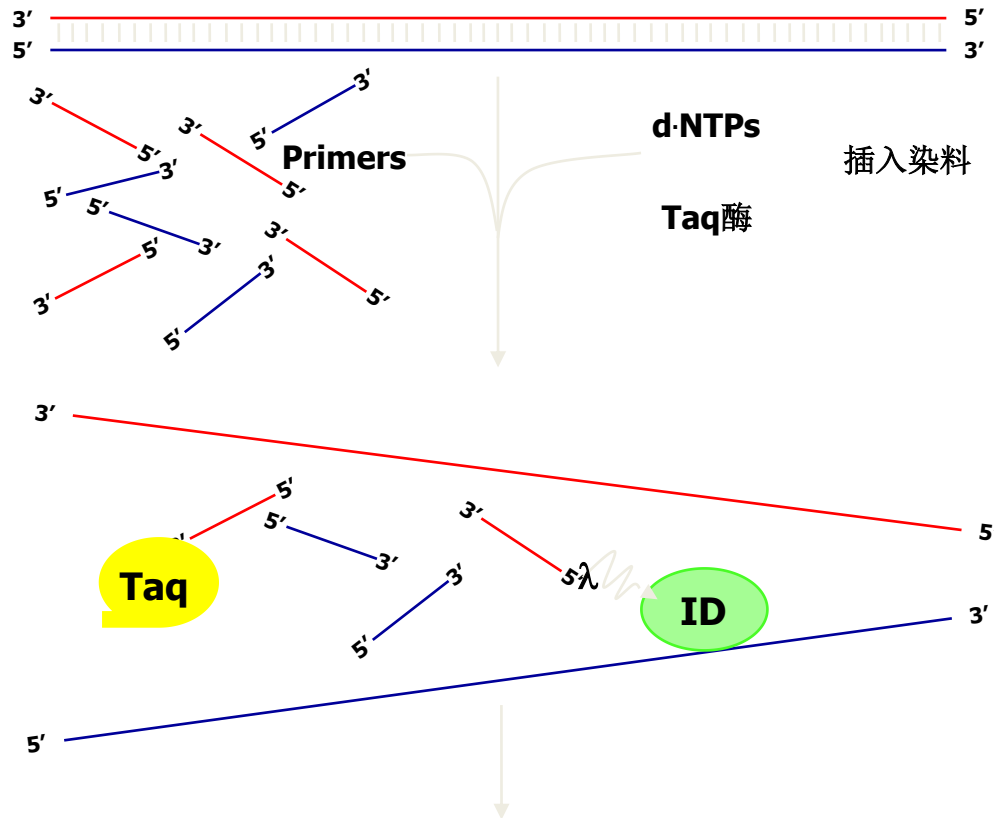
2、荧光PCR的方法

(1) 插入染料法

(2) 杂交探针法

- TaqMan 探针
- 分子信标探针 (Molecular Beacons)
- FRET探针

插入染料方法的原理



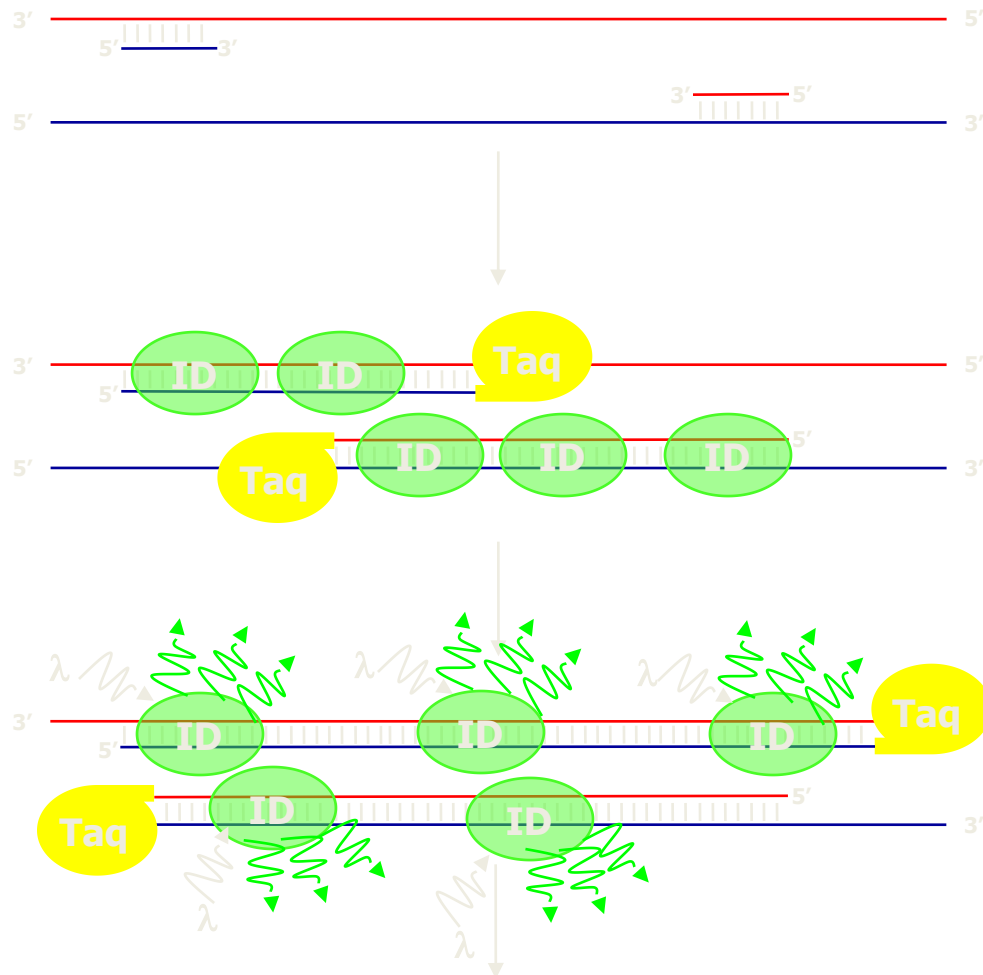
反应组分

变性

退 火

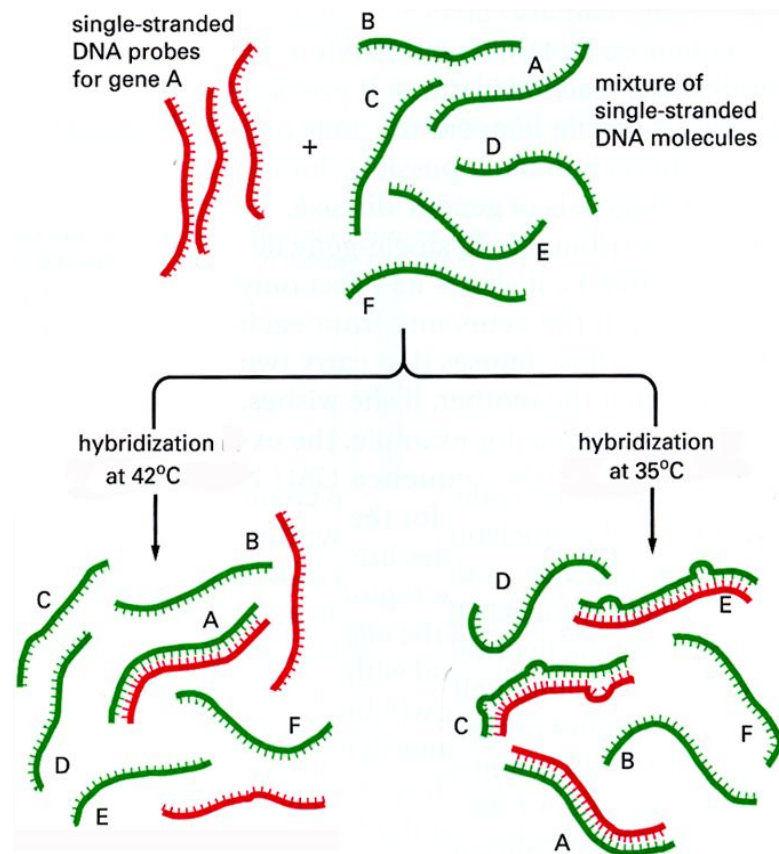
延 伸

检测激发的荧光

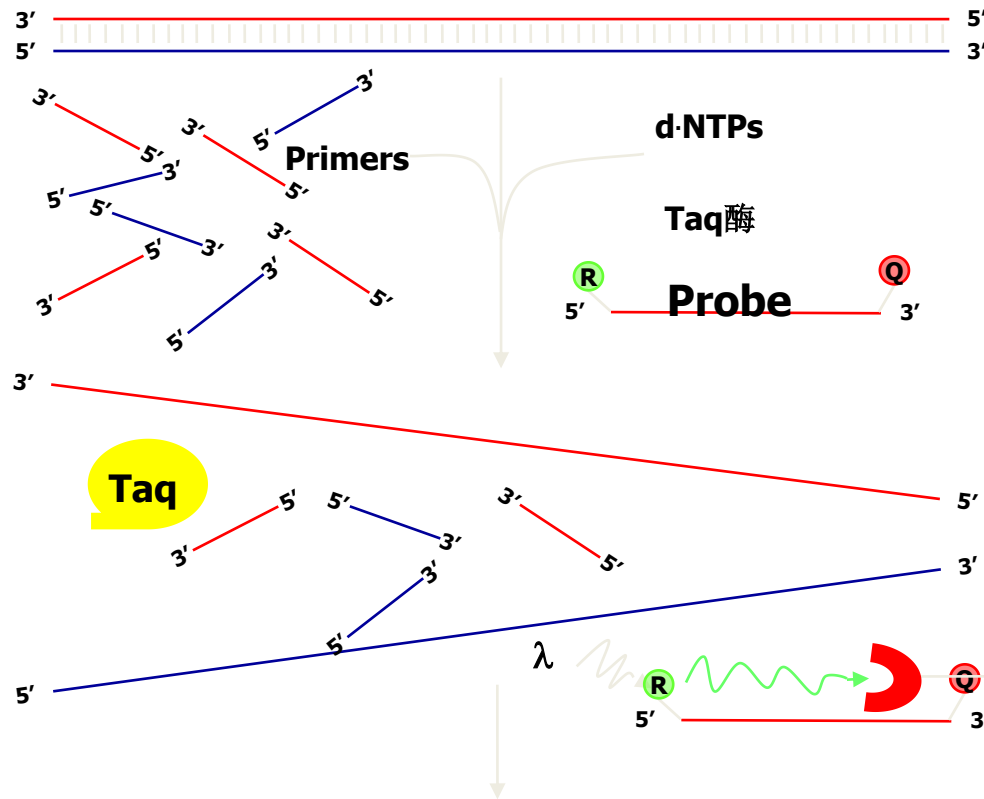


最常用的插入染料

- SYBR Green
- 激发波长495nm，检测波长520nm。
- SYBRGreen染料插入双链DNA，检测灵敏度提高200倍。
- 相对杂交探针方法，插入染料法相对较便宜。
- 和杂交探针方法相比，插入染料法特异性低。



