



动物检验检疫技术

专业教学资源库

# PCR技术及其应用



# 目 录

- PCR的概念
- PCR技术的创建
- PCR的原理
- PCR的反应体系和方法
- PCR的应用



# 聚合酶链式反应

PCR: Polymerase Chain Reaction

Polymerase: DNA聚合酶



# PCR技术的创建

**Kary B. Mullis**（穆利斯（美））

**Khorana(1971)**等提出在体外经DNA变性，与适当引物杂交，再用DNA聚合酶延伸，克隆DNA的设想。

**1983年**，**Mullis**发明了PCR技术，使Khorana的设想得到实现。

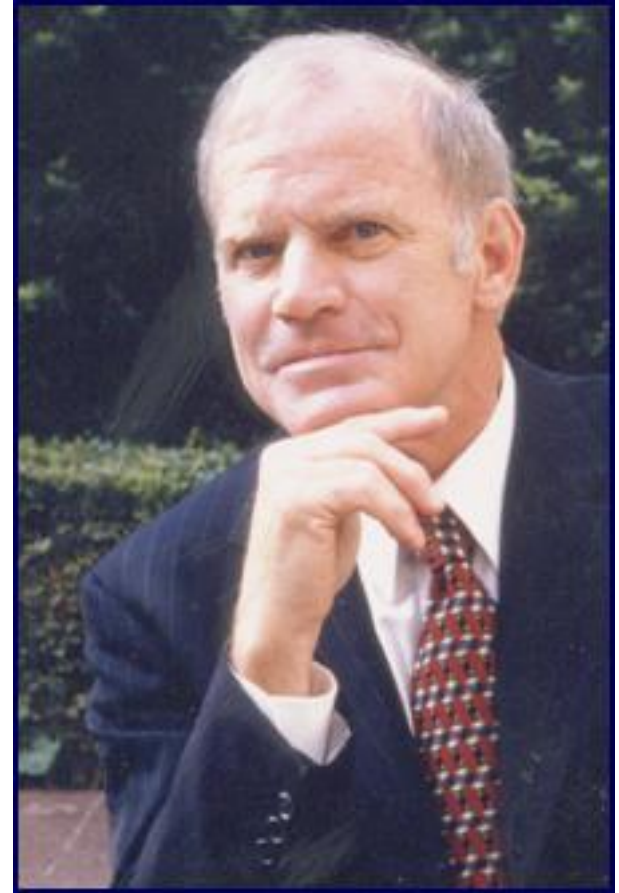
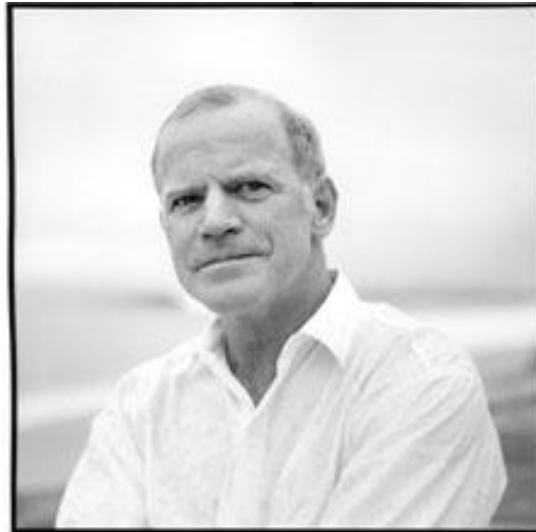
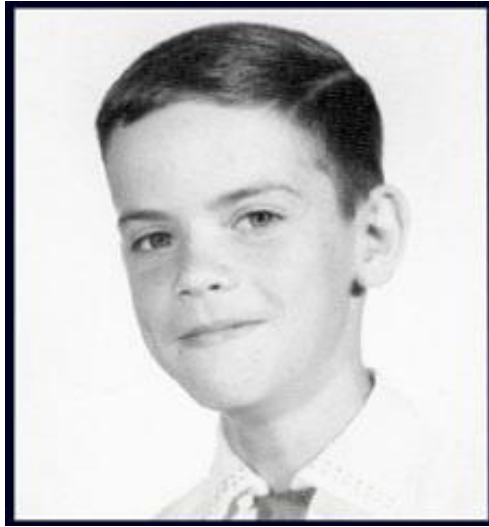
**1988年**耐热DNA聚合酶（**Taq**）引入了PCR技术。

**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。

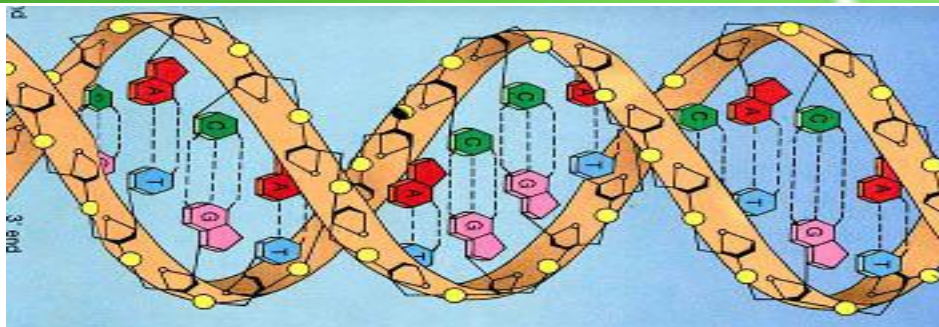


# Kary B. Mullis (1944—)

<http://www.karymullis.com>



本页图片均来自百度搜索



图片来自百度搜索

**94°C变性**

**50-65°C退火**



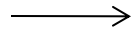
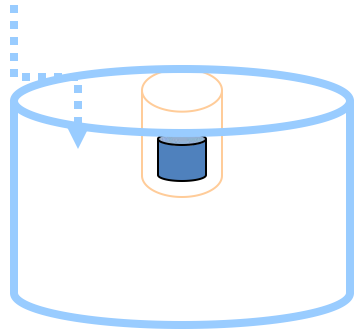
**XX°C延伸**



