

体外基因扩增

——PCR技术

Xiao Jin

Applied Specialist
Molecular & Cellular Biology

PCR技术简史

PCR的原理

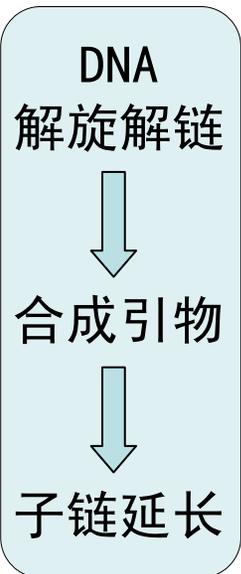
PCR的反应体系和方法

PCR的类型和应用

PCR技术简史

→ DNA的复制

- 核酸体外扩增的设想
- 聚合酶链反应的发明

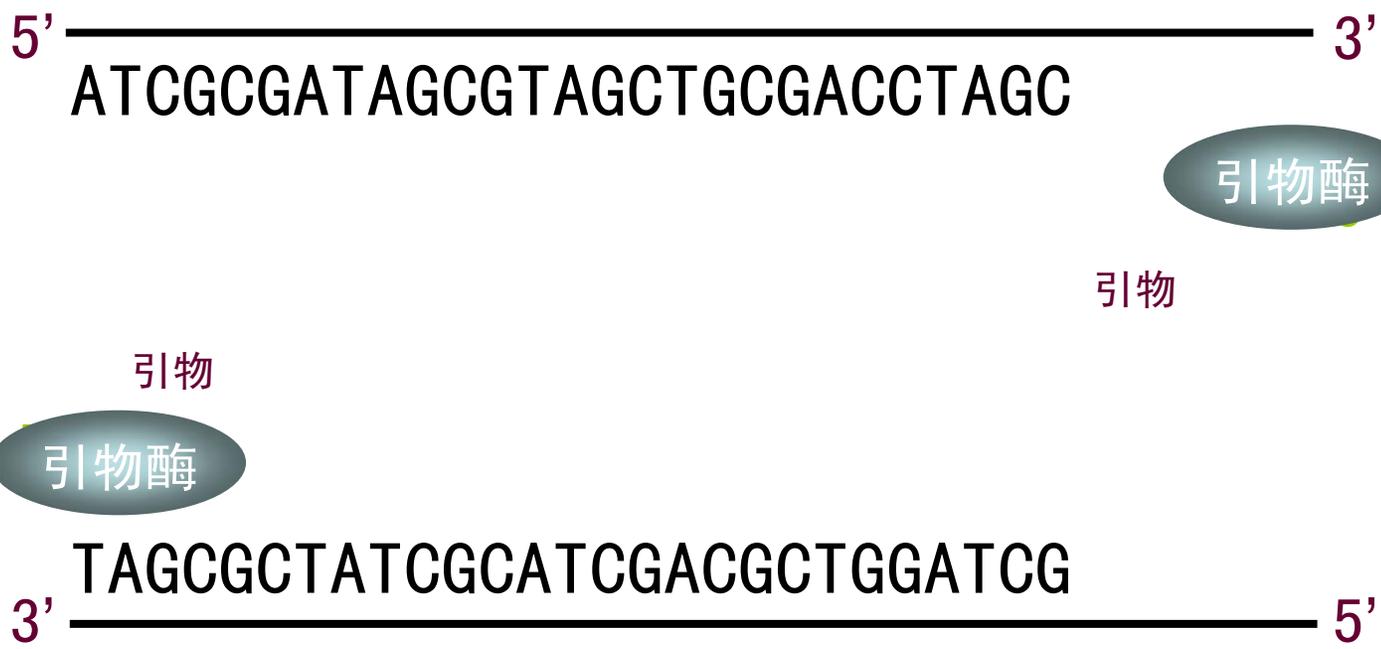
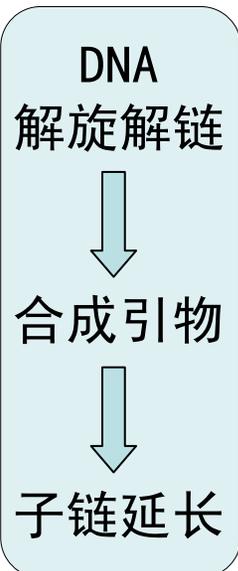


PCR技术简史



DNA的复制

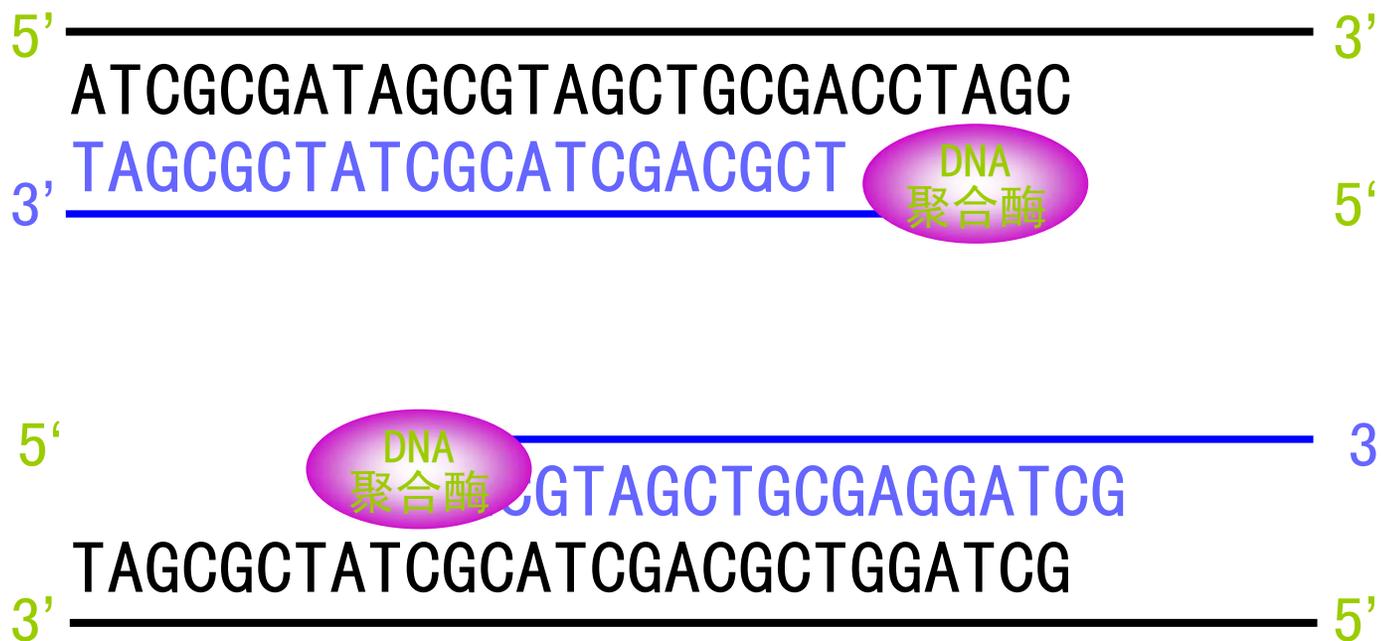
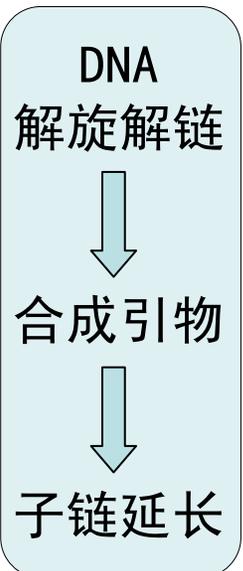
- 核酸体外扩增的设想
- 聚合酶链反应的发明



PCR技术简史

→ DNA的复制

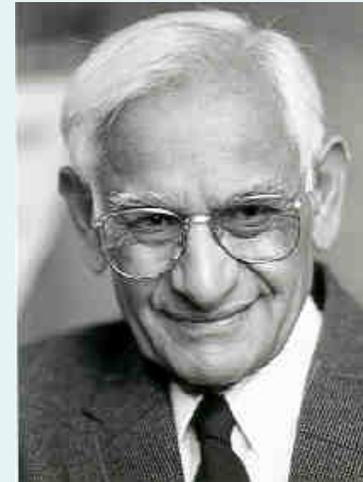
- 核酸体外扩增的设想
- 聚合酶链反应的发明



PCR技术简史

- DNA的复制
- ➔ 核酸体外扩增的设想
- 聚合酶链反应的发明

- 1971年，Khorana提出：经过DNA变性，与合适引物杂交，用DNA聚合酶延伸引物，并不断重复该过程便可克隆tRNA基因。
- 但由于测序和引物合成的困难，以及70年代基因工程技术的发明使克隆基因成为可能，所以，Khorana的设想被人们遗忘了……



PCR技术简史

- DNA的复制
- 核酸体外扩增的设想
- ➔ 聚合酶链反应的发明

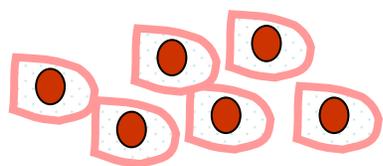


- 1985年，美国PE-Cetus公司（ABI前身）的Mullis等人发明了聚合酶链反应（PCR）
- 基本原理是在试管中模拟细胞内的DNA复制
- 最初采用E-coli DNA聚合酶进行PCR，由于该酶不耐热，使这一过程耗时，费力，且易出错
- 耐热DNA聚合酶的应用使得PCR能高效率的进行，随后PE-Cetus公司推出了第一台PCR自动化热循环仪
- 1993年，Mullis等因此项技术获诺贝尔化学奖

Kary B. Mullis

<<The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction>>

1989年美国《Science》杂志列PCR 为十余项重大科学发明之首, 比喻1989年为PCR爆炸年, Mullis荣获1993年度诺贝尔化学奖。



生物样品



DNA片段



基因诊断

基因治疗

基因工程产品

法医学检测

人类学研究

⋮



基因组DNA

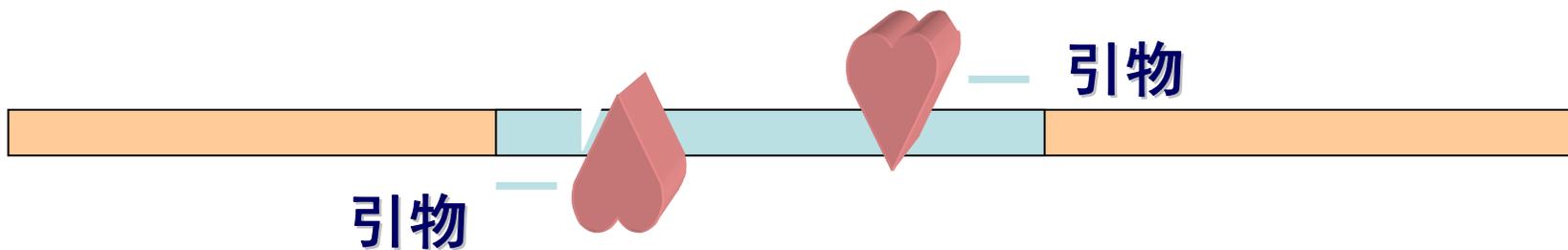


获取特定DNA片段



扩增特定DNA片段

DNA聚合酶



Sanger的
测序技术

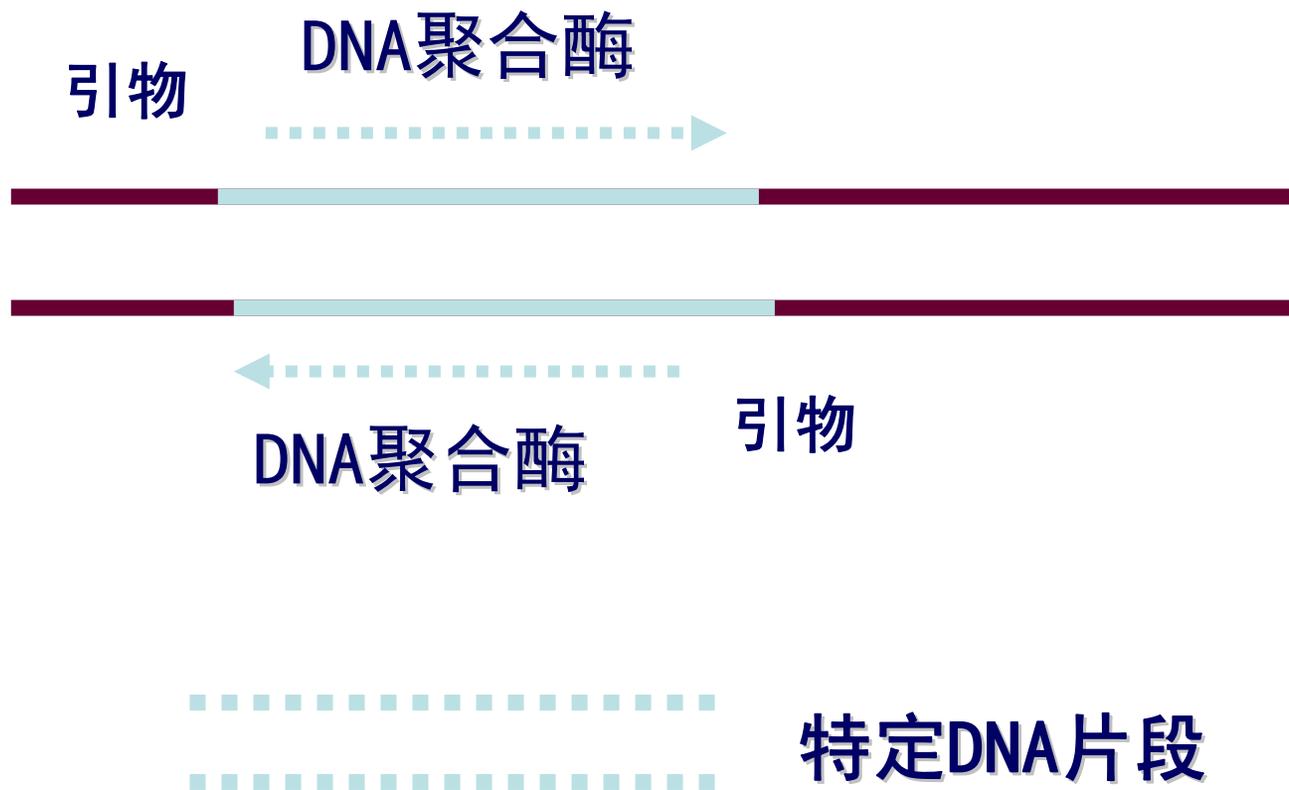
引物

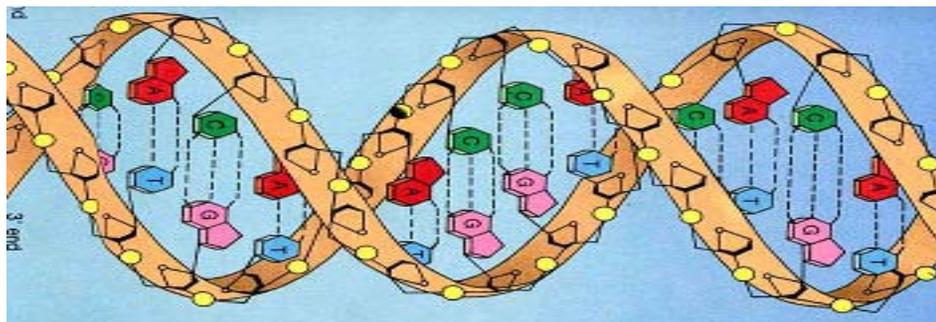
DNA聚合酶

Detailed description: A circular DNA strand is shown as an orange rounded rectangle. A light blue segment is on the top edge. A red arrow labeled '引物' (primer) points to the start of this segment. A dashed blue arrow labeled 'DNA聚合酶' (DNA polymerase) points to the right along the top edge of the circle.