TaqMan探针



反应体系

变性

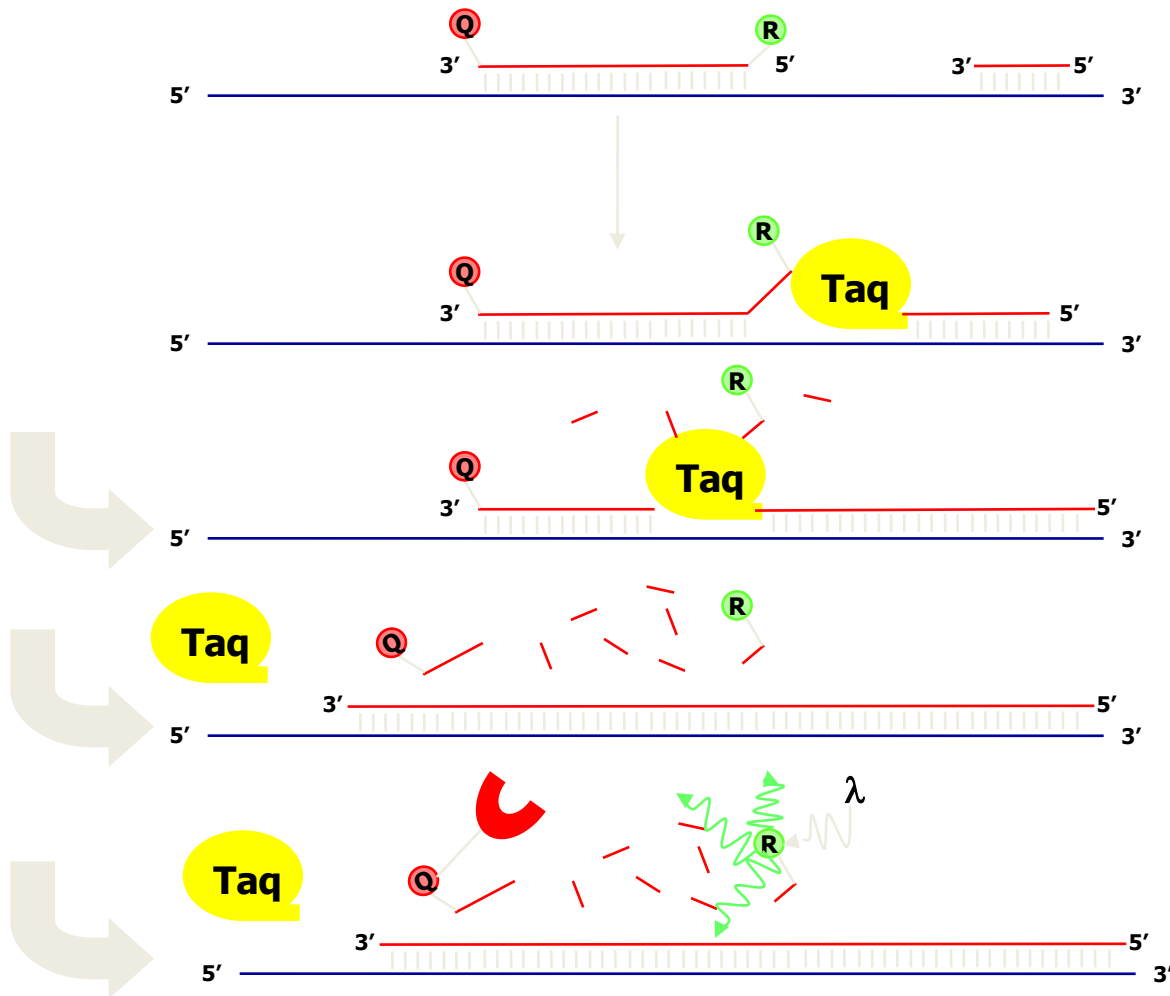
退 火

1. 链取代

2. 水 解

3. 聚 合

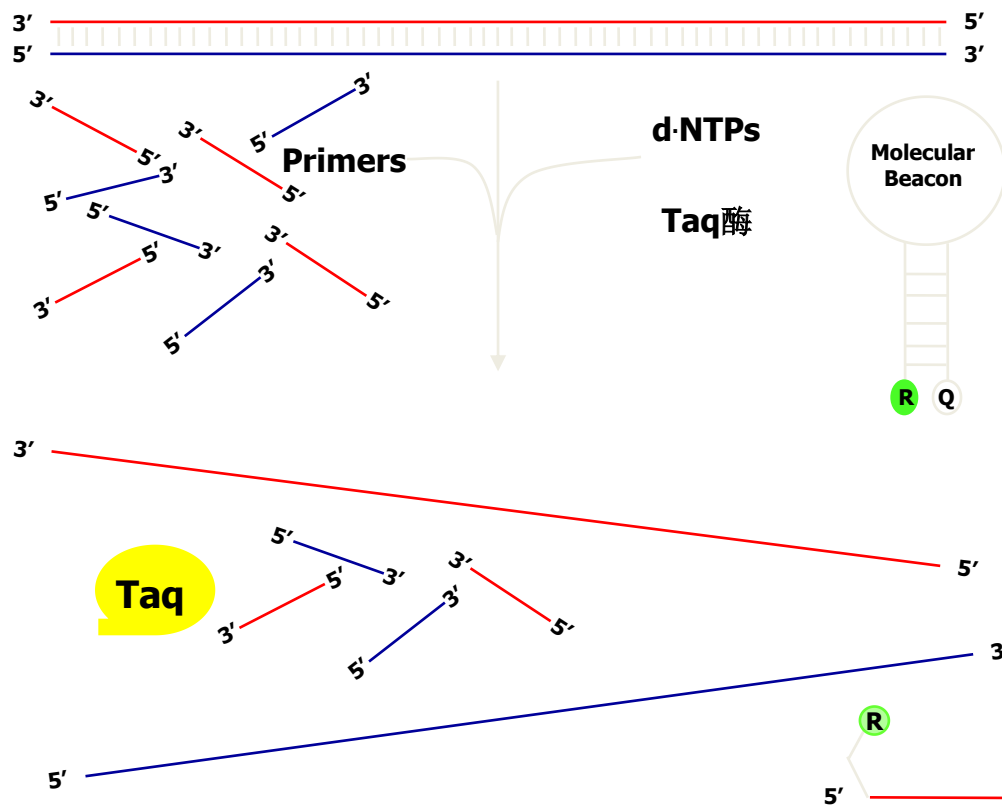
4. 检测荧光



TaqMan探针的设计原则

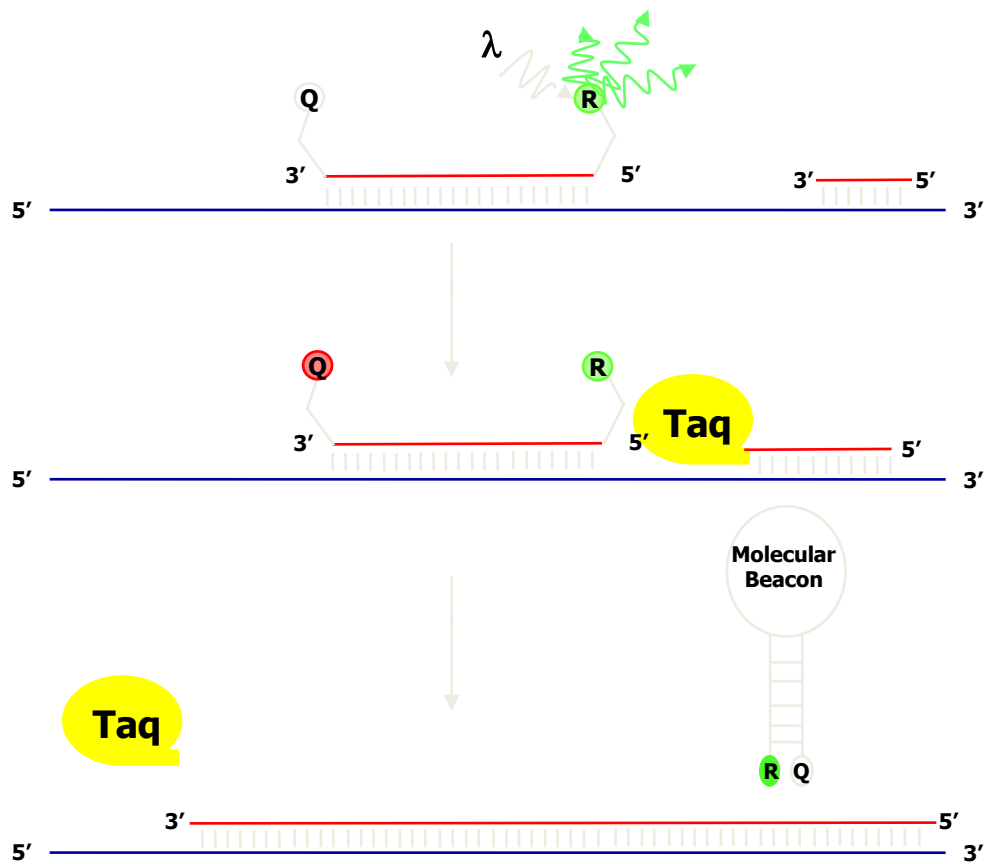
- T_m 大于引物 T_m 10°C
- 5'末端不能是G

分子信标(Molecular Beacons)