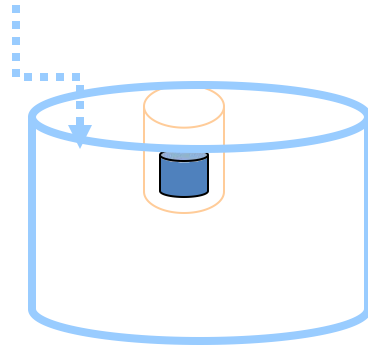




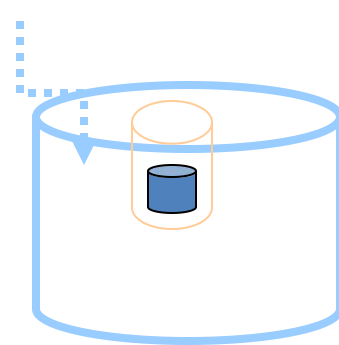
94°C



55°C



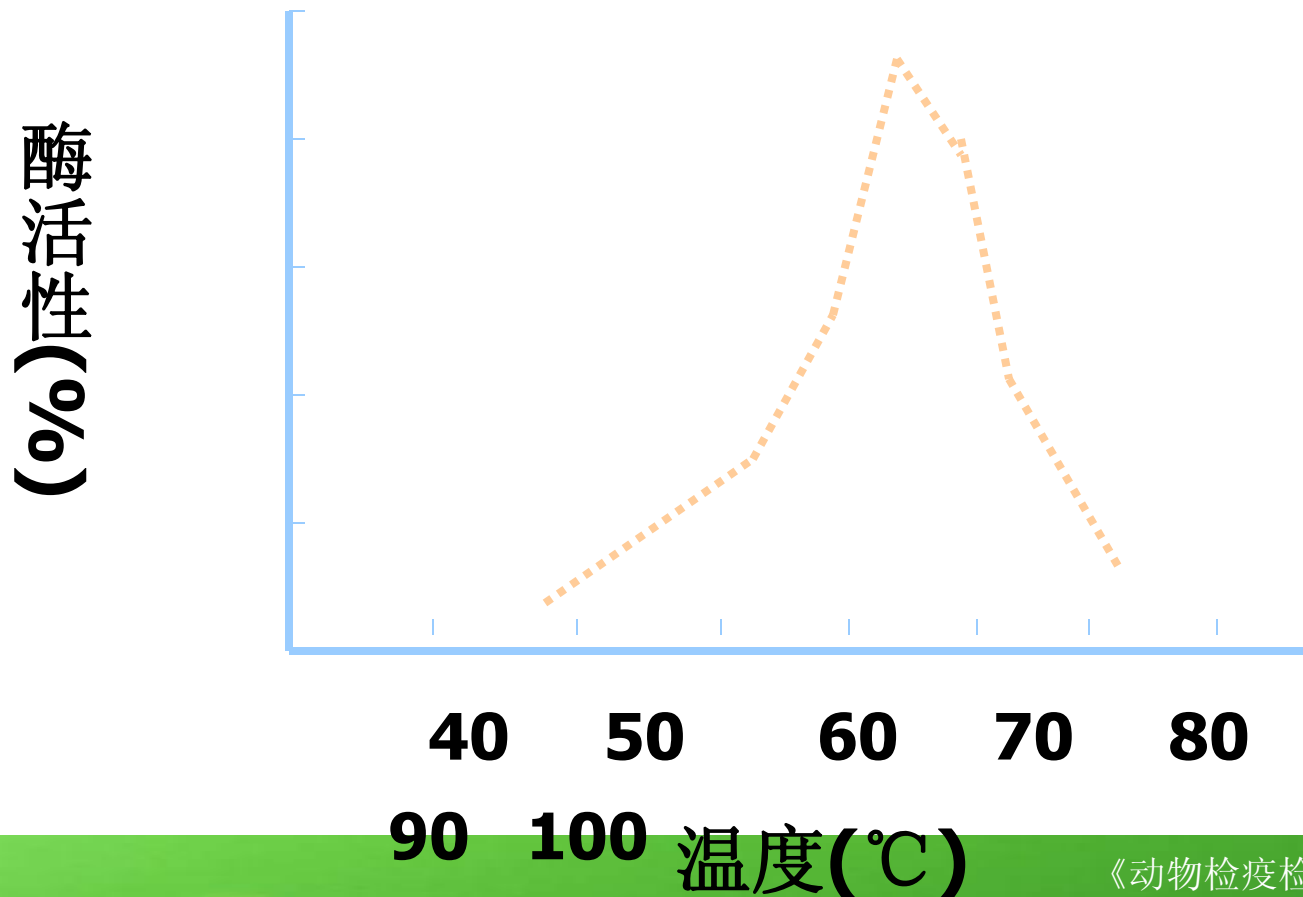
37°C





# 1988年Saiki等将耐热DNA聚合酶 (Taq) 引入了PCR技术

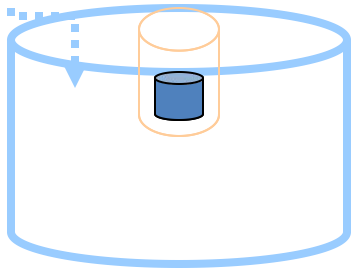
## Taq\_DNA聚合酶 (thermus aquaticus)