M13噬菌体

Mullis 的构思



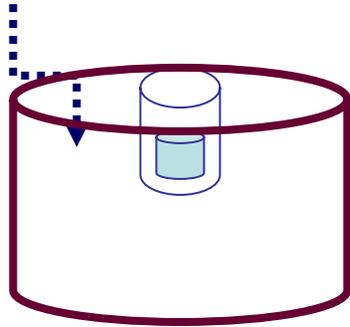


94°C 变性

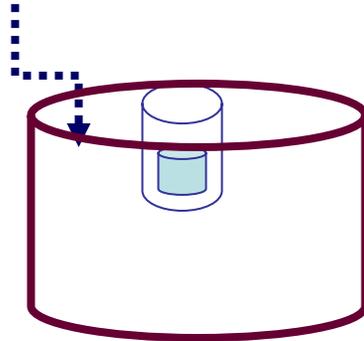
50-65°C 退火

XX°C 延伸

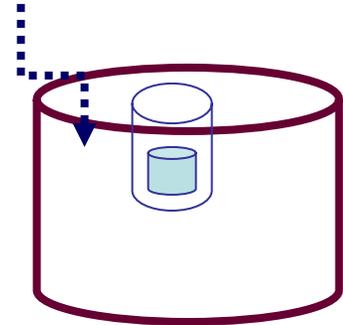
94°C



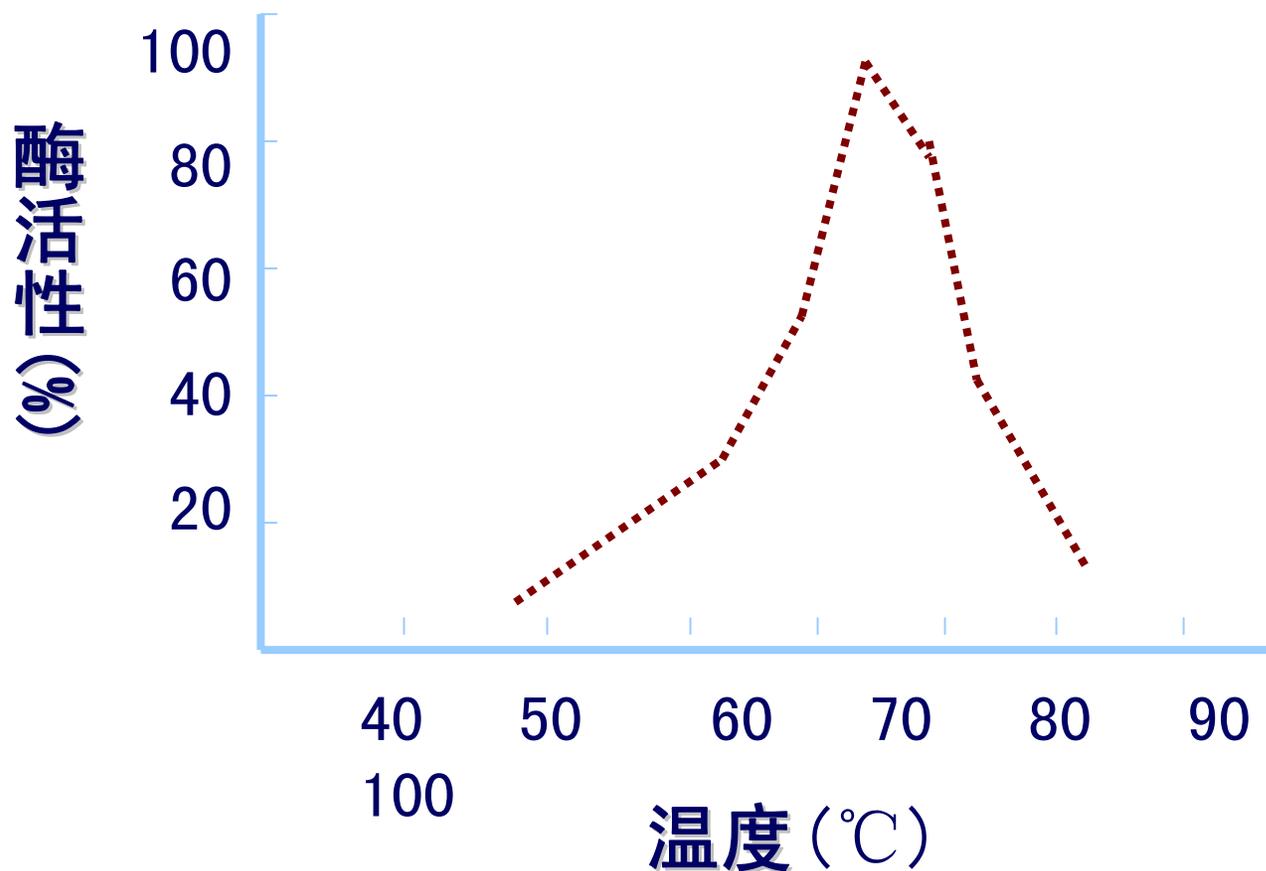
55°C

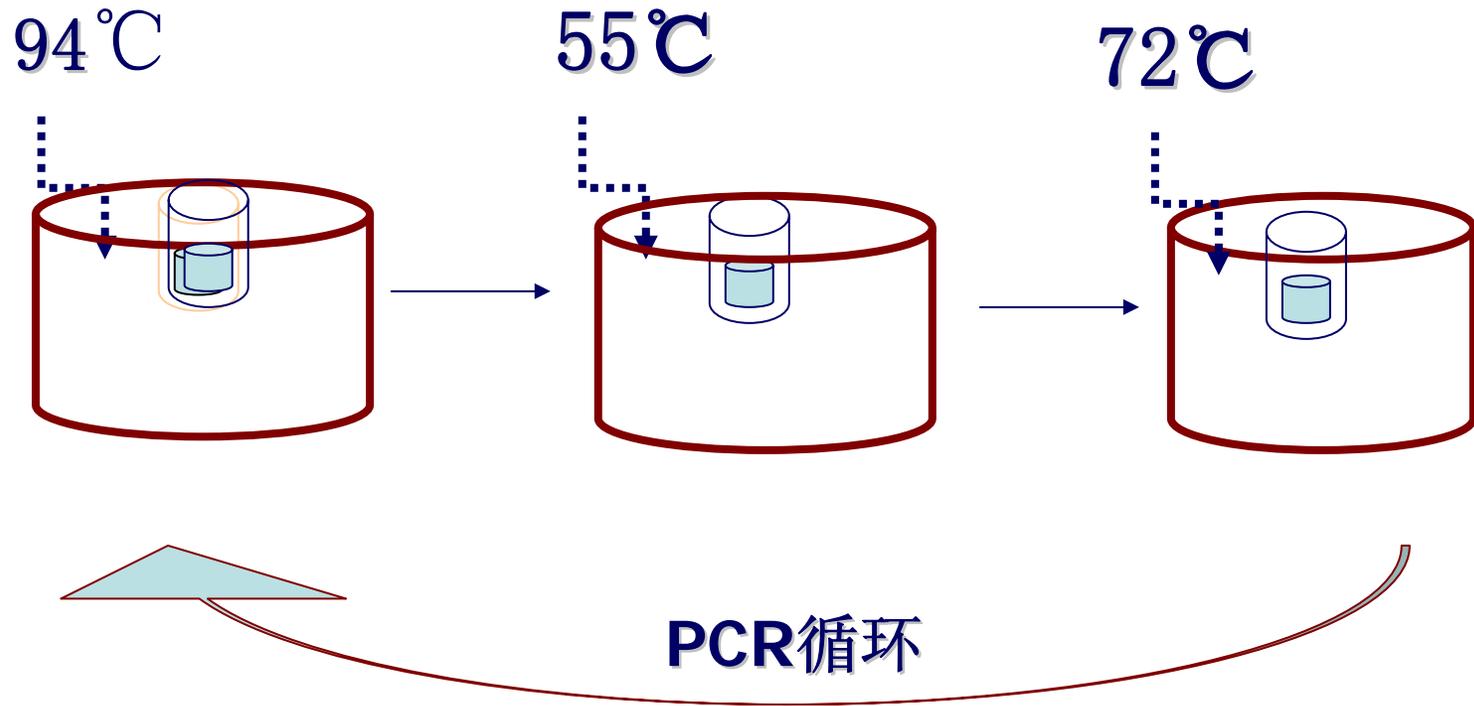


37°C



Taq DNA聚合酶 (thermus aquaticus)





PCR的基本原理

- ➔ PCR反应条件
- PCR过程
 - PCR的特点

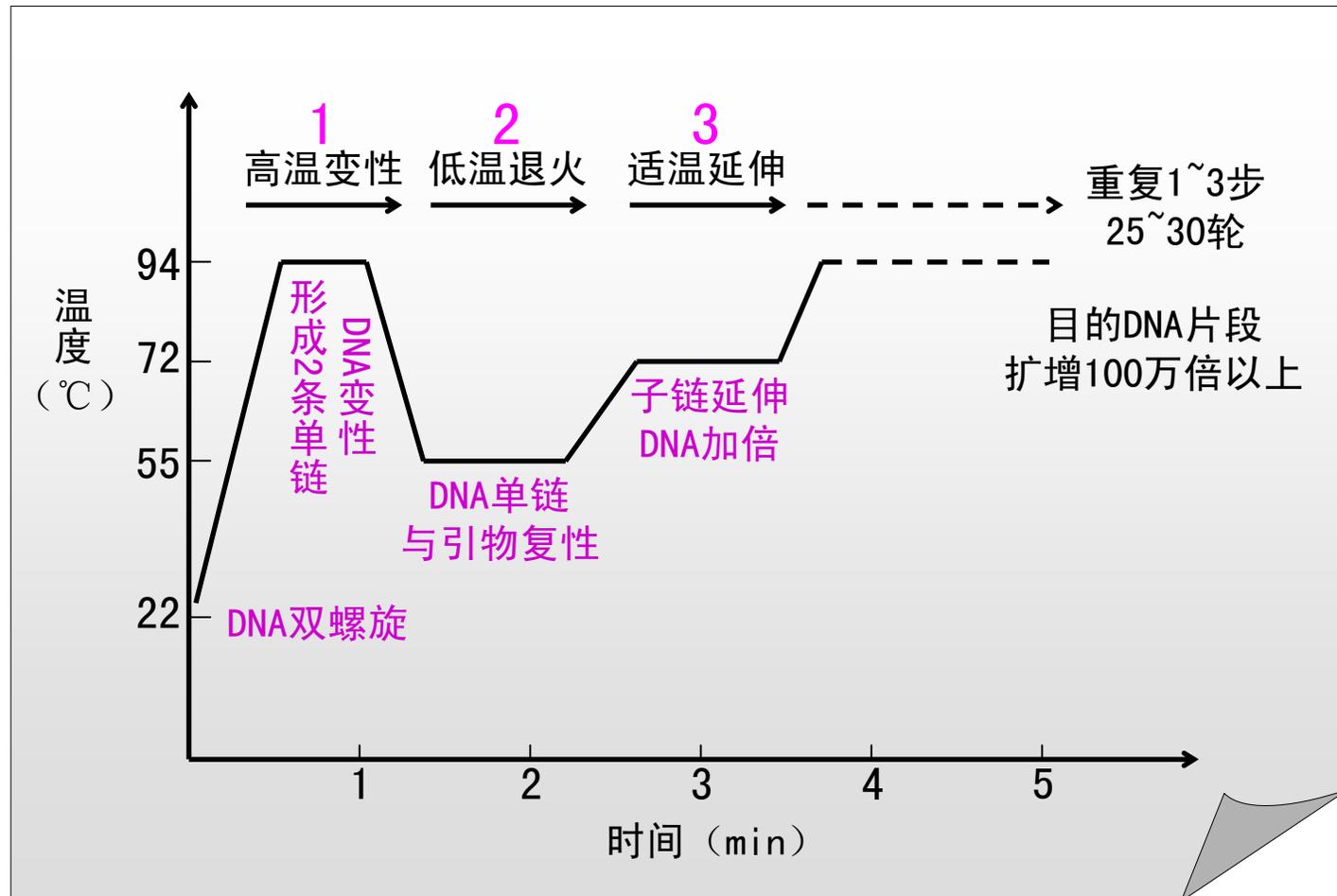
标准的PCR反应体系

4种dNTP混合物	各200 μ mol/L
引物	各10~100 μ mol
模板DNA	0.1~2 μ g
Taq DNA聚合酶	2.5u
Mg ²⁺	1.5mmol/L