反应组分

变性

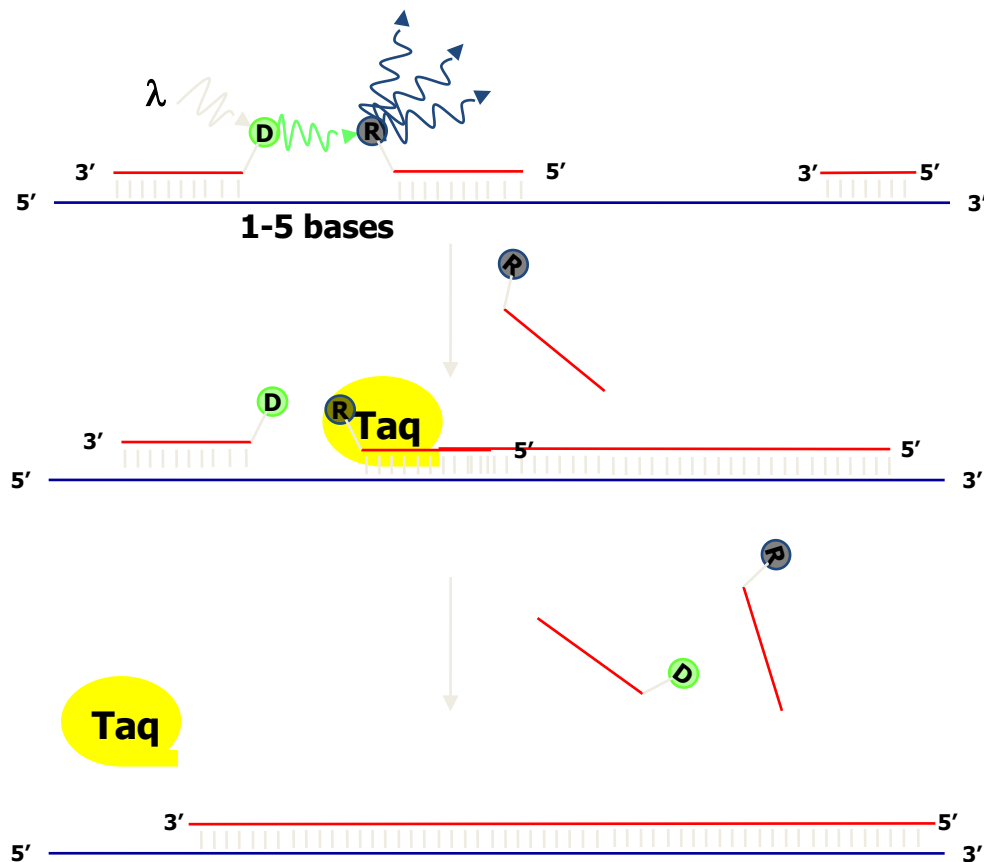


退 火

1. 链替换

2. 聚合完成

FRET 探针



退 火

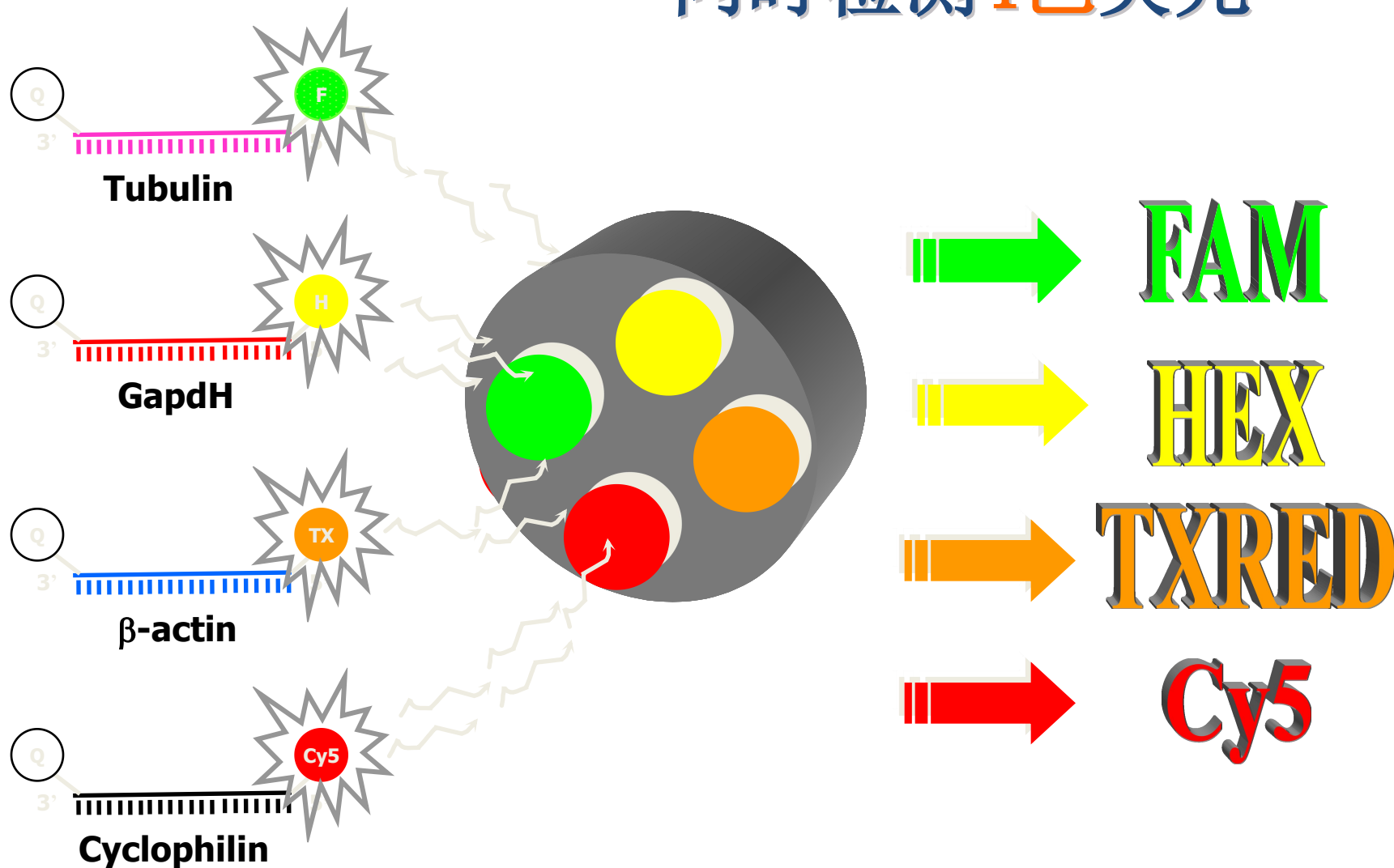
链替换, 荧光熄灭

常用的荧光基团

		Absorbance (nm)	Emission (nm)
	FAM	494	525
	TET, VIC	521	536
	HEX	535	556
	JOE	520	548
	CY3	552	570
	TAMRA	565	580
	CY3.5, Redmond Red		
	Texas Red, ROX	583	603
	CY5 LC640	643	667
	CY5.5, LC705		

多色荧光检测技术

——同时检测4色荧光



3、荧光定量PCR的应用

- **相对定量：**基因在不同组织中的表达差异、药物疗效考核
- **绝对定量：**基因表达研究、病原体检测、转基因食品检测

相对定量

参考基因: Actin, GAPDH, 18sRNA

	靶基因A	GAPDH	ΔC_t
对照组	25.2	19.5	5.7
实验组	22.1	20.8	1.3

1. 计算 ΔC_t : $\Delta C_t = C_t \text{ 靶基因} - C_t \text{ GAPDH}$, 分别计算实验组和对照组的 ΔC_t 。
2. 计算 $\Delta \Delta C_t$: $\Delta \Delta C_t = \Delta C_t \text{ 实验组} - \Delta C_t \text{ 对照组}$, 本例中 $\Delta \Delta C_t = -4.4$ 。
3. 计算相对表达量的差值。 $2^{-\Delta \Delta C_t}$

绝对定量

构建标准曲线：

- A、按照扩增片段的序列，人工合成一段寡聚核苷酸。
- B、利用纯化的扩增产物制备
- C、克隆有扩增产物的质粒

标准品的选择：

标准品可以从厂家购买，也可以自己制备

标准品的单位，取决于对最终结果的要求：拷贝数，
%， ng/uL， mol/uL（如：如果要得出的是样品中的
基因拷贝数，则梯度稀释已知摩尔浓度的DNA）