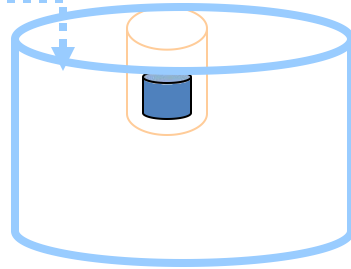




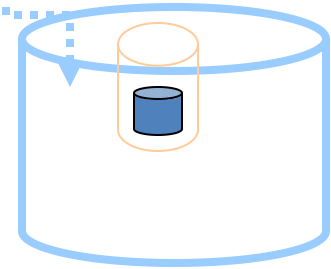
94°C



55°C

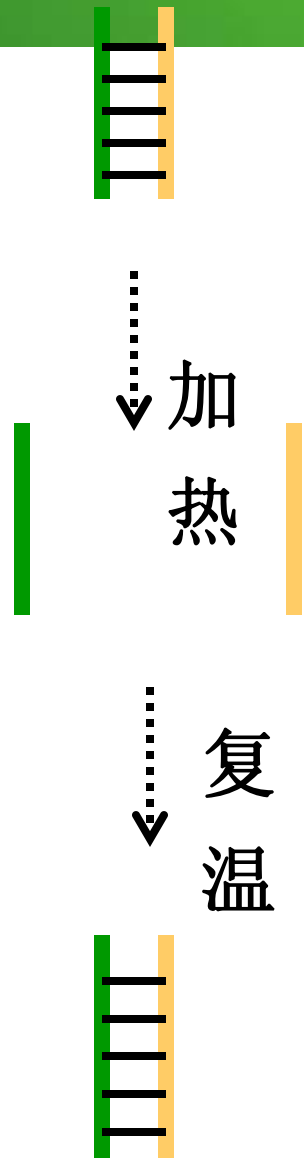


72°C





# PCR技术的原理



**变性**

加热或强酸、碱性作用可以使DNA双螺旋的氢键断裂，双链解离，形成单链DNA，这称为DNA的变性。

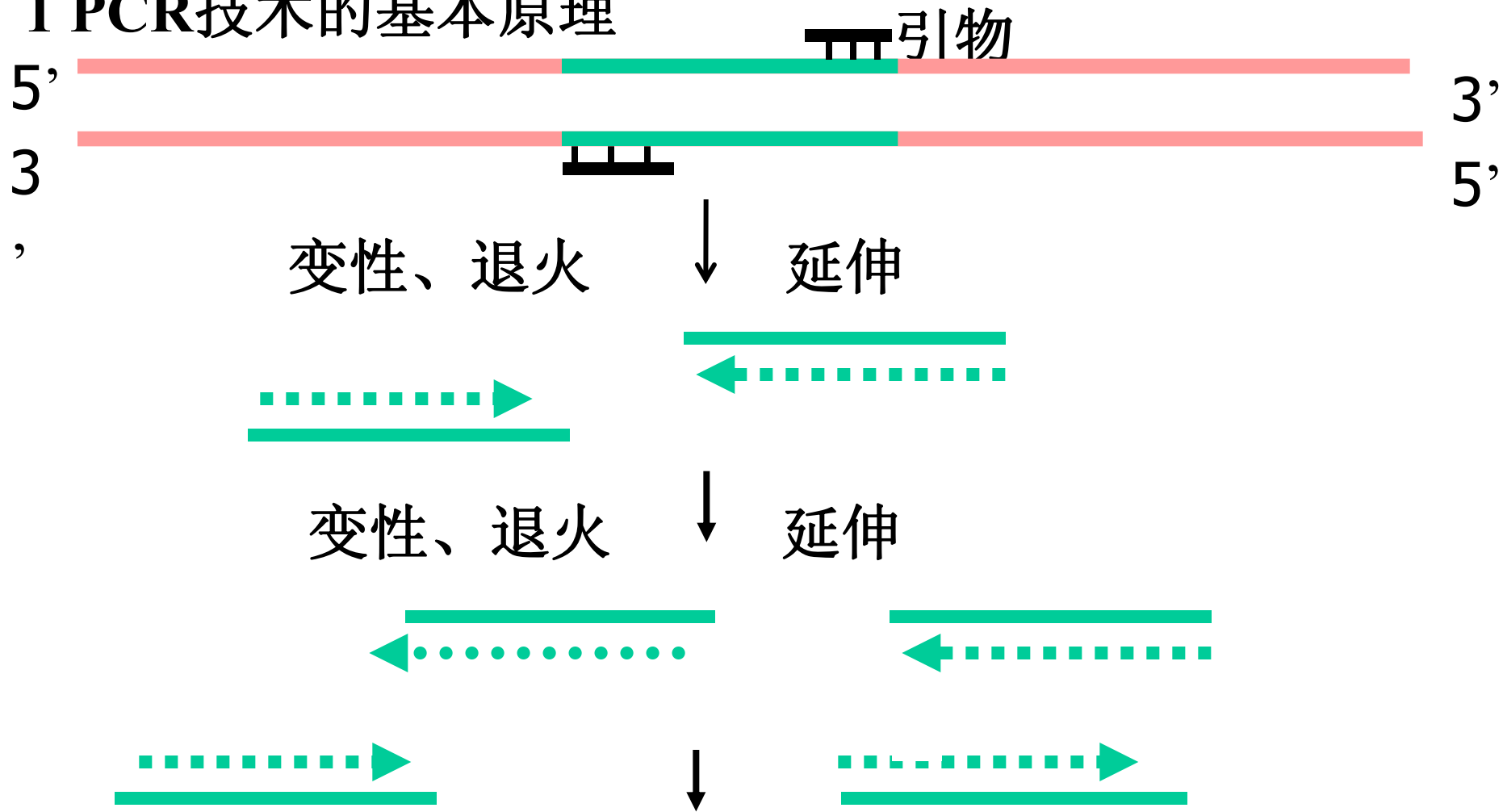
**复性**

解除变性的条件后，变性的单链可以重新结合起来，形成双链，其原有的特性和活性可以恢复，这称DNA复性，也叫退火。

*DNA的变性和复性*



# 1 PCR技术的基本原理



## PCR扩增原理



无细胞分子克隆法：在微量离心管中，加入适量的缓冲液，微量的模板DNA，四种脱氧单核苷酸，耐热性多聚酶，一对合成DNA的引物，通过高温变性、低温退火和中温延伸三个阶段为一个循环，每一次循环使特异区段的基因拷贝数放大一倍，一般样品是经过30次循环，最终使基因放大了数百万倍；扩增了特异区段的DNA带。



## 2 PCR技术的特点

### 1) 高度的灵敏性

PCR产物每轮循环增加一倍