PCR的基本原理

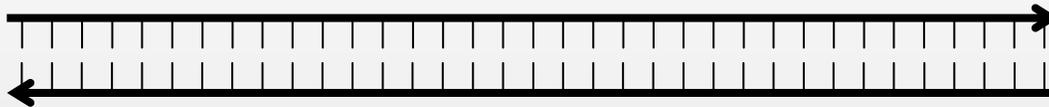
- PCR反应条件
- PCR过程
- PCR的特点



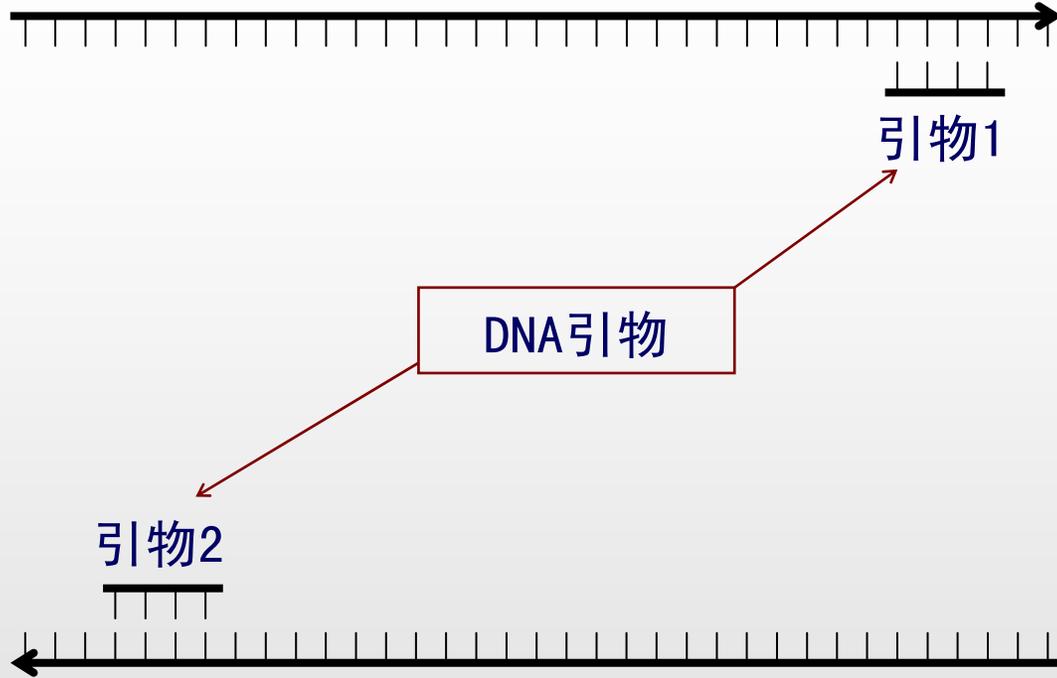
95 °C



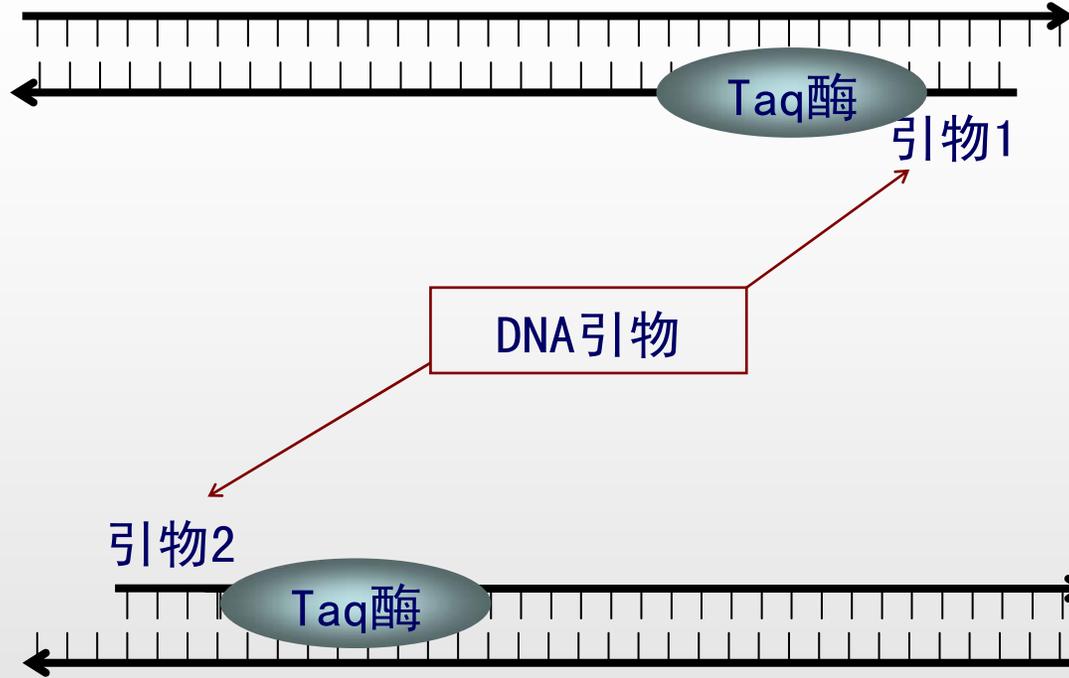
模板DNA



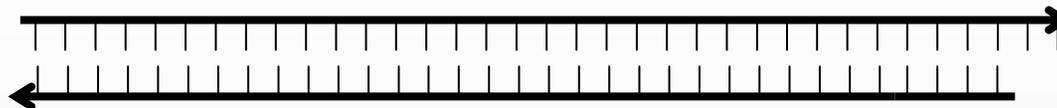
96°C



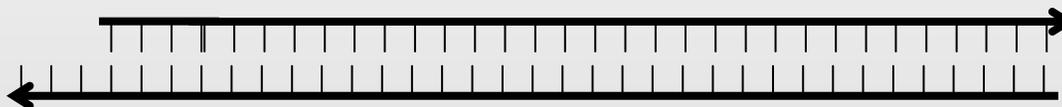
50°C

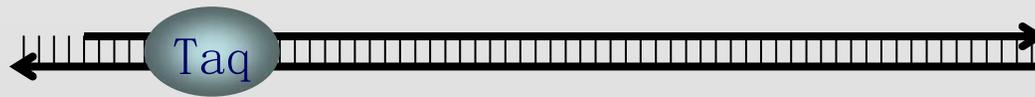
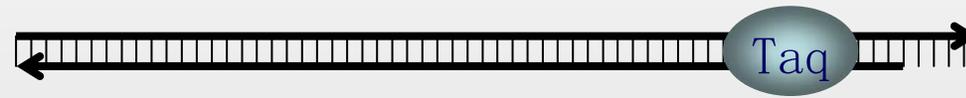
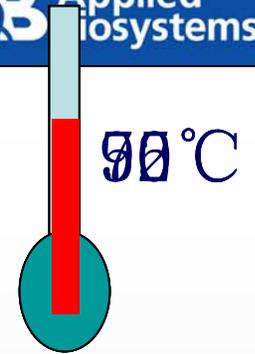
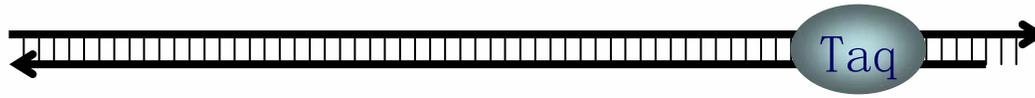


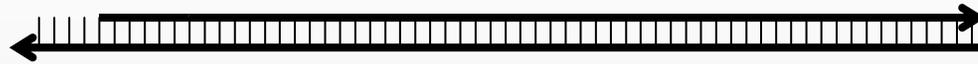
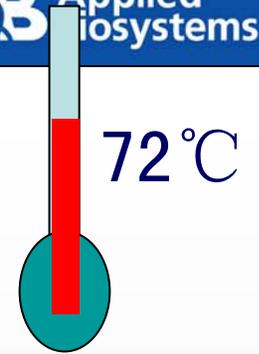
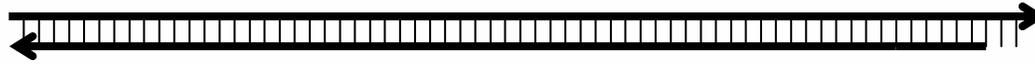
95°C



第1轮结束
第2轮开始







第2轮结束



第1轮扩增

第2轮扩增

第3轮扩增

第4轮扩增 第5轮扩增

第6轮扩增

PCR的基本原理

- PCR反应条件
- PCR过程
- ➔ PCR的特点

- **灵敏度高**

1. 皮克 ($\text{pg}=10^{-12}$) 量级扩增到微克 ($\text{ug}=10^{-6}$) 水平
2. 能从100万个细胞中检出一个靶细胞
3. 病毒检测的灵敏度可达3个RFU
4. 细菌检测的最小检出率为3个细菌

- **简便、快速**

1. 一次性加好反应液，2~4 小时完成扩增
2. 扩增产物一般用电泳分析

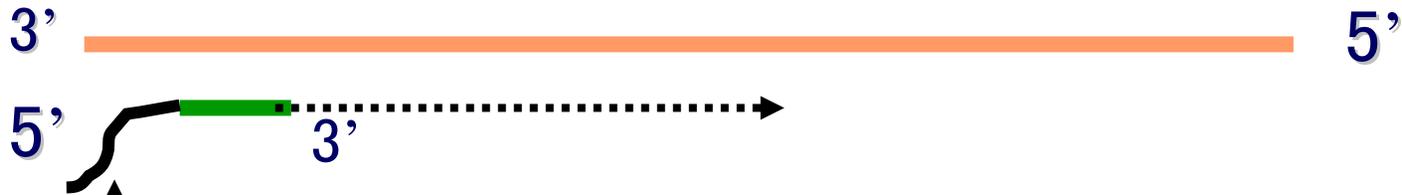
- **对标本的纯度要求低**

- ◆ 血液、体腔液、洗嗽液、毛发、细胞、活组织等组织的粗提DNA

引物设计:

- (1) 序列应位于高度保守区，与非扩增区无同源序列。
- (2) 引物长度以15-40 bp为宜。
- (3) 碱基尽可能随机分布，G+C占50-60%。
- (4) 引物内部避免形成二级结构。
- (5) 两引物间避免有互补序列。
- (6) 引物3'端为关键碱基；5'端无严格限制。





限制性内切酶的识别序列

启动子序列

定点突变

探针标记

PCR反应条件

1) PCR反应成分

(1) 模板

单、双链DNA均可。

不能混有蛋白酶、核酸酶、DNA聚合酶抑制剂、DNA结合蛋白类。

一般100ng DNA模板/100 μ L。

模板浓度过高会导致反应的非特异性增加。

(2) 引物浓度

0.1–0.5 $\mu\text{mol/L}$

浓度过高易导致模板与引物错配, 反应特异性下降。

(3) Taq_DNA聚合酶 (thermus aquaticus)

0.5–2.5 U/50 μl

酶量增加使反应特异性下降; 酶量过少影响反应产量。

(4) dNTP

dNTP浓度取决于扩增片段的长度

四种dNTP浓度应相等

浓度过高易产生错误碱基的掺入，浓度过低则降低反应产量

dNTP可与 Mg^{2+} 结合，使游离的 Mg^{2+} 浓度下降，影响DNA聚合酶的活性。

(5) Mg^{2+}

Mg^{2+} 是DNA聚合酶的激活剂。

0.5mmol/L-2.5mmol/L反应体系。

Mg^{2+} 浓度过低会使Taq酶活性丧失、PCR产量下降； Mg^{2+} 过高影响反应特异性。

Mg^{2+} 可与负离子结合，所以反应体系中dNTP、EDTA等的浓度影响反应中游离的 Mg^{2+} 浓度。

2) 循环参数

(1) 变性

使双链DNA解链为单链

95°C 20-30秒

(2) 退火

温度由引物长度和GC含量决定。

增加温度能减少引物与模板的非特异性结合；降低温度可增加反应的灵敏性。

(3) 延伸

70–75°C,

延伸时间由扩增片段长度决定

(4) 循环次数

主要取决于模版DNA的浓度

一般为25–35次

次数过多：扩增效率降低

错误掺入率增加

PCR的类型和应用

- 研究
 - 基因克隆，DNA测序，分析突变
- 诊断
 - 细菌、病毒、寄生虫检测，诊断
- 人类基因组工程
 - 遗传图谱的构建，DNA测序，表达图谱
- 法医
 - 犯罪现场标本分析
- 肿瘤
 - 各种肿瘤检测
- 其他.....