实验误差校正技术——准确定量

- 荧光强度的校正

影响荧光信号强度的因素包括：

- 光源强度、管盖透光性能
- 缓冲液用量、反应体积、PCR反应强度等等

以扩增前的荧光探针本底信号为依据，荧光强度归一化校正。

内参照荧光Rox校正。

- PCR扩增效率的校正

利用多色荧光检测技术对内标荧光的检测可校正PCR扩增效率误差。

（六）兼并引物PCR（Degenerate Primer）

1、密码子的兼并性

氨基酸	密码子数
M、W	1
C、D、E、F、H、K、N、Q、Y	2
I	3
A、G、P、T、V	4
L、R、S	6

2、概念

兼并引物是指代表编码**单个氨基酸**所有不同碱基可能性的不同序列的混合物。兼并度越低，产物特异性越强。设计引物时应尽量选择兼并性小的氨基酸，并避免引物3' 末端兼并，因为3' 端最后3个碱基的退火足以在错误位点起始PCR；次黄嘌呤可以同所有的碱基配对，降低引物的退火温度。

（七）巢氏PCR（Nested PCR）

巢氏PCR需要两到三对引物，一般采用第一套引物扩增15-30个循环，再用扩增DNA片段内设定的第二套引物扩增15-30个循环，这样可使待扩增序列得到高效扩增，而次级结构却很少扩增。套式引物PCR减少了引物非特异性退火，从而增加了特异性扩增，提高了扩增效率。

若将套失PCR的内外引物稍加改变，延长外引物长度（25-30bp），同时缩短内引物长度（15-17bp），使外引物先在高退火温度下复性，做双温扩增，然后改换至三温循环，使内引物在外引物扩增的基础上，在低退火温度复性，直到扩增完成，这样就可以使两套引物一次同时加入。

（八）反向PCR（Inverse PCR）

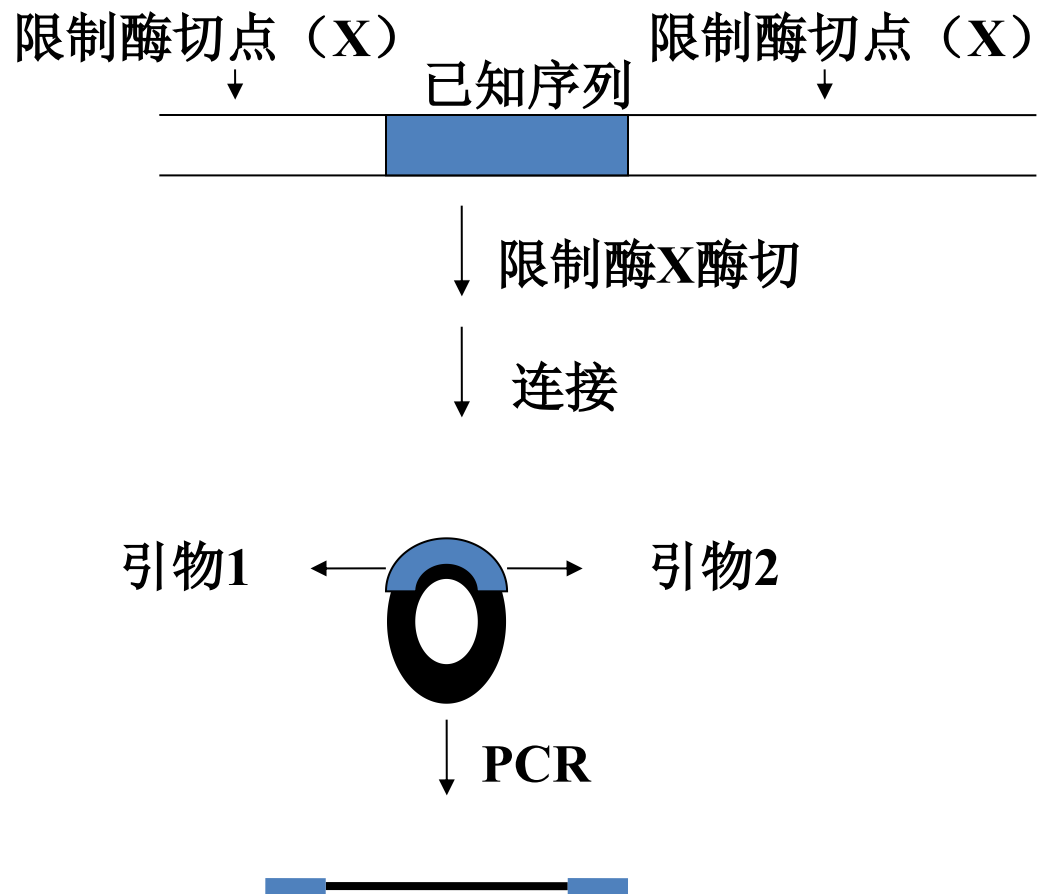
1、概念

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，因此又称为**染色体步移**。这时选择的引物虽然与核心DNA两末端序列互补，但引物3'端是相互反向的。

2、反向PCR的操作流程：

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**环状分子**，通过**反向PCR**扩增引物的上游片段和下游片段。