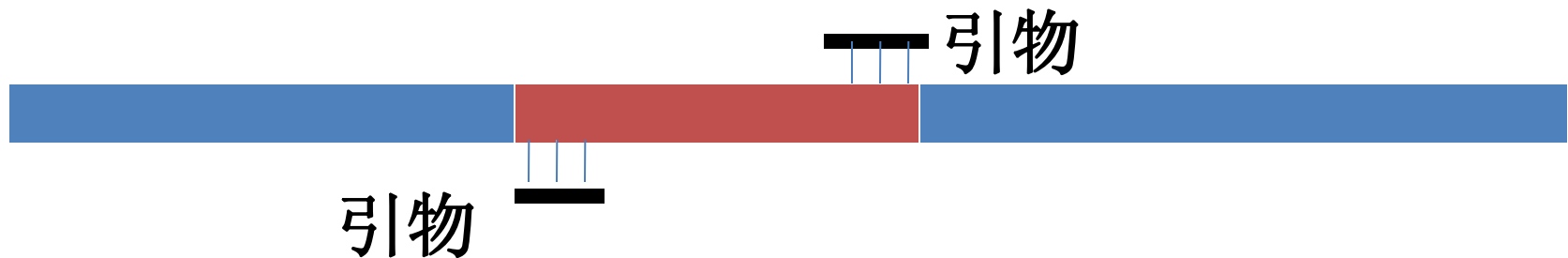


30轮循环

扩增量达 $2^{30}$ 个拷贝（ $10^9$ 拷贝）



## 2) 特异性



✦引物的序列及其与模板结合的特异性是决定PCR反应结果的关键。

✦引物设计的最大原则是最大限度地提高扩增效率和特异性；同时尽可能减少非特异性扩增。



## 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15-30 bp为宜。
- (3) 碱基尽可能随机分布，G+C占40-60%。
- (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



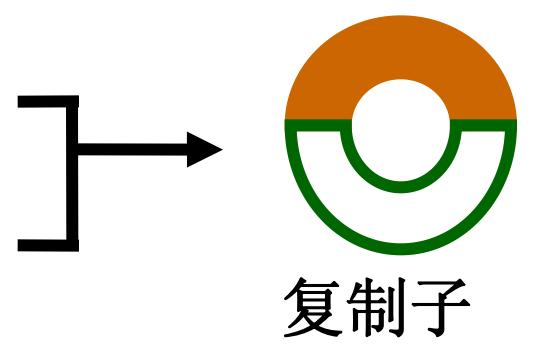
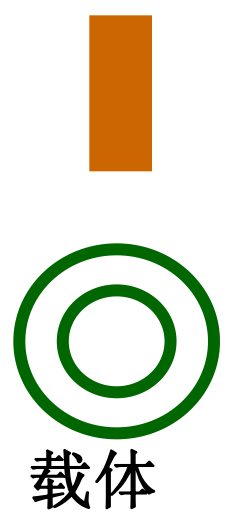
### 3) 操作简便易行

**PCR扩增法**，只需要数小时，就可以用电泳法检出 $1\ \mu\text{g}$ 基因组DNA中仅含数个拷贝的模板序列。

通常的DNA扩增法是分子克隆法，首先要构建含有目的的基因的载体，然后将它导入细胞后进行扩增，还要用同位素探针进行筛选；这种方法，要经过DNA内切、连接、转化和培养等相关的过程，操作复杂，一般需要数周时间。