1) 不对称PCR

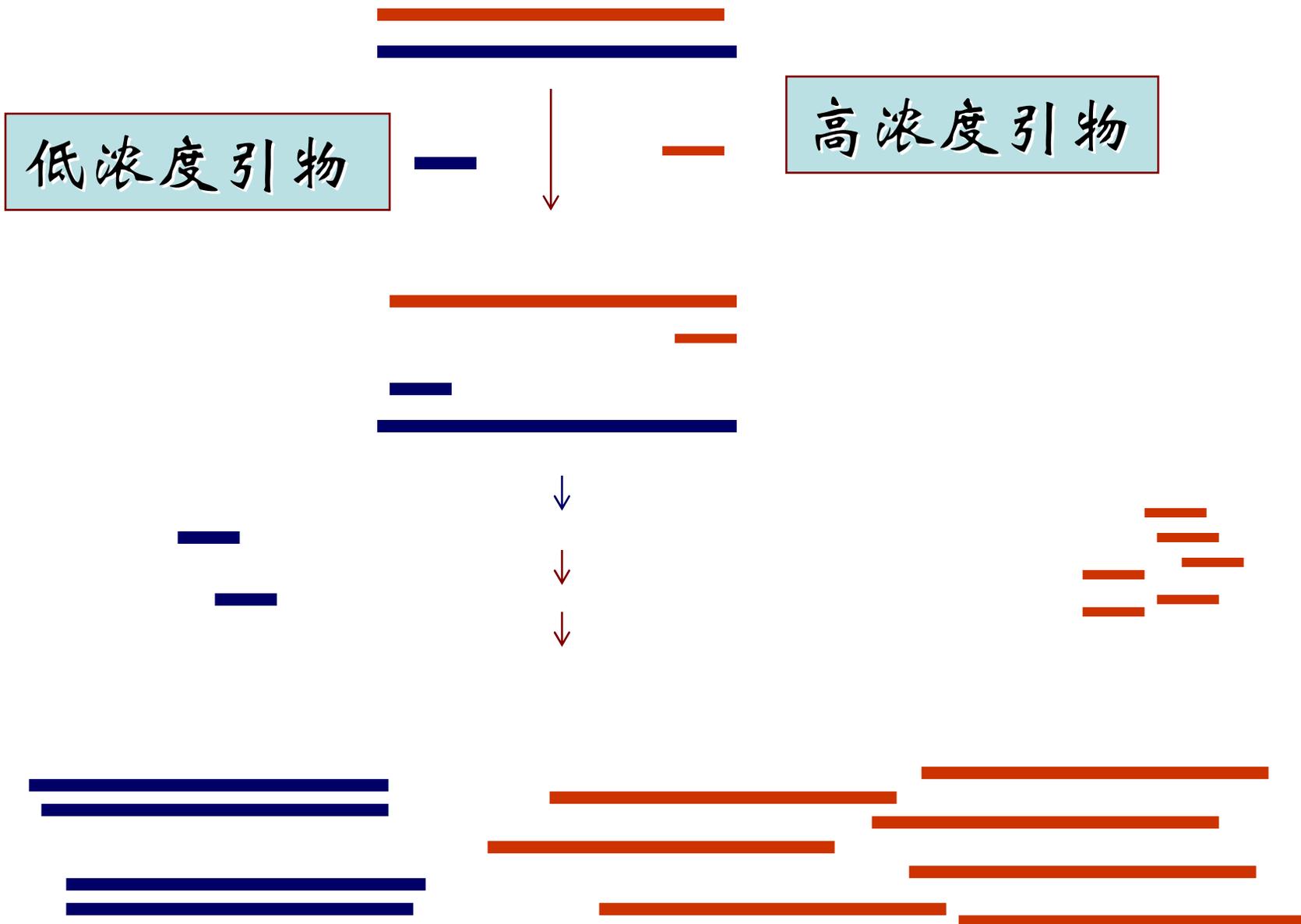
目的：扩增产生特异长度的单链DNA。

方法：采用两种不同浓度的引物。分别称为限制性引物和非限制性引物，其最佳比例一般是 $0.01 : 0.5 \mu\text{M}$ ，关键是限制性引物的绝对量。

用途：制备核酸序列测定的模板

制备杂交探针

基因组DNA结构功能的研究



2) 反向PCR (reverse PCR)

是用反向的互补引物来扩增两引物以外的DNA片段对某个已知DNA片段两侧的未知序列进行扩增。

可对未知序列扩增后进行分析, 如探索邻接已知DNA片段的序列; 用于仅知部分序列的全长cDNA的克隆, 扩增基因文库的插入DNA; 建立基因组步移文库。

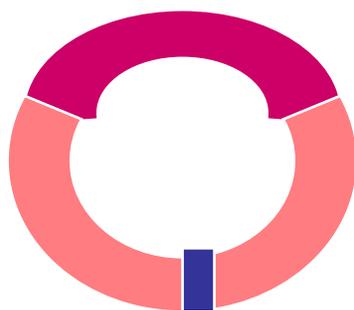




连接酶

连接酶

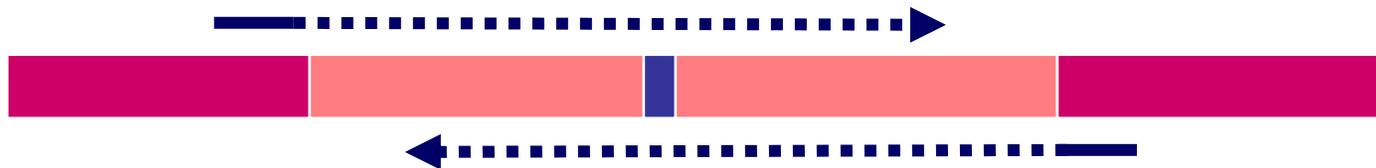
A downward-pointing arrow with a hollow interior, indicating the action of the enzyme.



连接酶

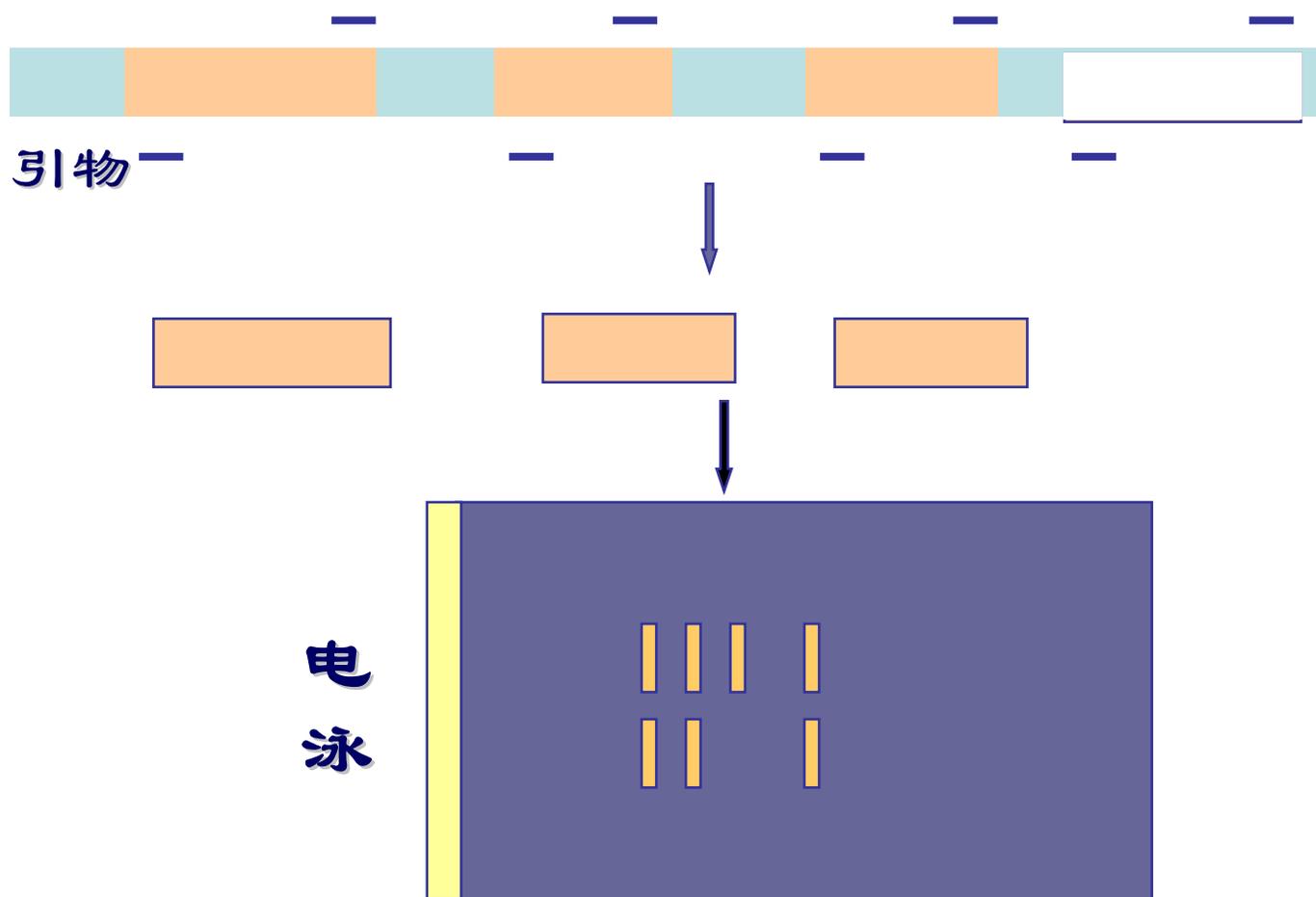
连接酶

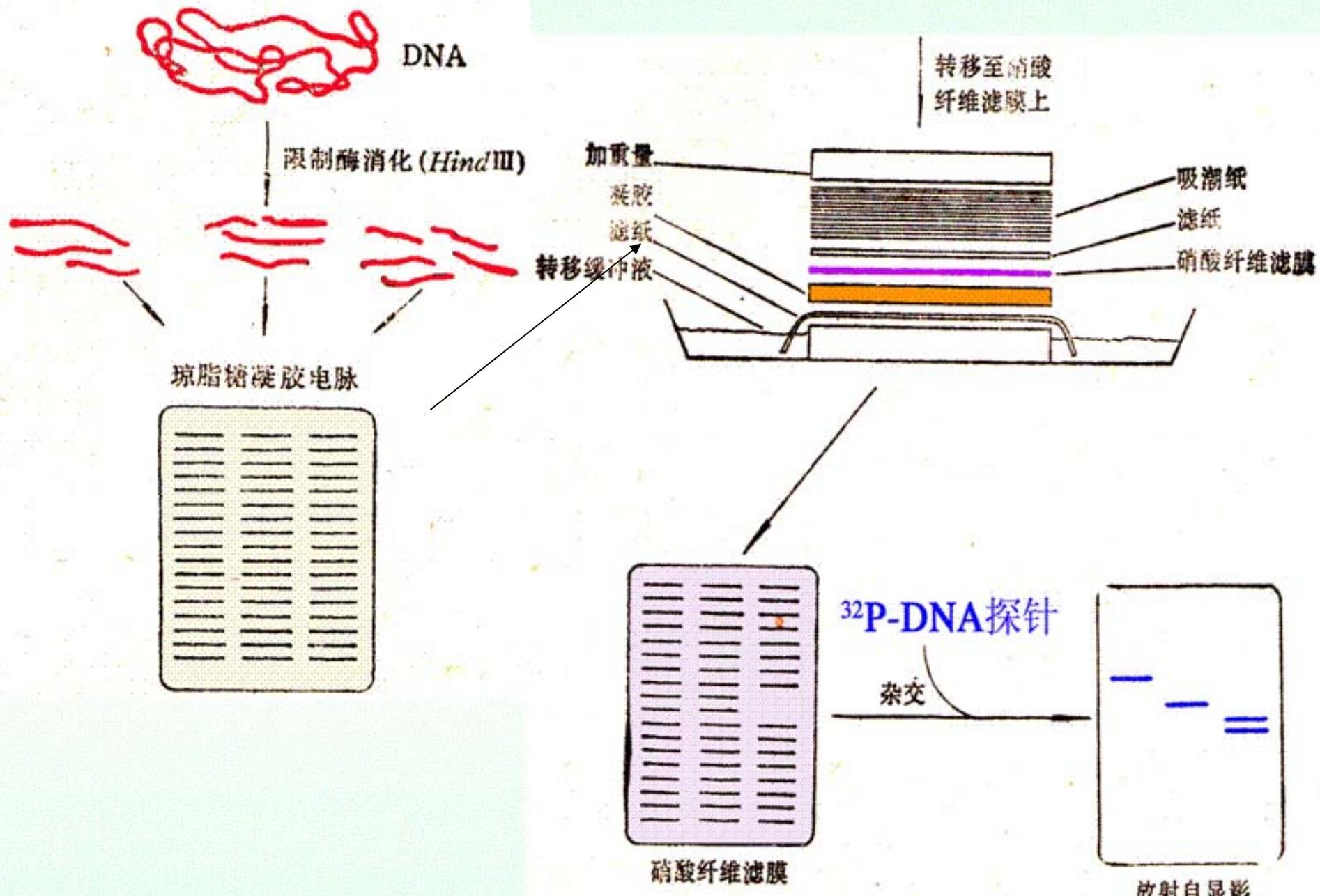
A downward-pointing arrow with a hollow interior, indicating the action of the enzyme.