Inverse PCR



（九）不对称PCR（Asymmetric PCR）

1、不对称PCR的基本原理：

采用不等量的引物产生大量的单链DNA（ss-DNA）。这两种引物分别称为限制性引物与非限制性引物；其最佳比例一般为1:50-1:100，**关键是限制引物的绝对量**。限制性引物太多太少，均不利于ss-DNA。

2、不对称PCR反应过程：

一般来说，在不对称PCR反应中，在开始的20-25个循环中，两个比率不对称的扩增引物产生出双链DNA，当限量的那个引物耗光后，随后的5-10个循环就产生出ssDNA。产生的ds-DNA与ss-DNA由于分子量不同，可以通过电泳分离。

3、ssDNA产物量:

一般对100 μ l PCR反应体系而言, 当引物比率为50pmol:0.5pmol, 经过30个循环后, 大约可产生1-3pmol的ssDNA。ssDNA的产量可用下列几种方法来估计:

- a) 在ss-DNA合成过程中, 掺入 ^{32}P -dNTP。取10%的反应产物, 经过琼脂糖电泳分离后, 放射自显影。
- b) 取5%的反应物来走胶, 转移到膜上, 并用与ssDNA互补的寡核苷酸为探针杂交。

4、解决不对称PCR反应扩增效率低的方法:

- 增加PCR循环的次数
- 在最后五个循环中多加Taq聚合酶(2U)
- 试一下相反的不对称引物比率。有时相反的不对称引物比率可能给出不同产量的ssDNA。

（十）原位PCR

1、概念：

原位PCR就是在组织细胞里进行PCR反应，它结合了具有细胞定位能力的原位杂交和高度特异敏感的PCR技术的优点，是细胞学科研究与临床诊断领域里的一项有较大潜力的新技术。

2、特点

原位PCR既能分辨鉴定带有靶序列的细胞，又能标出靶序列在细胞内的位置，于分子和细胞水平上研究疾病的发病机理和临床过程及病理的转归有重大的实用价值，其特异性和敏感性高于一般的PCR。

3、基本方法:

①**固定组织或细胞**:将组织细胞固定于预先用四氟乙烯包被的玻璃片上,并用多聚甲醛处理,再灭活除去细胞内源性过氧化物酶。

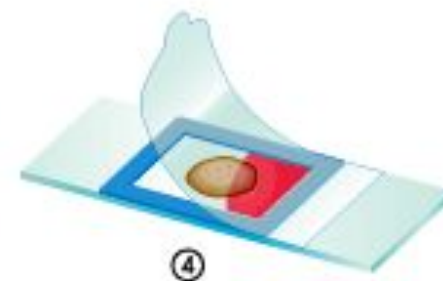
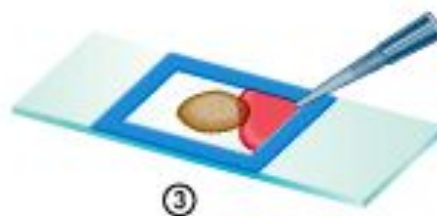
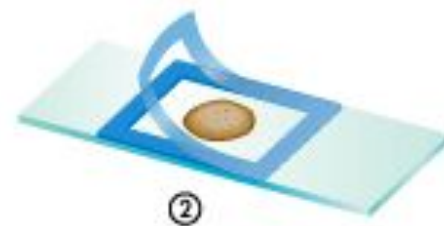
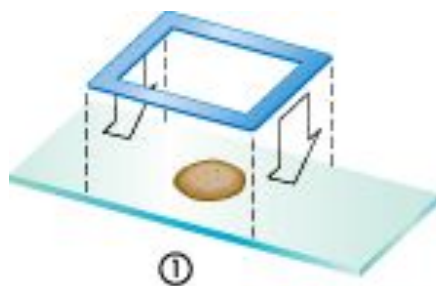
②**蛋白酶K消化处理**:用60ug/ml的蛋白酶K将固定好的组织细胞片55℃消化处理2h后,96℃2min以灭活蛋白酶K。

③**PCR扩增**:在组织细胞片上,加PCR反应液,覆盖并加液体石蜡后,直接放在扩增仪的金属板上,进行PCR循环扩增。

④**杂交**:PCR扩增结束后,用标记的寡核苷酸探针进行原位杂交。

⑤**显微镜观察结果**。

原位PCR



（十一）连接酶链反应 (Ligase chain reaction, LCR)

1、LCR的基本原理：

利用DNA连接酶特异地将双链DNA片段连接，经变性-退火-连接三步骤反复循环，从而使靶基因序列大量扩增。

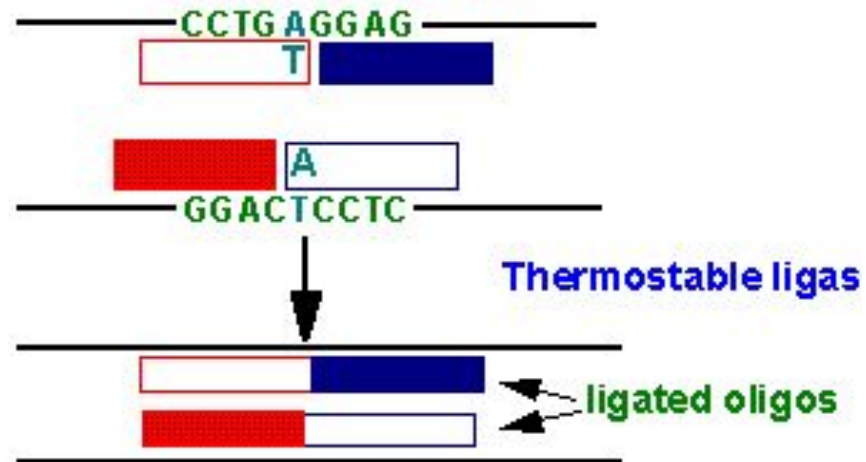
2、应用

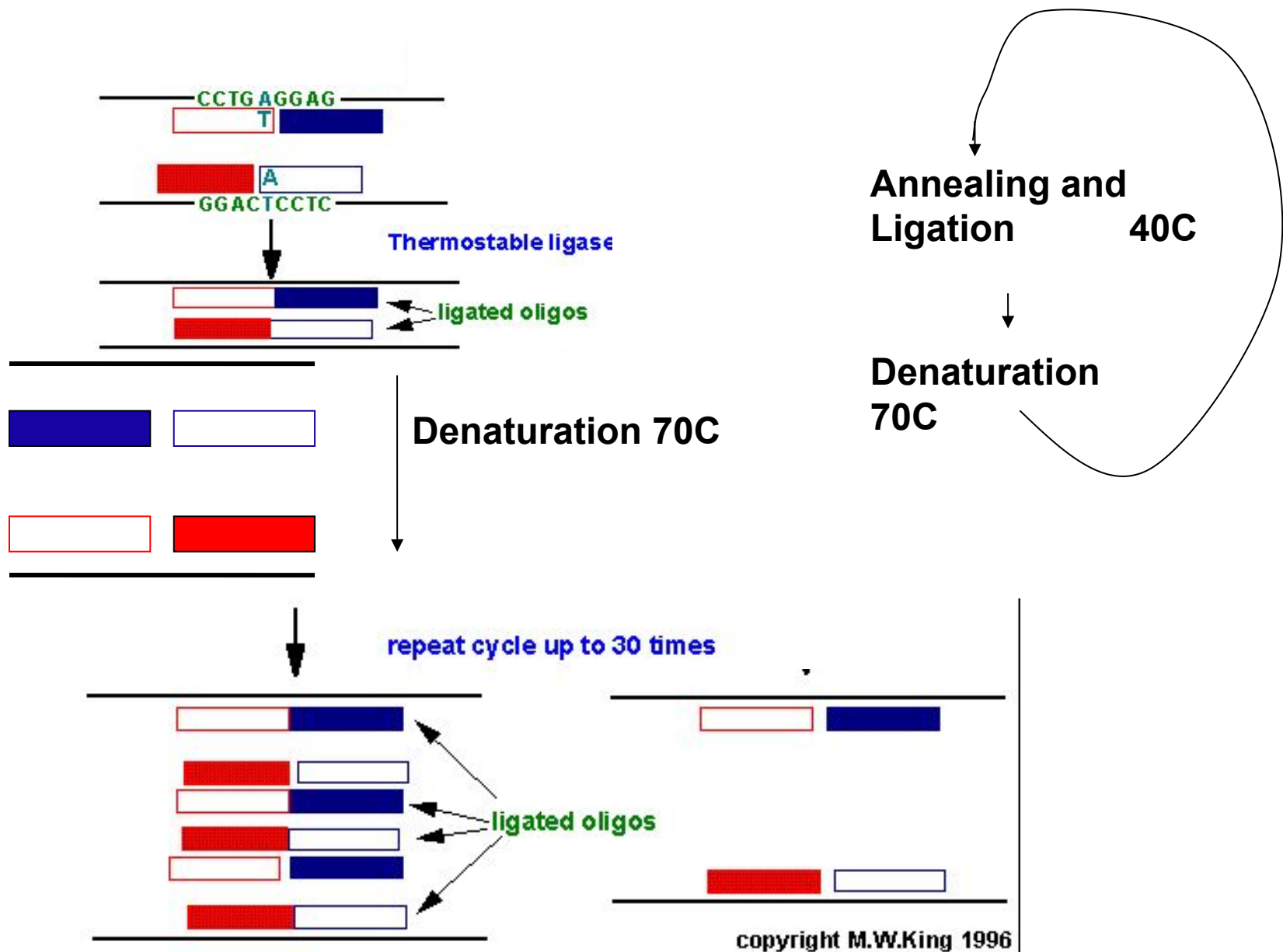
目前LCR主要用于点突变的研究与检测、微生物病原体的检测及定向诱变等，还可用于单碱基遗传病多态性及单碱基遗传病的产物诊断，微生物的种型鉴定，癌基因的点突变研究等。

