

N2 以聚合酶連鎖反應增殖 DNA

王愛玉

Polymerase chain reaction (PCR) 是試管中合成 DNA 的方法，可以在短短幾個小時內將目標基因大量增殖出。PCR 技術的發展使得基因的選殖與增殖無需經由生物細胞的複製系統，目前已成為分子生物學常用之方法。本實驗將以 N1 得到的大腸桿菌染色體 DNA 為材料，以 PCR 進行 β -galactosidase 基因 (*lacZ*) 的增殖，藉以體認此方法之原理及效率。

2.1 背景知識

2.1.1 DNA polymerase 與 DNA 複製

在細胞中，DNA 的複製是藉由一套複雜的酵素系統來完成，其中的主角為 DNA polymerase，此酵素負責催化核苷酸的聚合，合成與原先 DNA 具有互補序列的 DNA。原核及真核細胞中的 DNA polymerase 都不止一種，有些專司 DNA 複製，有些則參與 DNA 的修補，但在催化 DNA 合成的反應上都具有一些共同的特性：1) 需要有模版 (template) DNA 的存在；2) 需要有一段與模版 DNA 序列互補的單股 DNA 或 RNA (稱為引子，primer)，先黏合在模版 DNA 上；3) 核苷酸的聚合是由引子的 3'-OH 端開始延伸 (稱為 primer extension)，以 5'→3' 的方向進行 DNA 合成。4) 需要 Mg^{2+} 作為 cofactor。此外，許多 DNA polymerase 除了具有 polymerase 的活性外，還具有 3'→5' exonuclease 的活性，可以將聚合錯誤的核苷酸去除 (此功能稱為 proofreading)，以維持 DNA 複製的正確性。有些 polymerase 也具有 5'→3' exonuclease 的活性，用於水解引子序列或參與 DNA 修補等。

DNA 的合成也可以在試管中進行，只要提供模版 DNA、引子、核苷酸、含有 Mg^{2+} 的反應緩衝液，DNA polymerase 即可催化核苷酸聚合反應的進行。目前在分子生物研究上常用的一些實驗，例如：核苷酸定序、放射線核酸探針的合成、第二股 cDNA 的合成、雙股 DNA 末端的修補...等等，都是利用 DNA polymerase 來進行 primer extension 反應。本實驗用的 PCR 也是試管中合成 DNA 的方法，可用於 DNA 大量增殖。

2.1.2 PCR 原理及發展

在試管中進行 DNA 增殖的概念最早是由 Ghobind Khorana 等人於 1971 年提出

的：含有雙股 DNA 的溶液中，若同時有一對引子存在（引子的序列與雙股 DNA 的部分序列互補，且其量超過雙股 DNA 的量），當加熱使雙股 DNA 打開為單股後，繼而使溫度下降至適當溫度時，每一條引子將有機會黏合至與其序列互補的單股 DNA 上。此時若加入 DNA polymerase，此酵素即可進行聚合反應，原雙股 DNA 也因此可被複製為兩倍。新合成的 DNA 可繼續做為下一回合反應的模版，只要反覆經過加熱變性、降溫及添加新鮮的 DNA polymerase 進行聚合反應等步驟，就可合成出大量的 DNA。然而，在那個年代，基因序列分析、oligonucleotide 引子的合成等技術都還是艱鉅的工作，使得 Khorana 的構想無法付諸實際應用，這個構想也很快就被遺忘了。1985 年，在 Cetus Corporation 服務的 Kary Mullis 提出 PCR 方法，原理與 Khorana 所提相同，但他實際利用以化學法合成的具有 β -globin 序列的一對 oligonucleotide 引子，以及 Klenow fragment (*E. coli* DNA polymerase I 的 large fragment)，在試管中複製增殖出 β -globin 基因序列。於其時，基因選殖、序列分析、oligonucleotide 合成技術漸臻成熟，也已有不少的基因序列被訂出，因此 PCR 一被提出即蔚為風潮，尤其是三年後，Klenow fragment 被耐熱性高的 *Taq* DNA polymerase 取代，使得 PCR 反應過程中無需再反覆添加酵素，也可利用具有程式控制的溫度反應器自動進行各個反應步驟。PCR 反應包括三個基本步驟：Denaturation, annealing 及 polymeration。

- a) Denaturation：加熱至 94 或 95°C 使雙股模版 DNA 打開為單股。
- b) Annealing：溫度降至適當溫度，使引子能專一性的黏合至模版上。
- c) Polymerization：溫度提高到 70-75°C，*Taq* DNA polymerase 進行 DNA 合成。上述這三個步驟每進行一回合，就可使 DNA 量增加為 2 倍，反覆進行 n 次後，理論上 DNA 量可增為 2^n 倍。