3) 多重PCR

用于检测特定基因序列的存在或缺失。





4) LP-PCR (Labelled primers)

利用同位素、荧光素等对 PCR 引物进行标记，用以直观地检测目的基因。

特别适合大量临床标本的基因诊断

可同时检测多种基因成分



病毒1



病毒2



病毒 3



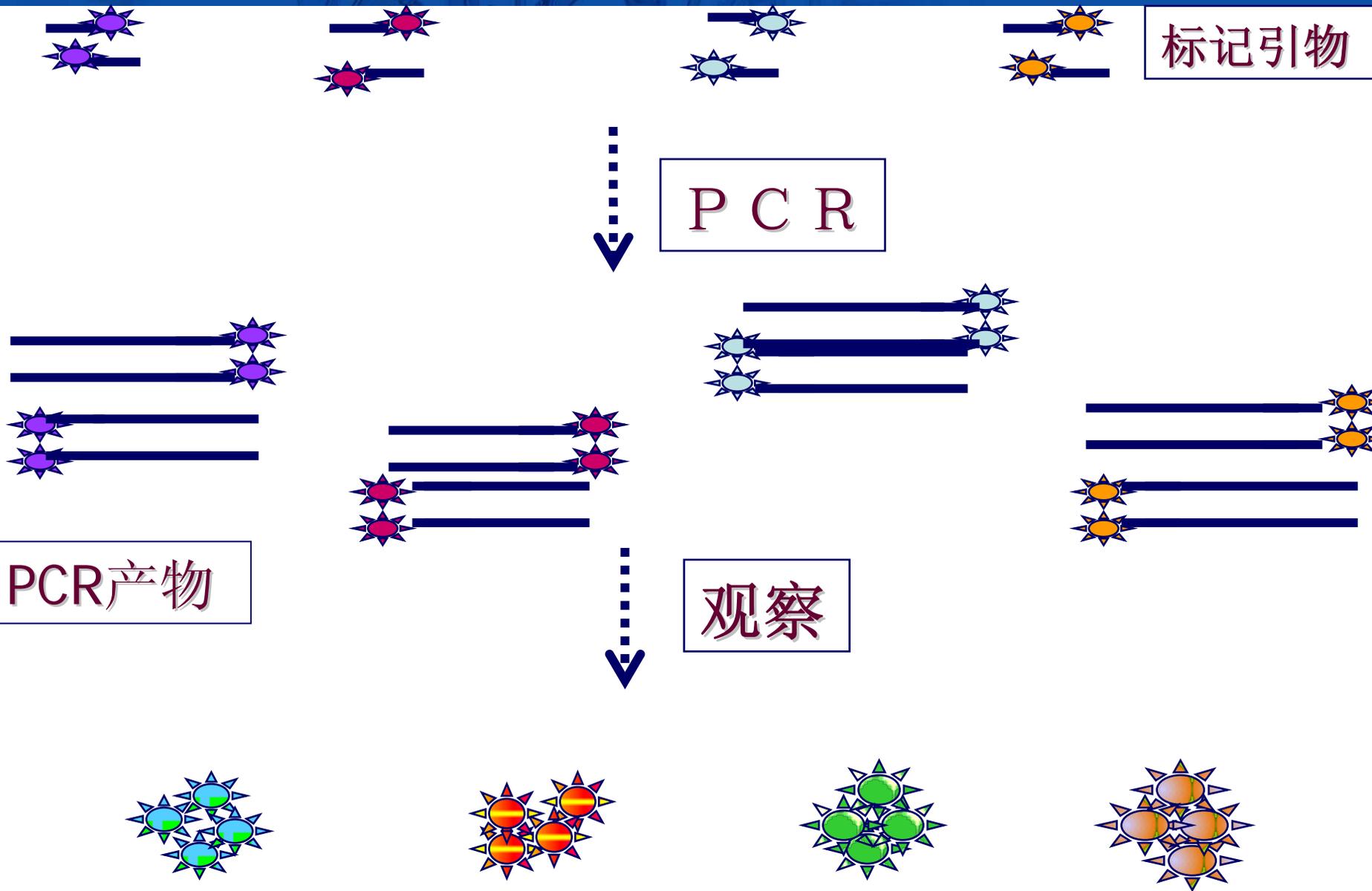
病毒4

标记引物

PCR

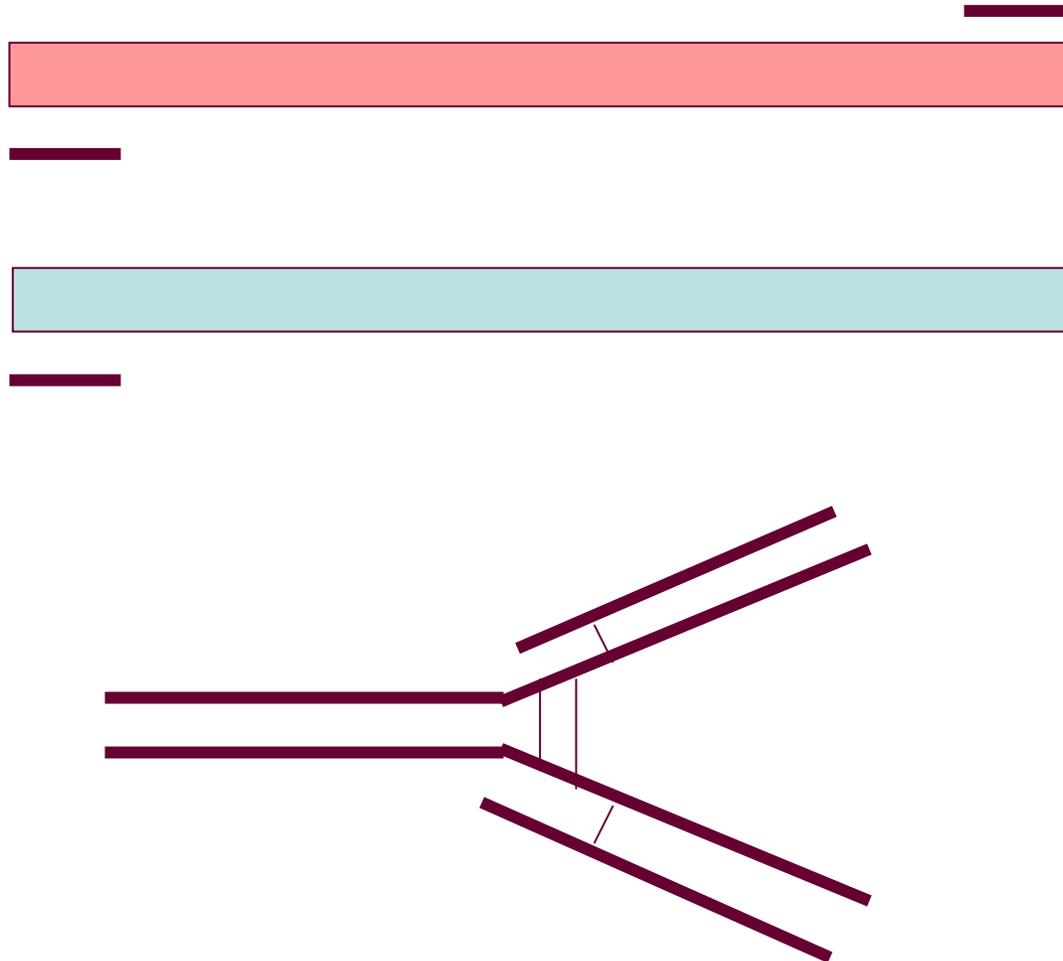
PCR产物

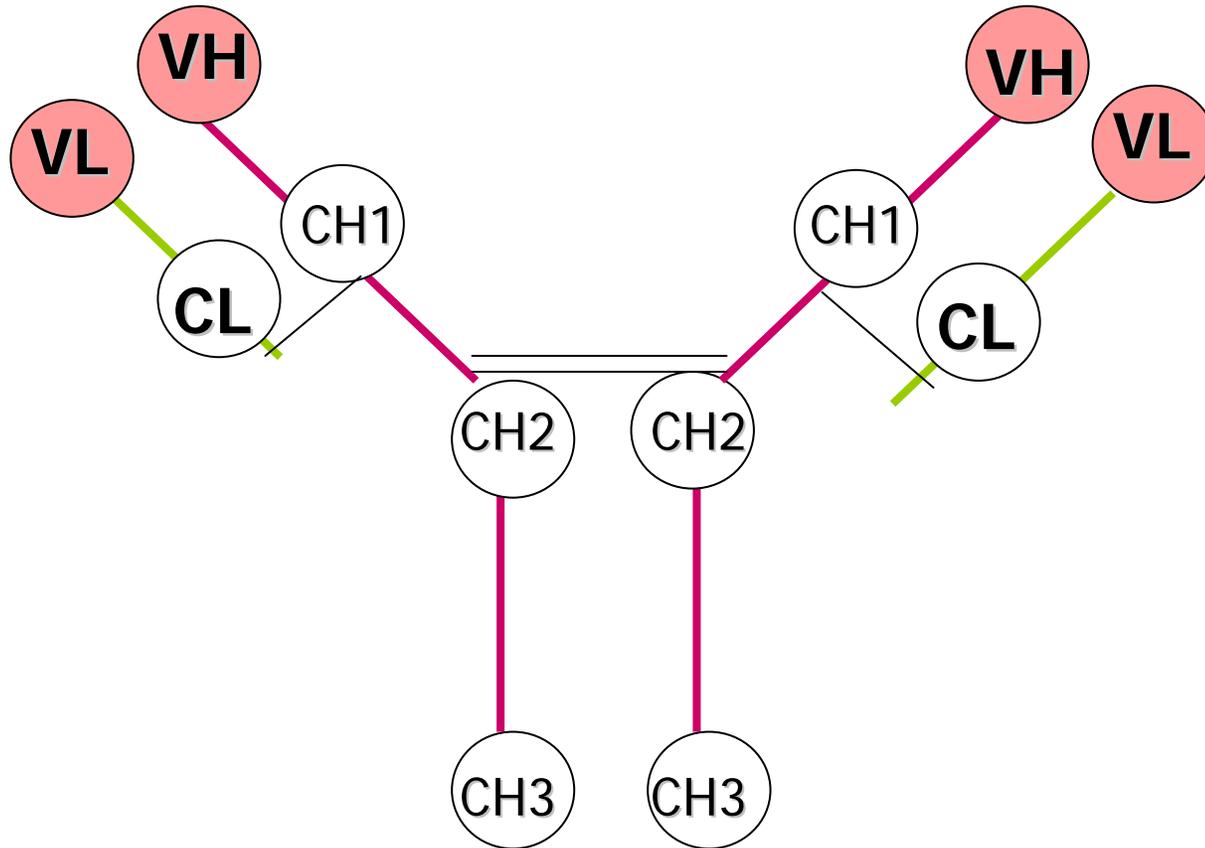
观察

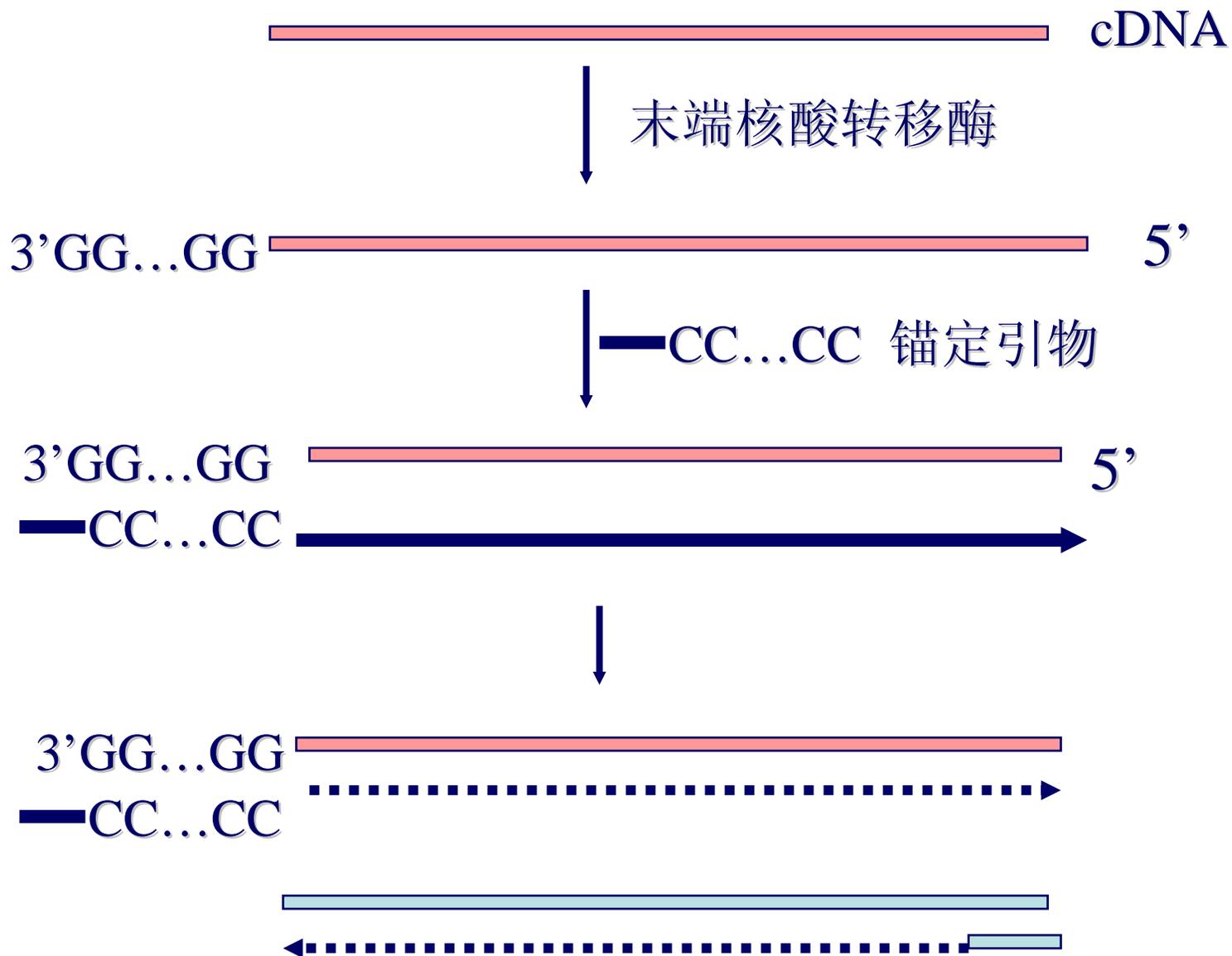


5) 锚式PCR

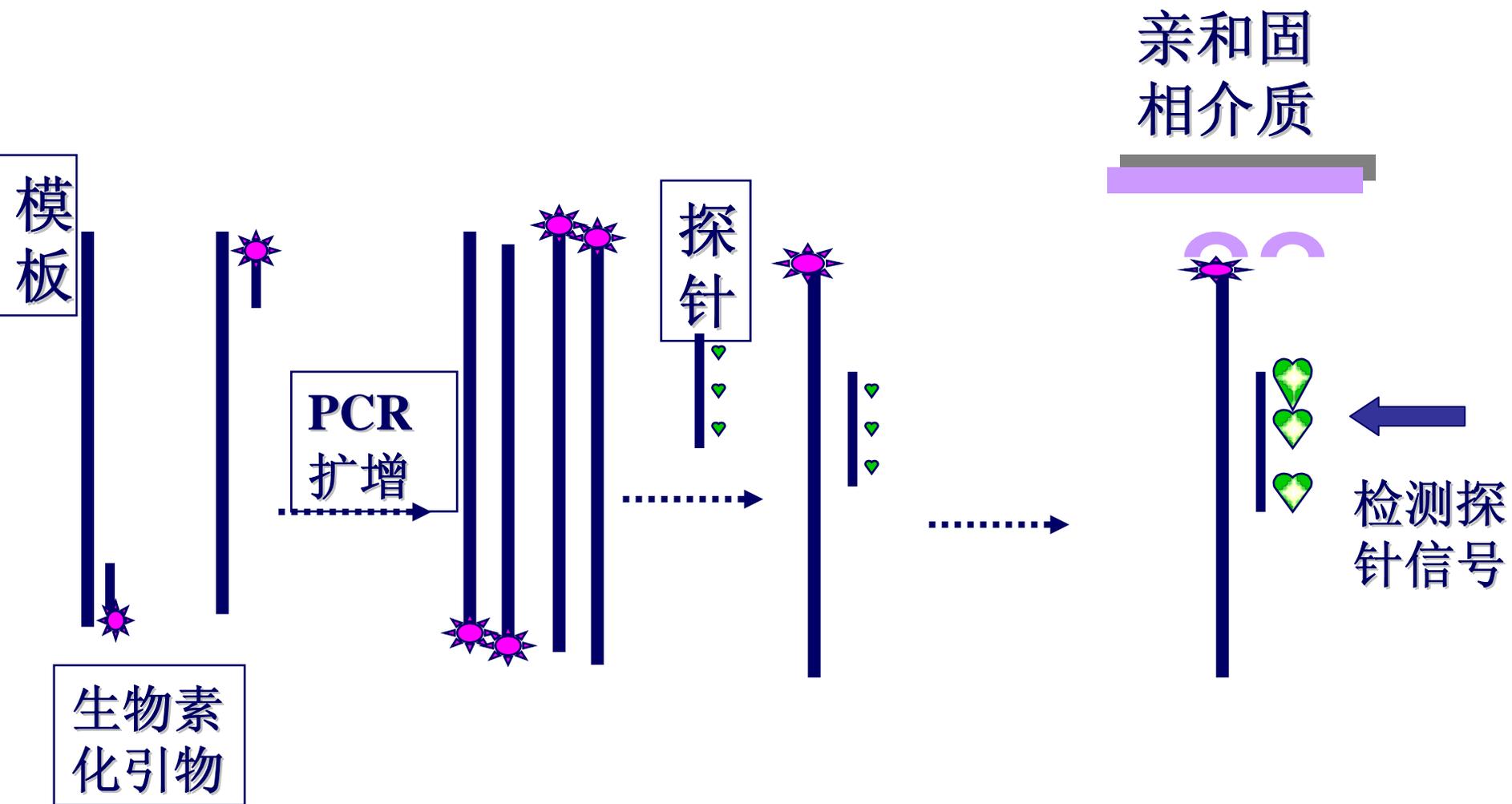
已知靶基因片段一侧的序列







6) PCR固相分析法



7) 原位 P C R

原位聚合酶链式反应（In Still PCR, Is-PCR）是由Haase等于1990年首创。它是利用完整的细胞作为一个微小的反应体系来扩增细胞内的目的片段，在不破坏细胞的前提下，利用一些特定的检测手段来检测细胞内的扩增产物。