目的基因

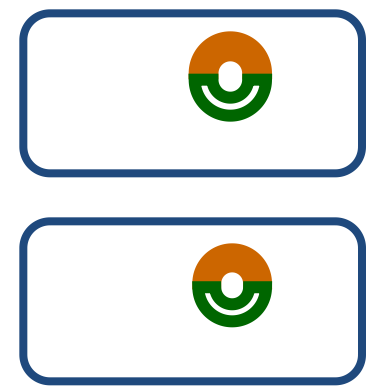


复制子

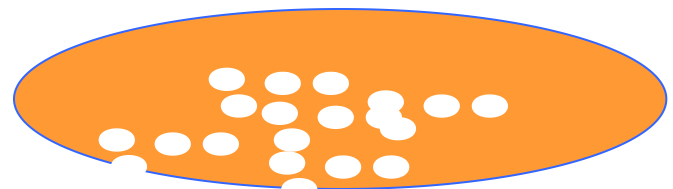
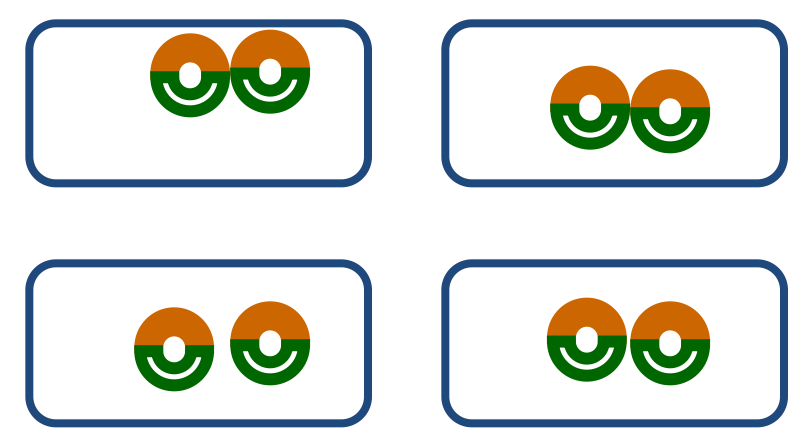