3、反应程序：

- 首先加热至一定温度下 ($94\sim 95^{\circ}\text{C}$) 使DNA变性，双链打开；
- 然后降温退火 (65°C)，引物与之互补的模板DNA结合并留下一缺口；
- 如果与靶序列杂交的相邻的寡核苷酸引物与靶序列完全互补，DNA连接酶即可连接封闭这一缺口，则LCR反应的三步骤(变性-退火-连接)就能反复进行，每次连接反应的产物又可在下一轮反应中作模板，使更多的寡核苷酸被连接与扩增。若连接处的靶序列有点突变，引物不能与靶序列精确结合，缺口附近核苷酸的空间结构发生变化，连接反应不能进行，也就不能形成连接产物。

Ligase chain reaction (LCR)





（十二）cDNA末端快速扩增技术 (rapid amplification of cDNA ends, RACE)

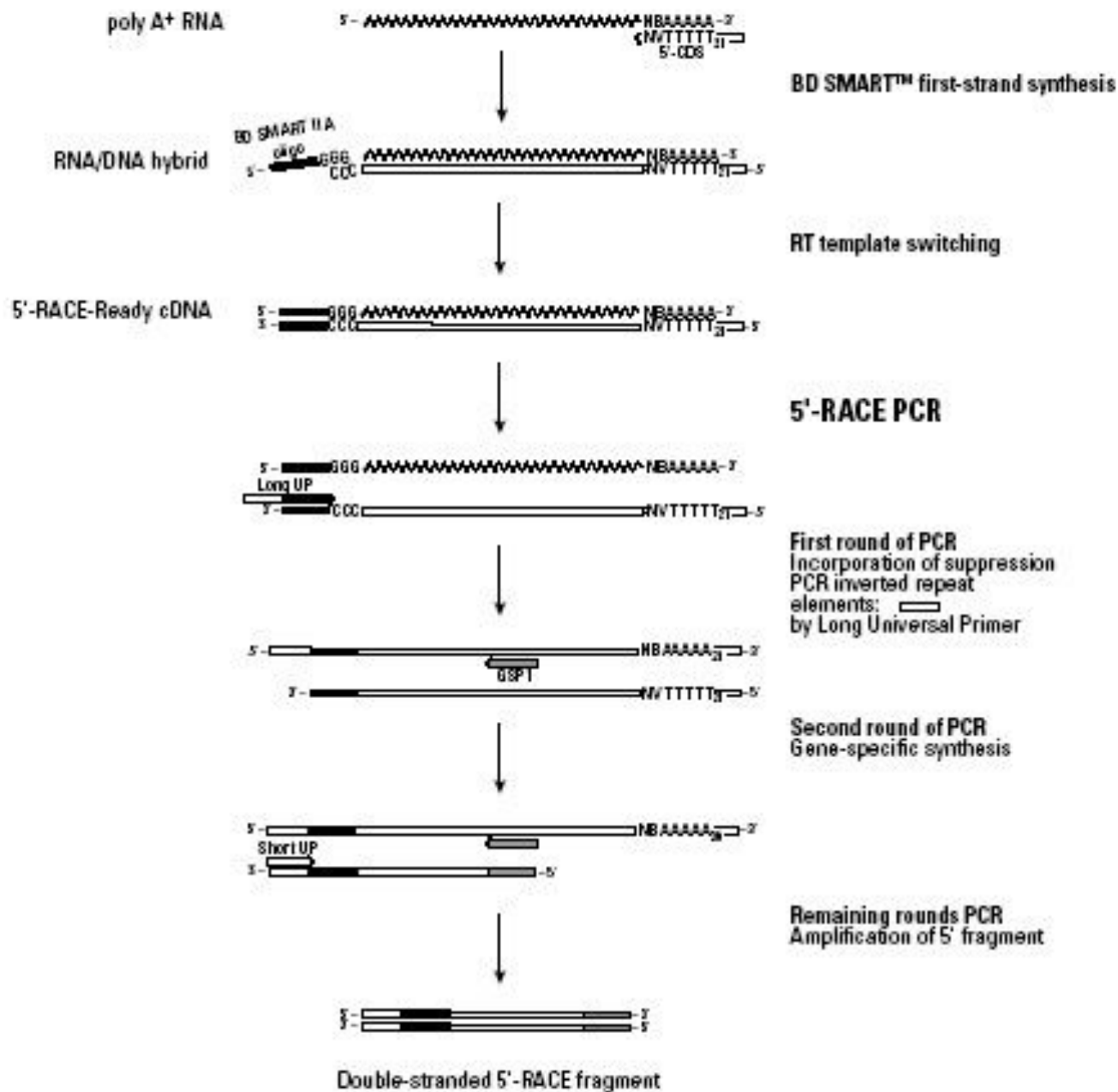
cDNA末端快速扩增技术是一种基于PCR从低丰度的转录本中快速扩增cDNA的5'和3'末端的有效方法。