直接用细胞涂片或石蜡包埋组织切片在单个细胞中进行 P C R 扩增。可进行细胞内定位。

适用于检测病理切片中含量较少的靶序列

原位PCR的作用

既往鉴定细胞内特异序列一般采用原位杂交（ISH），但在每个细胞中目的片段的拷贝数少于10的情况下，该方法的敏感度就明显下降。而标准的PCR则可扩增出细胞内单拷贝的序列，敏感度很高，但却未能与细胞形态学研究相结合。

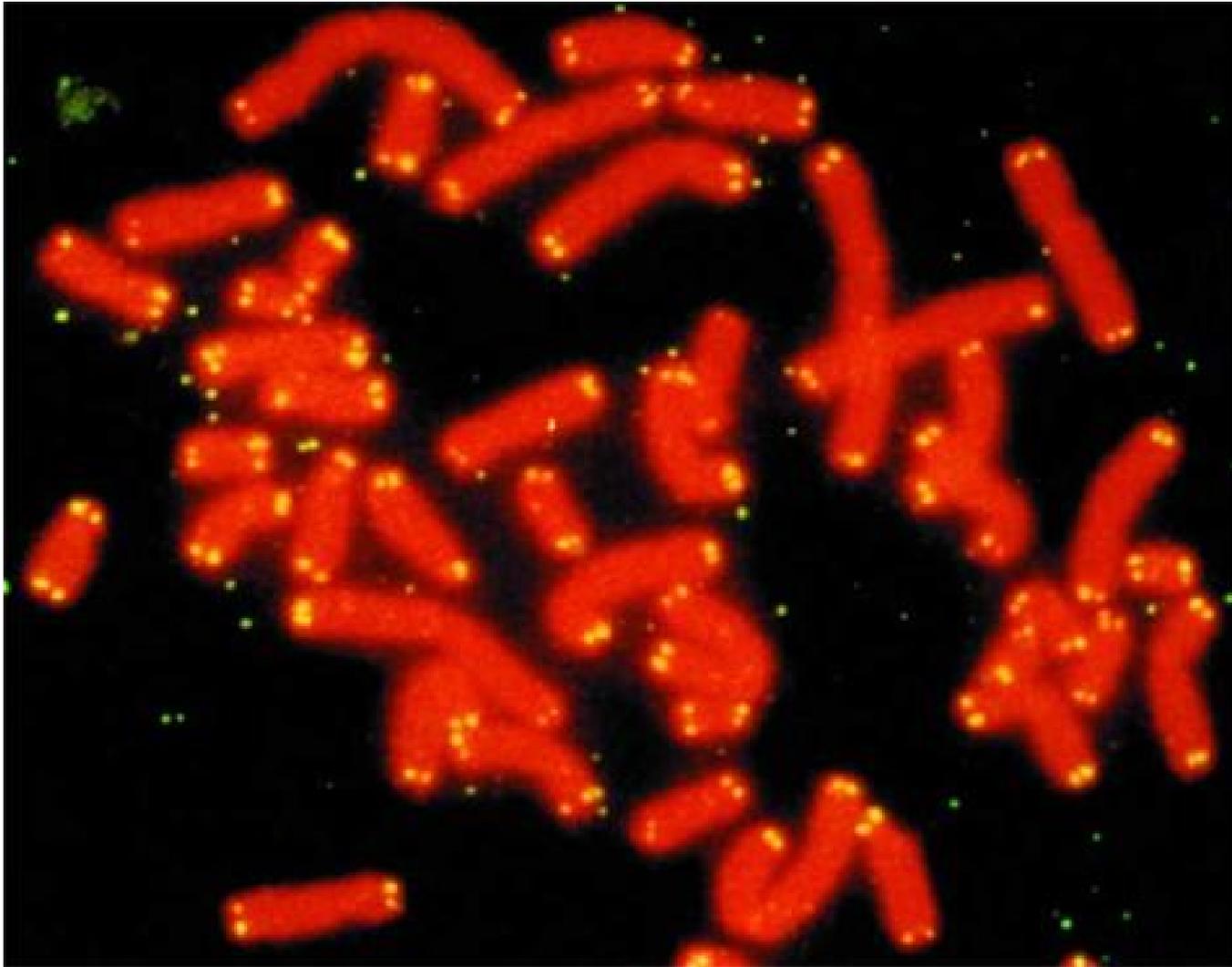
ISPCR则可把这两者结合起来，成为细胞学诊断中一种崭新的检测技术。利用该法可检测细胞内病毒感染、细胞内基因重排、以及分析细胞内RNA表达产物等方面发挥一定作用。在检测细胞的潜在感染方面也具有重要意义。

操作步骤

细胞或组织的固定

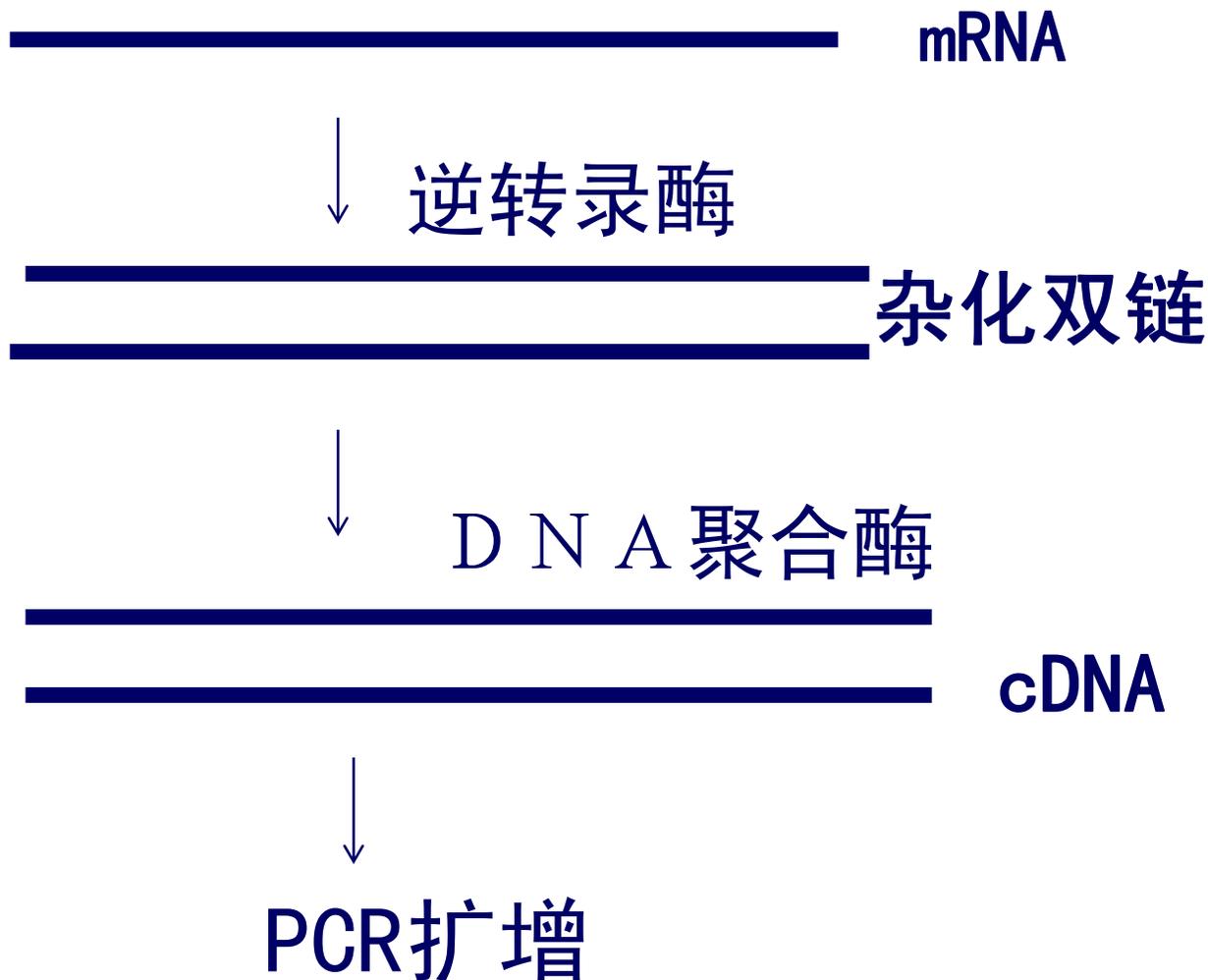
PCR扩增细胞内目的片段

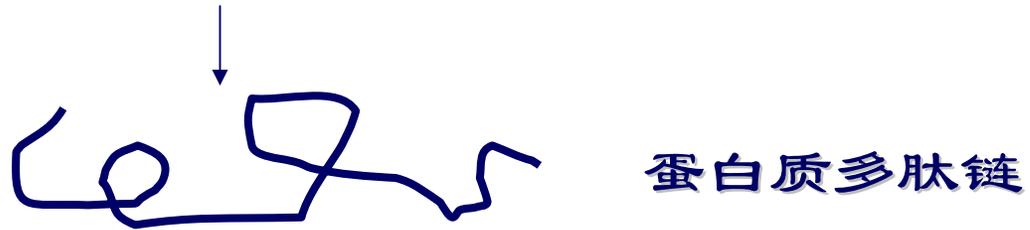
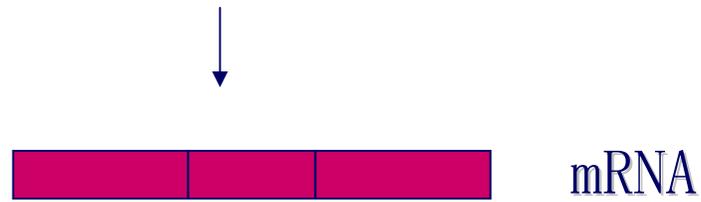
原位杂交检测扩增产物