宿主细胞

扩增



扩增



提取DNA分子



# PCR的反应体系和方法

## 1 反应体系

总体积                      **50-100  $\mu$ l**

**Buffer**                      缓冲液

**dNTP**                      原料

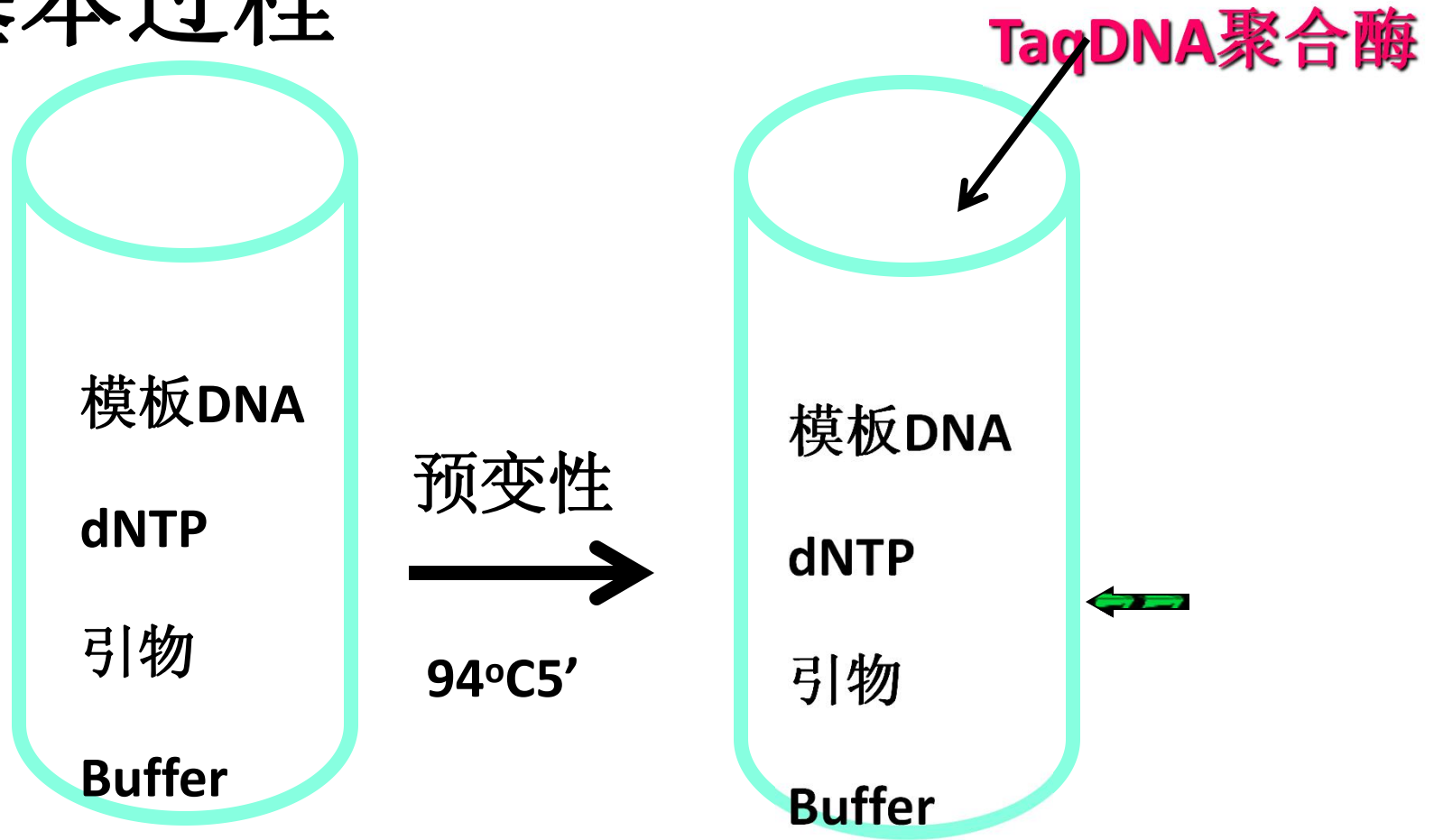
**Primer**                      引物

**DNA分子**                      模板

**Taq酶**                      **DNA聚合酶**



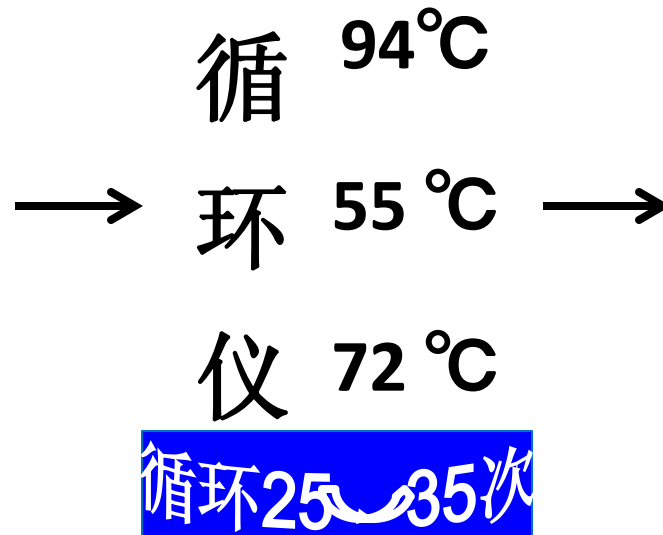
## 2 基本过程



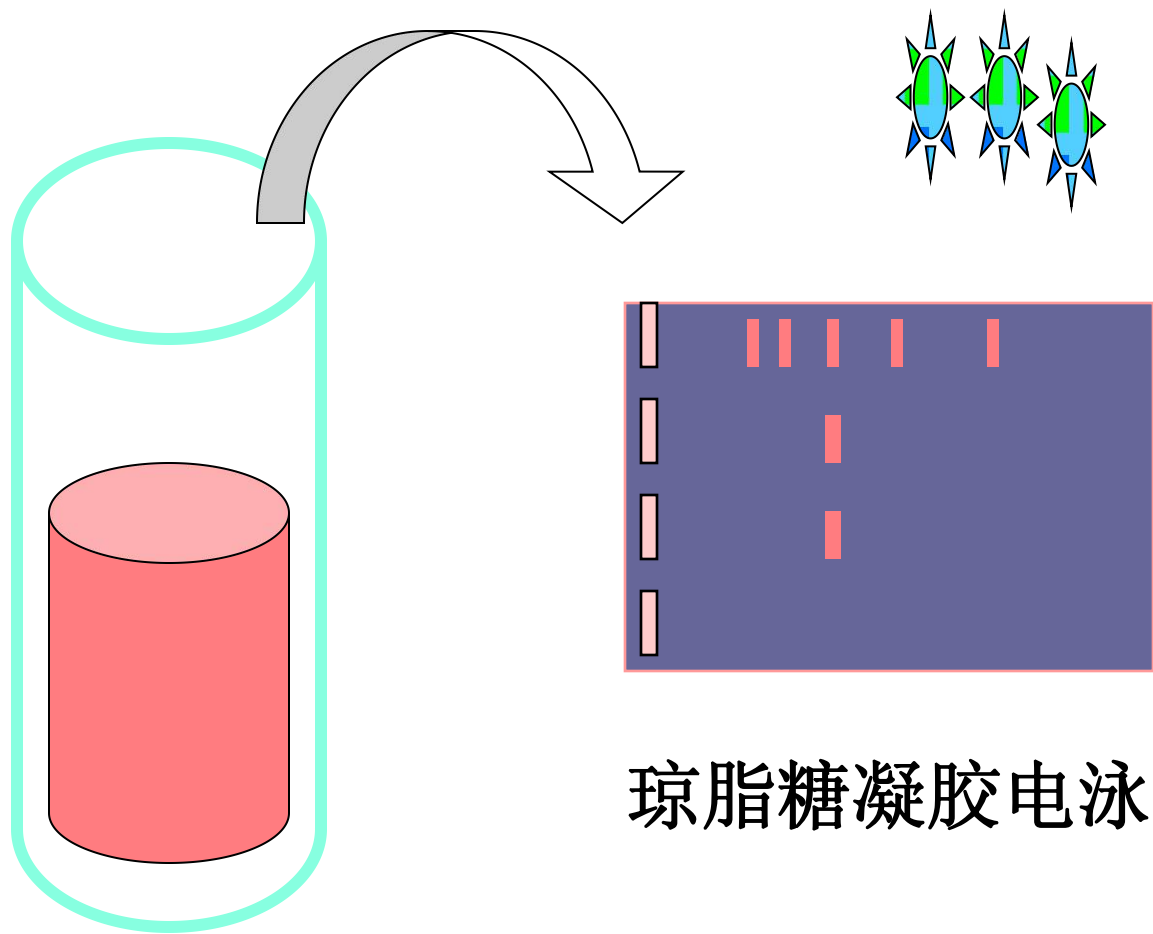
### PCR技术的基本过程(1)