RACE可以分为两类：

- ✓ 5' RACE-PCR
- ✓ 3' RACE-PCR

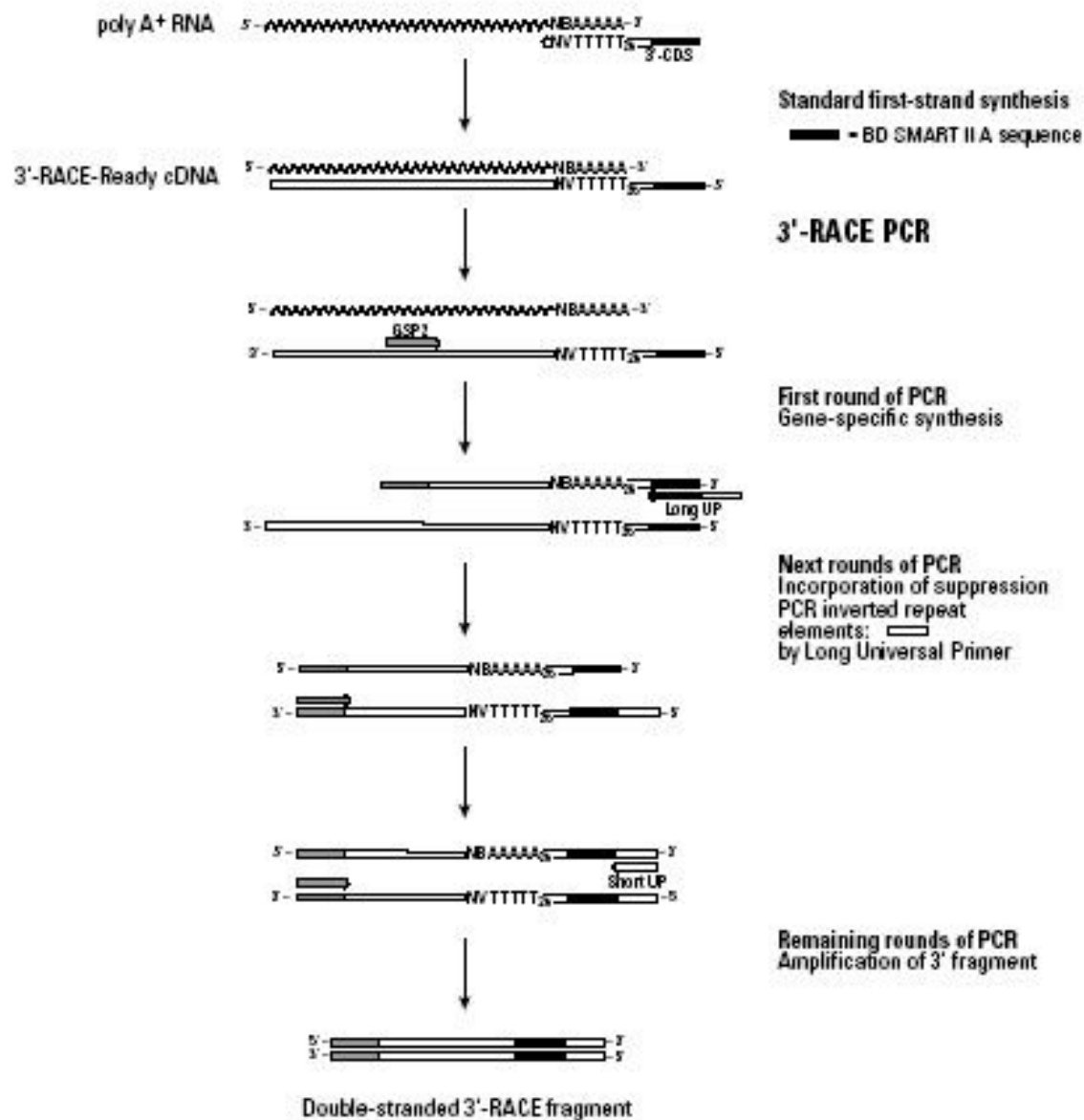
5' RACE-PCR

利用mRNA的3'末端的poly(A)尾巴作为一个引物结合位点，以Oligo(dT)30MN作为锁定引物在反转录酶MMLV作用下，反转录合成标准第一链cDNA。利用该反转录酶具有的末端转移酶活性，在反转录达到第一链的5'末端时自动加上3—5个(dC)残基，退火后(dC)残基与含有SMART寡核苷酸序列Oligo(dG)通用接头引物配对后，转换为以SMART序列为模板继续延伸而连上通用接头 (figure 2)。然后用一个含有部分接头序列的通用引物UPM(universal primer, UPM)作为上游引物，用一个基因特异引物2(GSP 2 genespecific primer, GSP)作为下游引物，以SMART第一链cDNA为模板，进行PCR循环，把目的基因5'末端的cDNA片段扩增出来。最终，从2个有相互重叠序列的3' / 5'-RACE产物中获得全长cDNA，或者通过分析RACE产物的3'和5'端序列，合成相应引物扩增出全长cDNA。



3' RACE-PCR

利用mRNA的3'末端的poly(A)尾巴作为一个引物结合位点，以连有SMART寡核苷酸序列通用接头引物的Oligo(dT)30MN作为锁定引物反转录合成标准第一链cDNA。然后用一个基因特异引物GSP1 (gene specific primer, GSP)作为上游引物，用一个含有部分接头序列的通用引物UPM (universal primer, UPM)作为下游引物，以cDNA第一链为模板，进行PCR循环，把目的基因3'末端的DNA片段扩增出来。



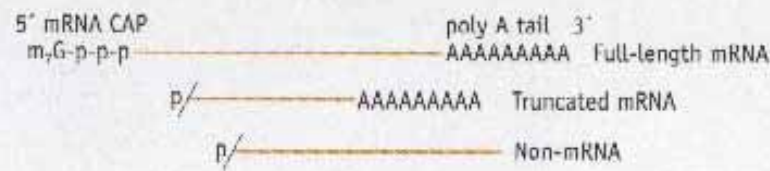
RACE-PCR

(1) 是利用锁定引物(lock docking primer)合成第一链cDNA, 即在oligo(dT)引物的3'端引入两个简并的核苷酸【5'-Oligo(dT)16_30MN-3', M=A/G/C; N=A/G/C/T】, 使引物定位在poly(A)尾的起始点, 从而消除了合成第一条cDNA链时oligo(dT)与poly(A)尾的任何部位的结合所带来的影响;

(2) 在5'端加尾时, 采用poly(C), 而不是poly(A);

(3) 采用RNase H-莫洛尼氏鼠白血. 病毒(MMLV)反转录酶或选择嗜热DNA聚合酶可能在高温h (60 度 -70 度)有效地逆转录mRNA, 从而消除了5'端由于高CC含量导致的mRNA 二级结构对逆转录的影响;

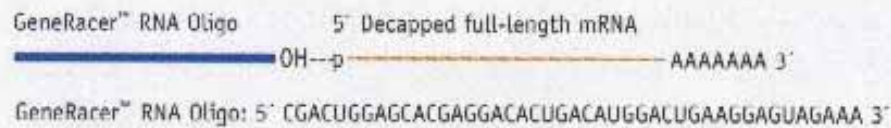
(4) 是采用热启动PCR (hot start PCR)技术和降落PCR(touch down PCR)提高PCR反应的特异性。