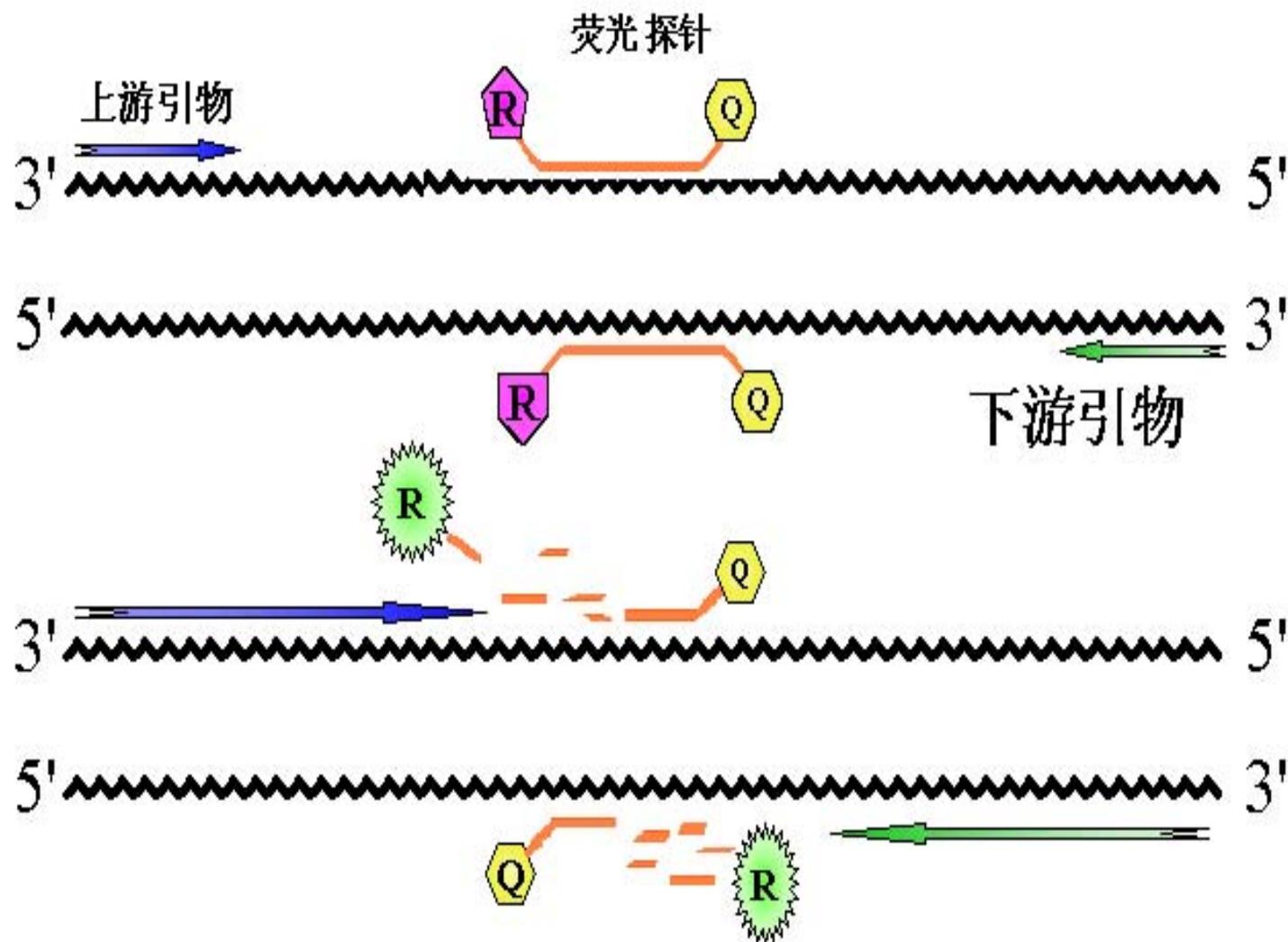
人类染色体端粒DNA的荧光原位杂交照片

8) R T - P C R



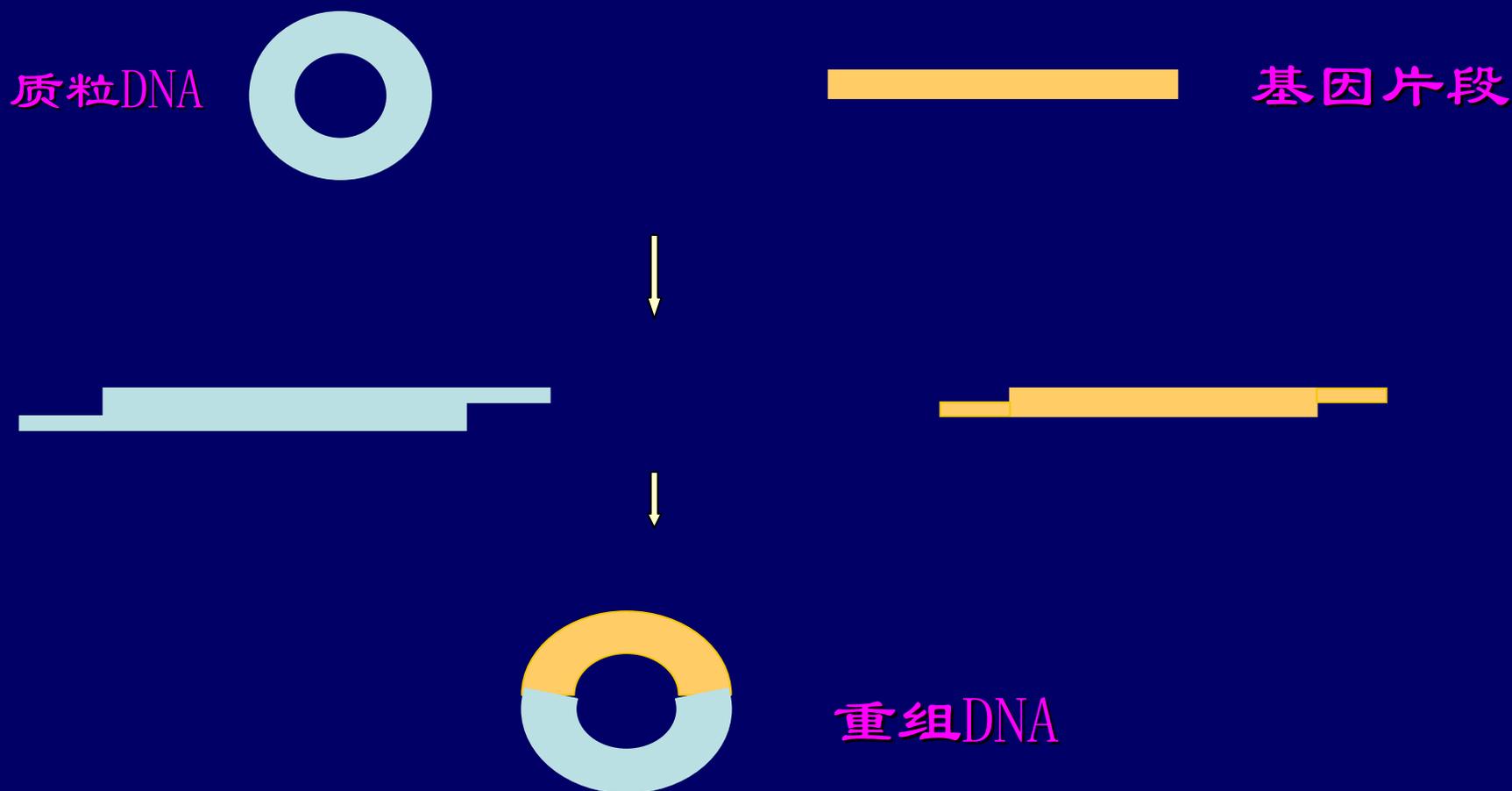


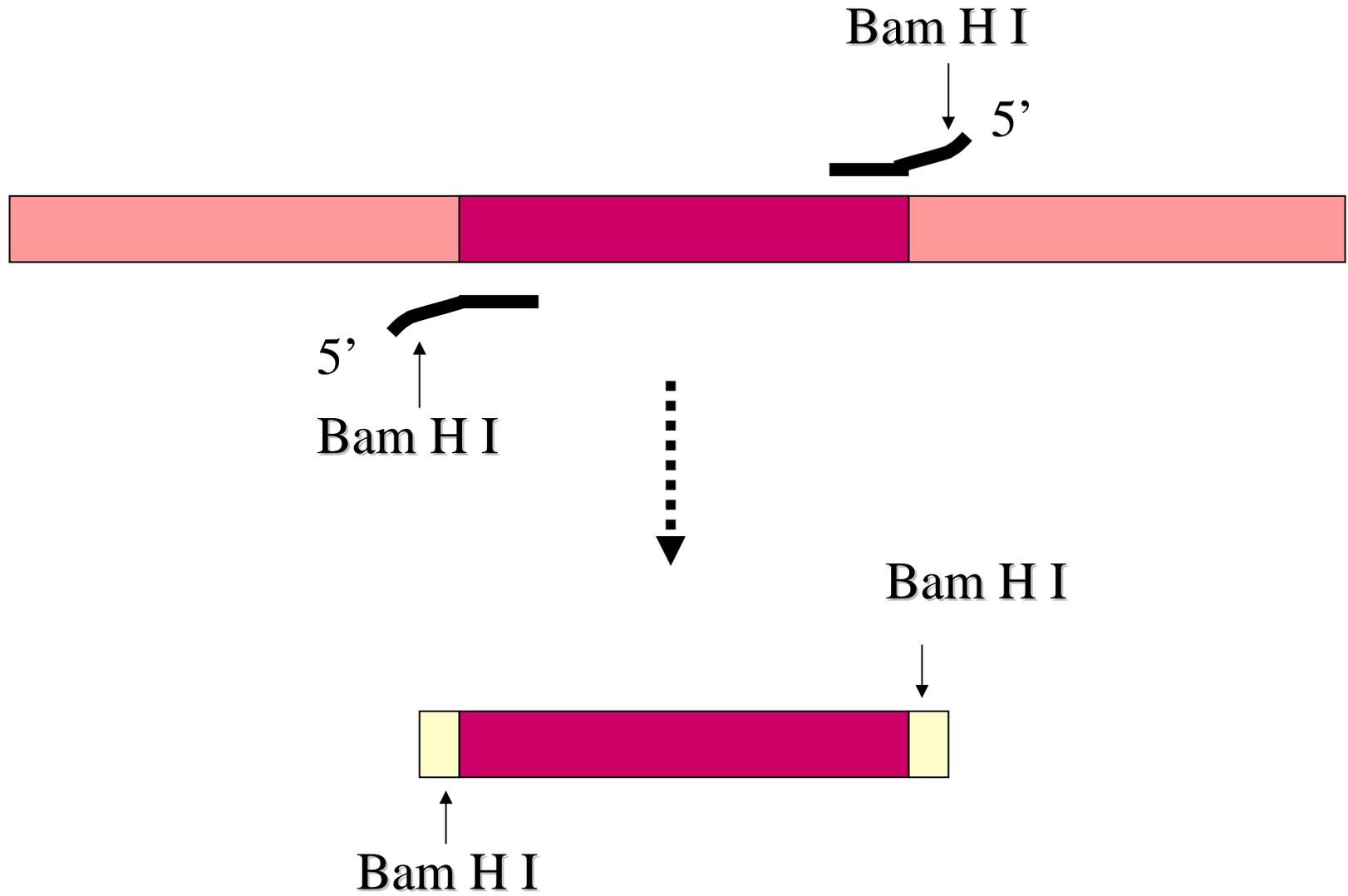
实时PCR技术原理

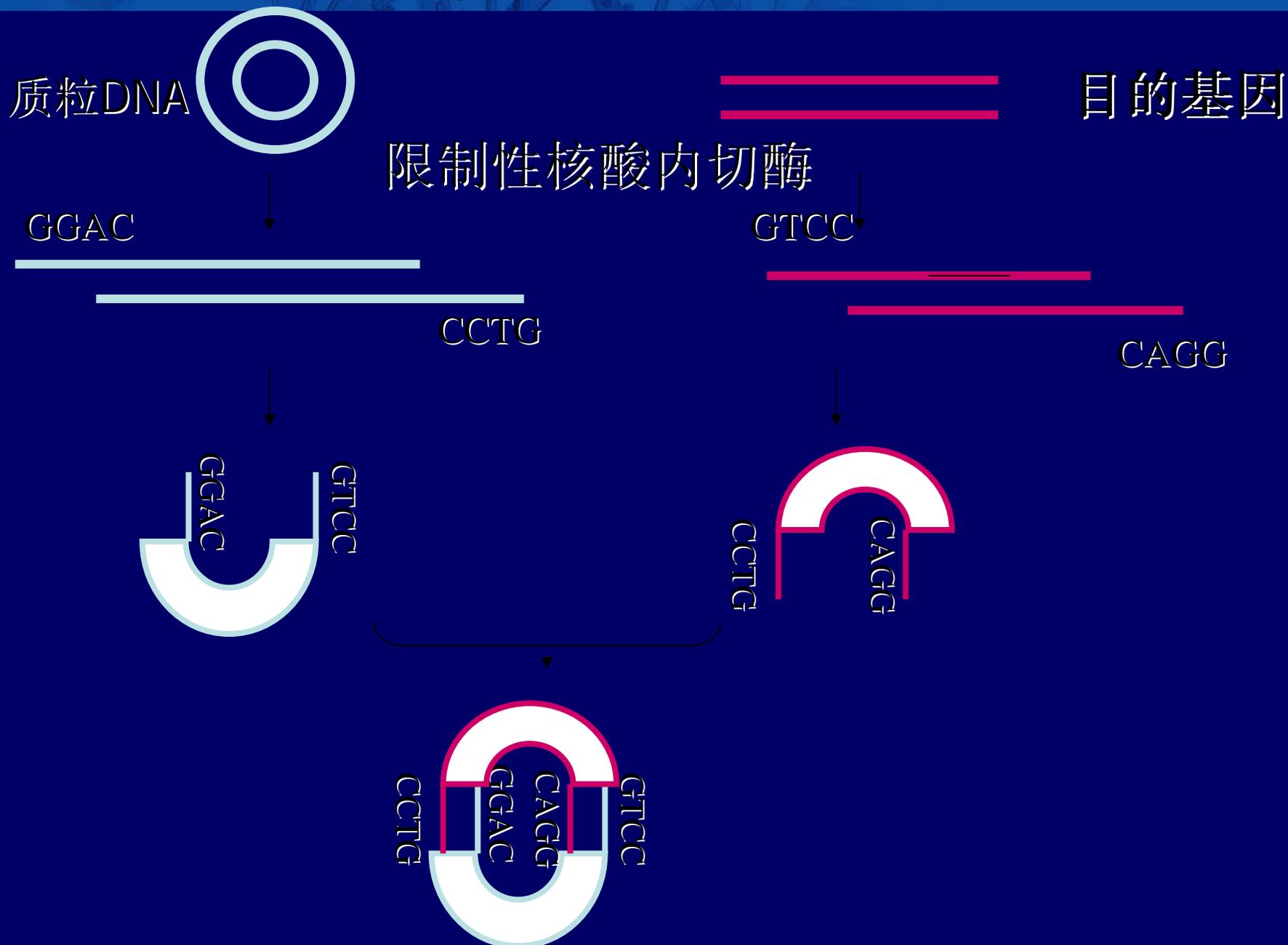


PCR技术的应用

1) 基因克隆

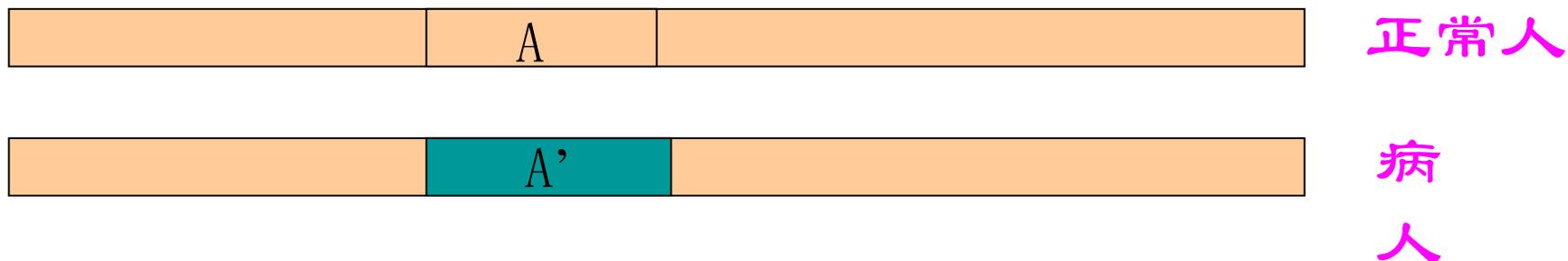




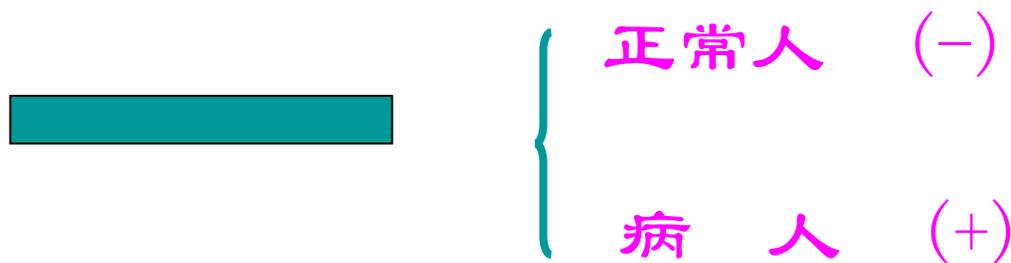


2) 基因检测

★ 内源性病变基因



★ 病原微生物基因



遗传病的诊断