72 °C 5~7 min



## PCR技术的基本过程(2)



琼脂糖凝胶电泳

## PCR技术的基本过程(3)





## 3 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100 ng DNA模板/100 $\mu$ 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  $\mu\text{l}$

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。

0.5-2.5mmol/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

94°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℃, 一般为72℃

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



# 经典循环参数（500bp以内）

94°C	5min	
94°C	30s	} × 30次
55 °C	45s	
72 °C 72°C	1min 7min	
4 °C	forever	





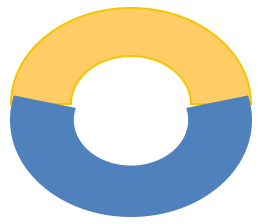
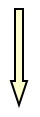
# PCR技术的应用

PCR技术应用广泛：

- ◆生命学科
- ◆医学工程
- ◆遗传工程
- ◆法医学
- ◆考古学



# 1) 基因克隆

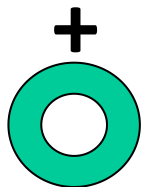


重组DNA



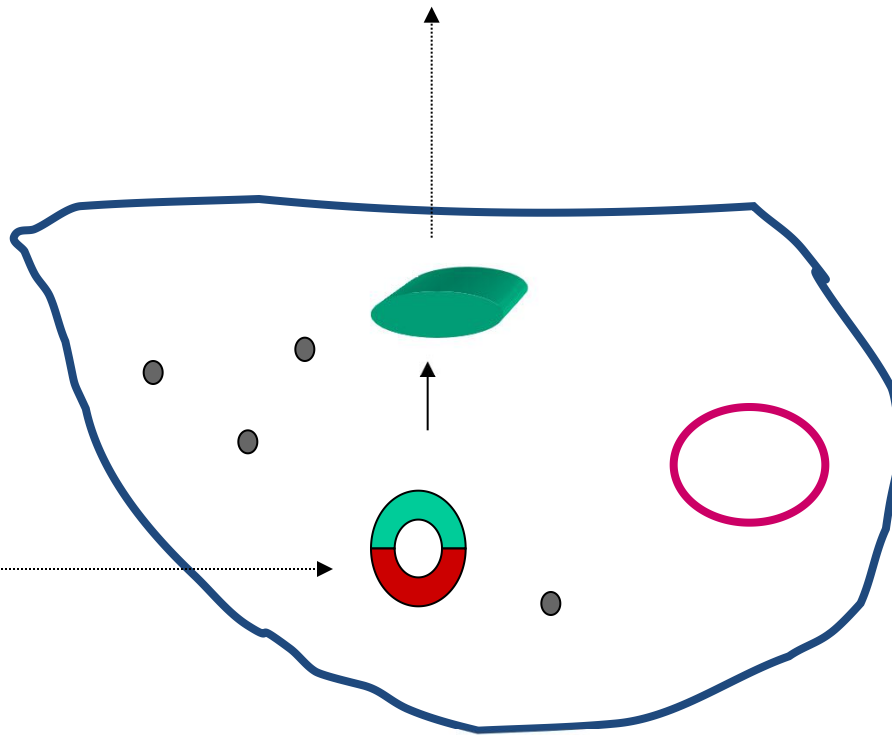
# 基因工程产品

胰岛素基因



重组体

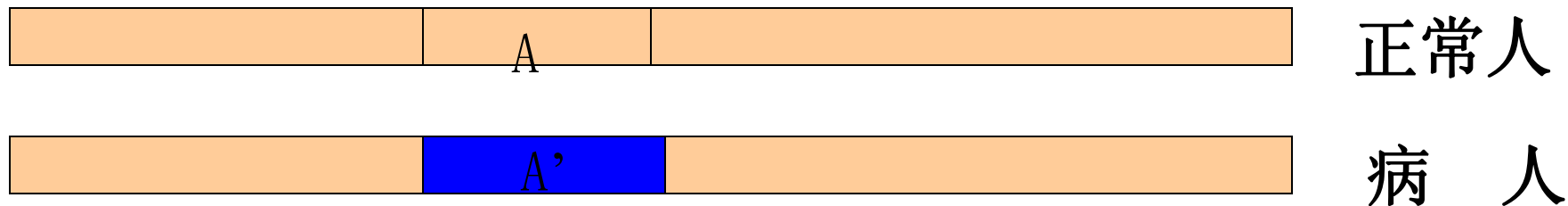
胰岛素



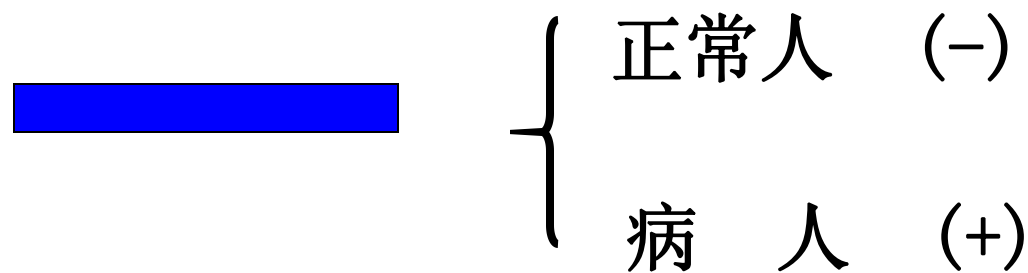


## 2) 基因检测

### ✦ 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

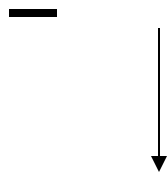
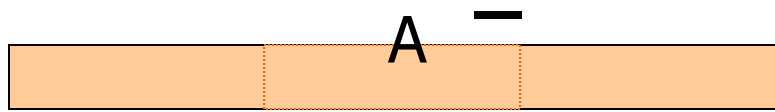
基因缺失、插入或置换等