↓ CIP



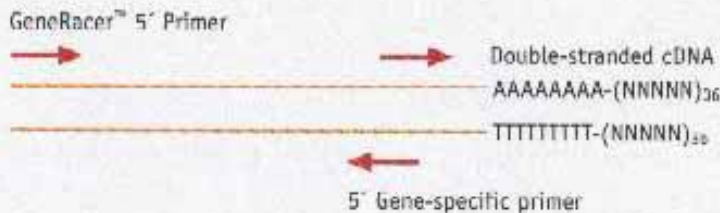
↓ TAP, RNA Ligase



↓ RT



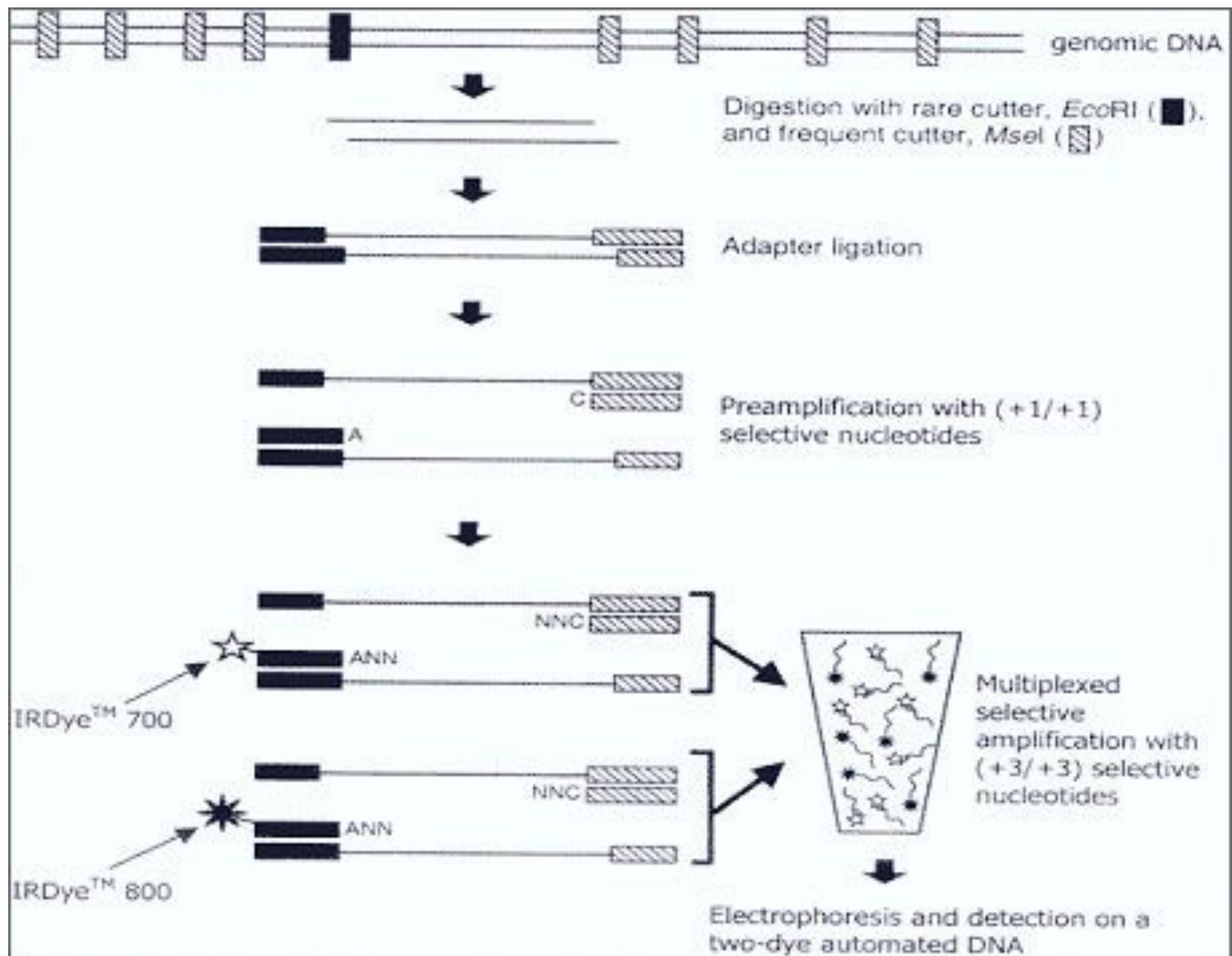
↓ 5'-RACE PCR



（十三）AFLP（扩增性片段长度多态性）

AFLP技术是一项新的分子标记技术，是基于PCR技术扩增基因组DNA限制性片段，基因组DNA先用限制性内切酶切割，然后将双链接头连接到DNA片段的末端，接头序列和相邻的限制性位点序列，作为引物结合位点。限制性片段用二种酶切割产生，一种是罕见切割酶，一种是常用切割酶。它结合了RFLP和PCR技术特点，具有RFLP技术的可靠性和PCR技术的高效性。由于AFLP扩增可使某一品种出现特定的DNA谱带，而在另一品种中可能无此谱带产生，因此，这种通过引物诱导及DNA扩增后得到的DNA多态性可做作为一种分子标记。AFLP可在一次单个反应中检测到大量的片段。所以说AFLP技术是一种新的而且有很大功能的DNA指纹技术。

AFLP



（十四）免疫-PCR (immuno-PCR)

1、概念：

免疫-PCR是新近建立的一种灵敏、特异的抗原检测系统。它利用抗原-抗体反应的特异性和PCR扩增反应的极高灵敏性来检测抗原，尤其适用于极微量抗原的检测。

2、免疫PCR优点

- ①特异性较强，因为它建立在抗原抗体特异性反应的基础上。
- ②敏感度高，PCR具有惊人的扩增能力，免疫PCR比ELISA敏感度高10⁵倍以上，可用于单个抗原的检测。
- ③操作简便，PCR扩增质粒DNA比扩增靶基因容易得多，一般实验室均能进行。

3、主要步骤

- ①抗原-抗体反应；
- ②与嵌合连接分子结合；
- ③PCR扩增嵌合连接分子中的DNA (一般为质粒DNA)。

4、关键环节

免疫-PCR技术的关键环节是嵌合连接分子的制备。嵌合连接分子起着桥梁作用，它有两个结合位点，一个与抗原抗体复合物中的抗体结合，一个与质粒DNA结合，其基本原理与ELISA和免疫酶染色相似，不同之处在于其中的标记物不是酶而是质粒DNA，在操作反应中形成抗原抗体-连接分子-DNA复合物，通过PCR扩增DNA来判断是否存在特异性抗原。

（十五）MSP甲基化特异PCR

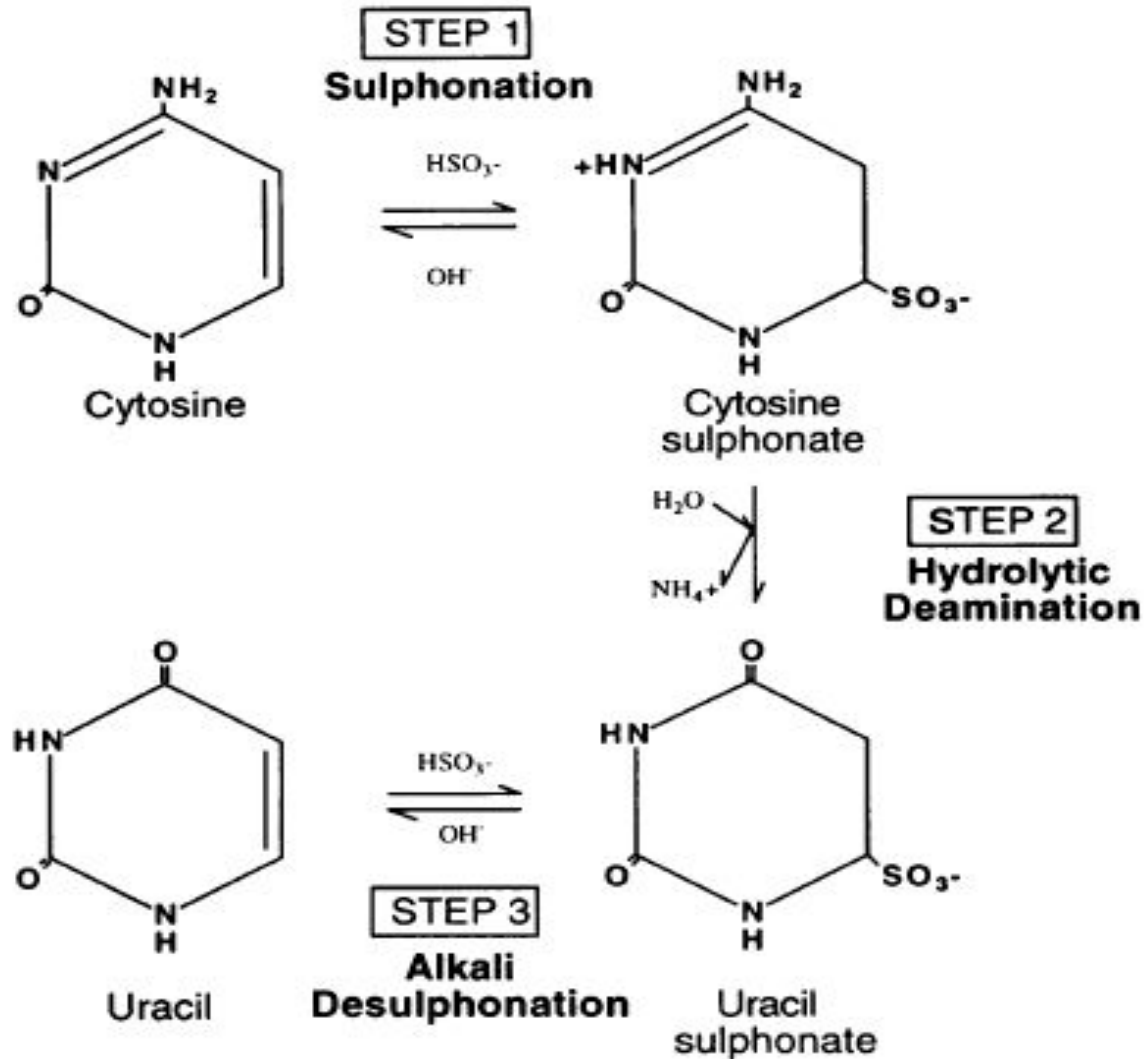
一般调控区保持甲基化状态，基因不表达

- 直接干扰转录因子和启动子识别位点的结合
- 与转录抑制因子结合引起基因沉默
- 改变染色质的结构

概念：

MSP甲基化特异PCR是用对苯二酚和亚硫酸氢钠处理氢氧化钠变性的基因组DNA，使得未甲基化的C转化为T。按照C转换T后的基因序列设计出来的引物扩出目的基因。由于甲基化CpG岛中的C不能被转化为T，用以上的引物将不会扩出目的基因。通过上述手段就能达到识别基因组DNA甲基化与否的目的。

DNA甲基化的分析



(5') **a** --GAGT**CAC**-----CG^mCG-----GCTT**CAG**---
 (3') **b** --CTCAGTG-----GC-----GC_m-----CGAAGT**C**---

↓
 Denaturation

(5') **a** --GAGT**CAC**-----CG^mCG-----GCTT**CAG**---
 (3') **b** --CTCAGTG-----GC-----GC_m-----CGAAGT**C**---

Bisulphite reaction

↓
 Sulphonation (Step1)
 Deamination (Step2)
 Desulphonation (Step3)

(5') **a** --GAGT**UAU**-----UG^mCG-----GUTT**UAG**---
 (3') **b** --UT**U**AGTG-----GU-----GC_m-----UGAAGT**U**---

↓
 PCR amplification
 both DNA strands

(5') **a** --GAGT**TTAT**-----TG-----CG-----GTTT**TAG**---
 (3') **a** --CTCAATA-----AC-----GC-----CAAAATC---

 (5') **b** --TTTAGTG-----GT-----GC-----TGAAGT**T**---
 (3') **b** --AAATCAC-----CA-----CG-----ACTTCAA---

Sequence PCR product directly
 for strand average

Clone and sequence
 for individual molecules