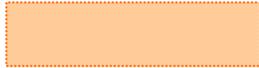
地中海贫血

基因缺失、插入或置换等



珠蛋白链合成不平衡

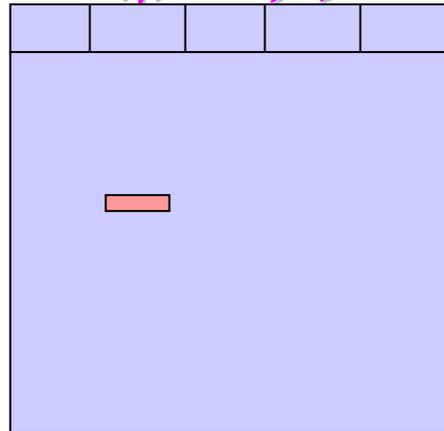
正常人



病人



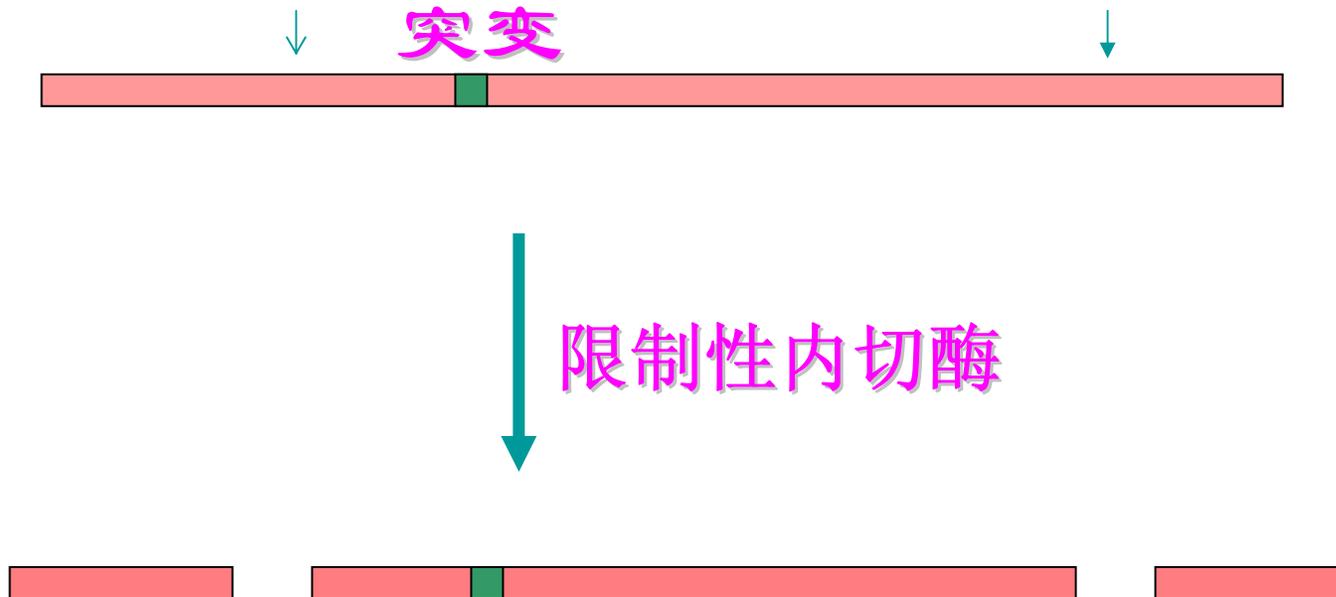
正常 病人



恶性肿瘤（癌基因或抑癌基因）

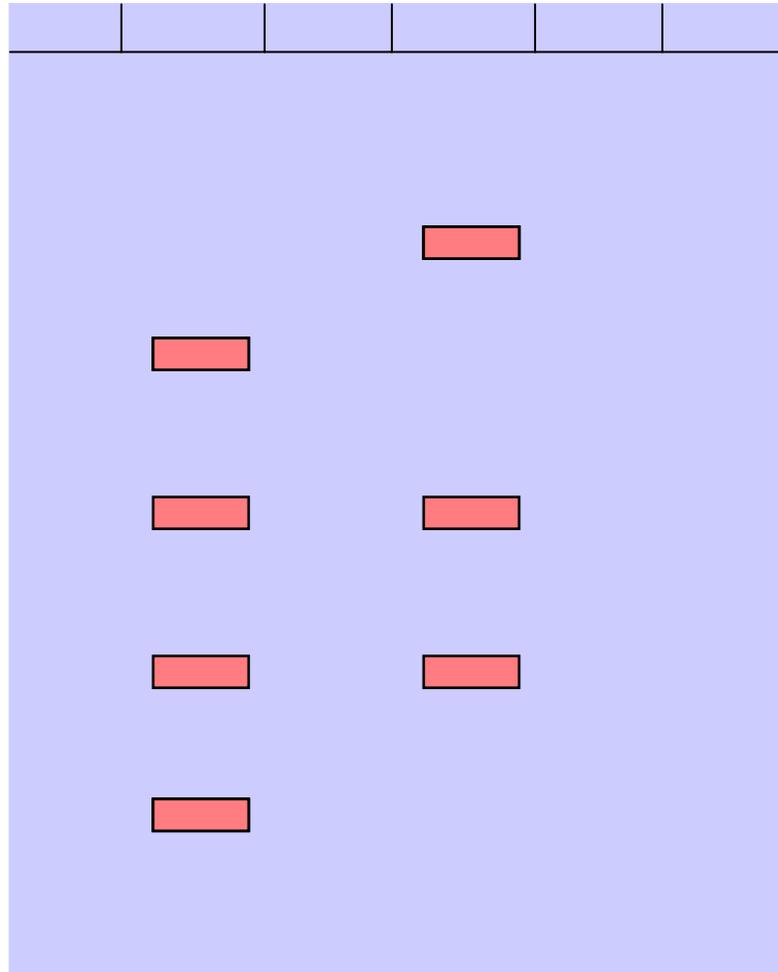
PCR-RFLP法：



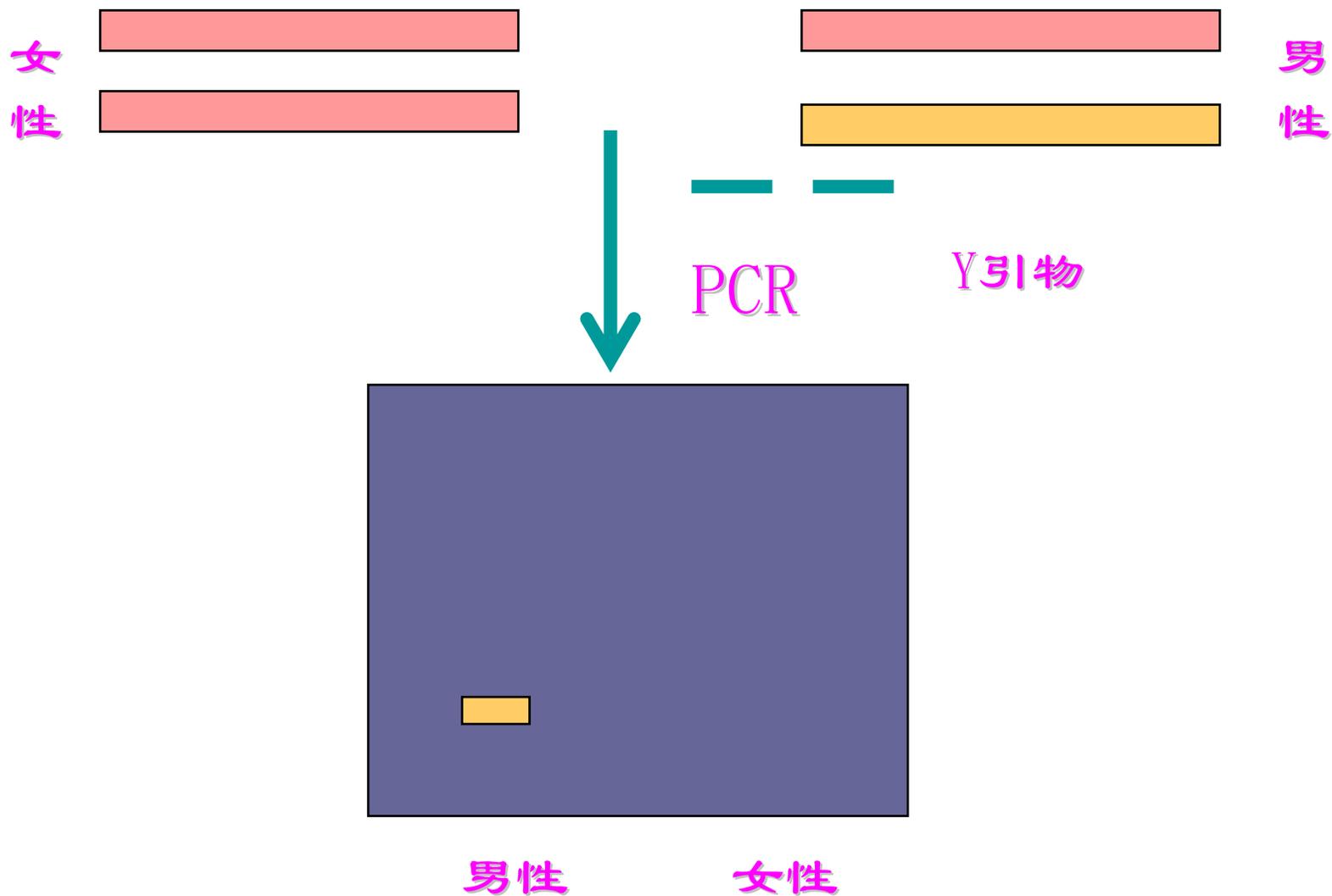


正常 突变

电泳



3) 基因鉴定





ABI Applied
Biosystems

谢谢！

ABI Real-time PCR