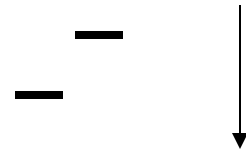
珠蛋白链合成不平衡



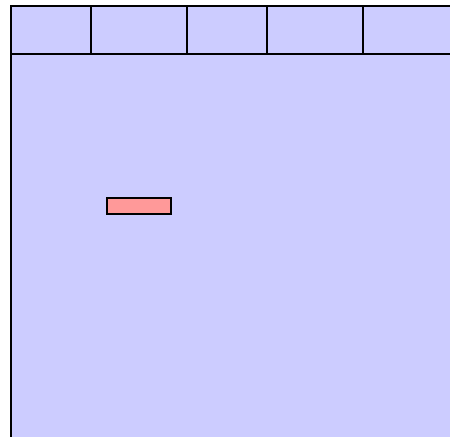
正常人



病人

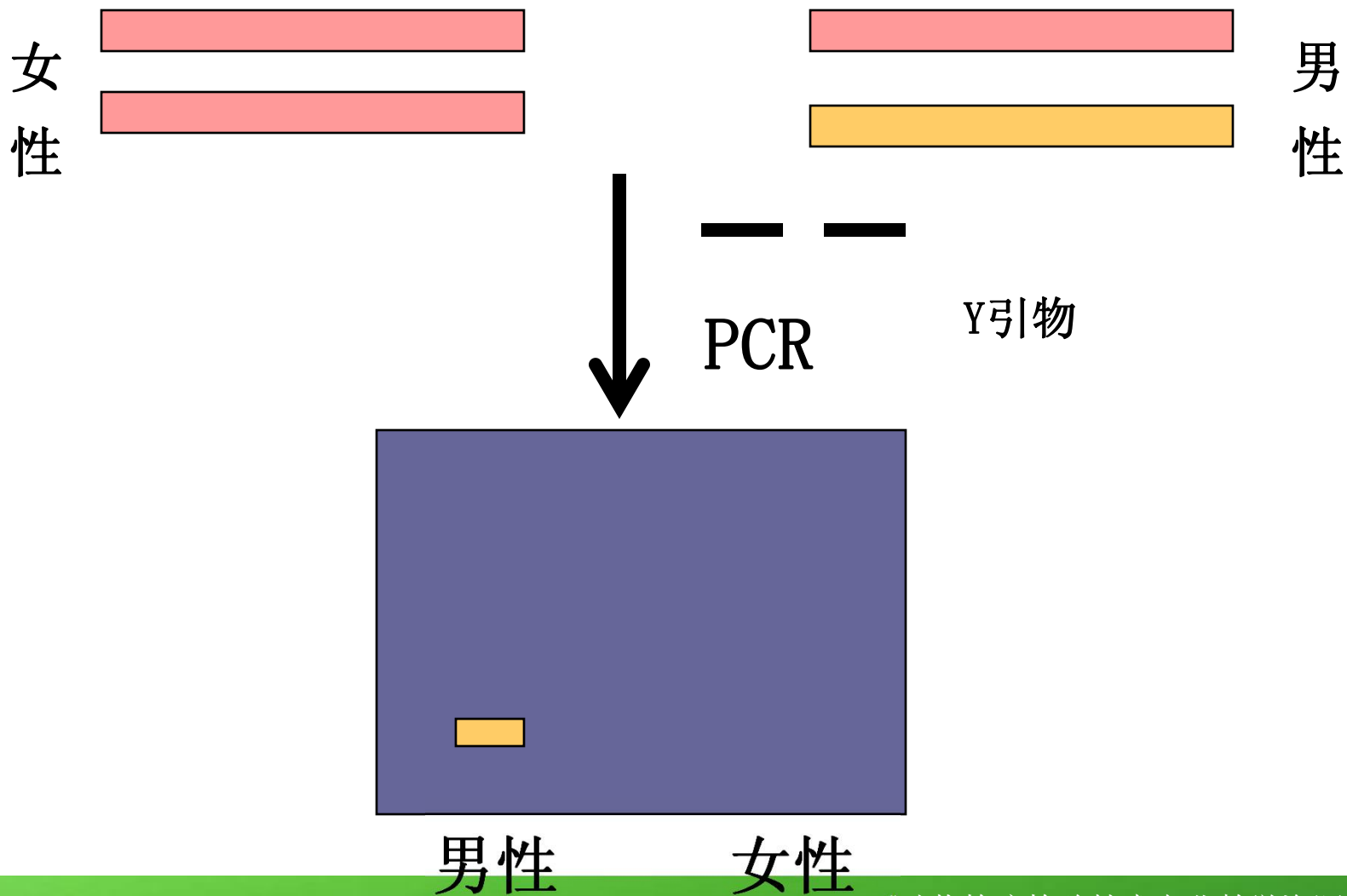


正常 病人





### 3) 基因鉴定





# 法医学分析

个体识别、亲缘鉴定

方法：PCR-RFLP

DNA遗传指纹

PCR-ASO

PCR-VNTR多态性

PCR-SSCP

线粒体DNA测序





**动物检验检疫技术**

专业教学资源库

×

×

×

×

**Thank You!**

×