2.1.3 PCR 反應之基本組成份

- a) 模版 DNA：隨著實驗目的不同，模版 DNA 組成亦不同。模版 DNA 可能為單純的質體 DNA，亦可能為複雜的染色體 DNA；可為雙股，亦可為單股；可為環狀，亦可為線狀 DNA。模版 DNA 可以是純化的 DNA 樣品，也可以是未經純化的 DNA 樣品，例如，噬菌體溶菌斑、細菌菌落水解液、血液...等。理論上，目標基因只要存在單一個 copy，就可以利用 PCR 進行增殖，然而實際反應中，通常會加入含 10^4 - 10^5 copies 目標基因的 DNA。溶解模版 DNA 的溶液要避免含有 EDTA。
- b) 引子：引子長度通常為 20-30 nucleotides (nt)。選擇引子序列需考慮：與目標基因序列完全互補區域應涵蓋 18-25 nt、G+C 含量應介於 40% 及 60% 間、需避免有二級結構及形成 primer dimers、引子對之 T_m 值差異需小於 5°C...等因子，目前已有許多電腦軟體可協助引子序列之設計。

- c) **Thermostable DNA polymerase**：最早用於 PCR 的熱穩定酵素為純化自 *Thermus aquaticus* 的 *Taq* DNA polymerase，目前市面上也有許多純化自不同菌種的熱穩定 DNA polymerase 可供選擇。對一般實驗而言，最常用的 PCR 酵素仍為 *Taq* DNA polymerase，然而此酵素不具有 proofreading 功能，若實驗需求高度正確性時，可選用其它具 proofreading 的熱穩定酵素，例如 *Pfu* DNA polymerase。*Taq* DNA polymerase 除了由引子 3'-端延伸合成與模版 DNA 序列互補之序列外，還會在合成 DNA 的 3'-端多加上一個 A，造成雙股 DNA 之 3'-端有突出一個核苷酸的現象。
- d) **Deoxynucleoside triphosphates (dNTPs)**：在標準的 PCR 反應中，使用等量的 dATP、dGTP、dCTP 及 dTTP，每一種 dNTP 的最終濃度通常為 20-250 μM 。
- e) **反應緩衝液**：用於維持反應穩定的 pH 值。通常使用 10-50 mM Tris-HCl 緩衝液，pH 值介於 8.3-8.8 之間。
- f) **二價陽離子**：所有的熱穩定 DNA polymerase 皆需二價金屬離子（通常為 Mg^{2+} ）作為 cofactor。由於模版 DNA、引子及 dNTPs 都可與 Mg^{2+} 結合，DNA 溶液中若含有 EDTA，也會減少有效的 Mg^{2+} ，所以反應液中最適 Mg^{2+} 濃度需隨著模版 DNA 及引子對的改變而做調整。此外，相同的模版 DNA 及引子對，若每次使用的 DNA polymerase 來自不同廠商或來自不同菌種，甚或來自同一廠商但不同批次，皆須重新進行 Mg^{2+} 最適濃度的測試。
- g) **一價陽離子**：通常含有 KCl，濃度則隨使用之熱穩定 DNA polymerase 而異。適量的 KCl 可以使 DNA polymerase 的活性增加 40%-60%，但濃度提高時反而會抑制酵素活性。
- h) **其它組成分**：反應液中有時會添加 gelatin 或 BSA，以及 Tween 20 等非離子性界面活性劑來增加酵素的穩定性；或添加 dimethyl sulfoxide (DMSO)、formamide 等以幫助模版 DNA 的變性及克服二級結構的問題；或加入 tetramethylammonium chloride (TMAC) 增加引子與模版 DNA 黏合的專一性；.....。

2.1.4 反應程式設定

用於進行 PCR 反應的自動化儀器稱為 thermal cycler (溫度循環反應器)，可以設定 denaturation, annealing 及 polymerization 三個基本步驟的反應溫度及反應時間，以及這三個步驟反覆循環的次數。各種參數的設定會對 DNA 合成的專一性 (specificity)、正確性 (fidelity) 及合成的量 (yield) 有不同的影響，需仔細考慮，以下為一般通則：

- a) **Denaturation**：溫度與時間的設定需考慮模版 DNA 的 G+C 含量及長度，通常可設定在 94 或 95 $^{\circ}\text{C}$ ，時間為 30-45 sec，G+C 組成較高者，可提高溫度，但須考慮 DNA polymerase 在高溫下的半衰期 (half life)。以 *Taq* DNA polymerase 而言，在 92.5、95.0 及 97.5 $^{\circ}\text{C}$ 之半衰期分別為 130 min、40 min 及 5-6 min。

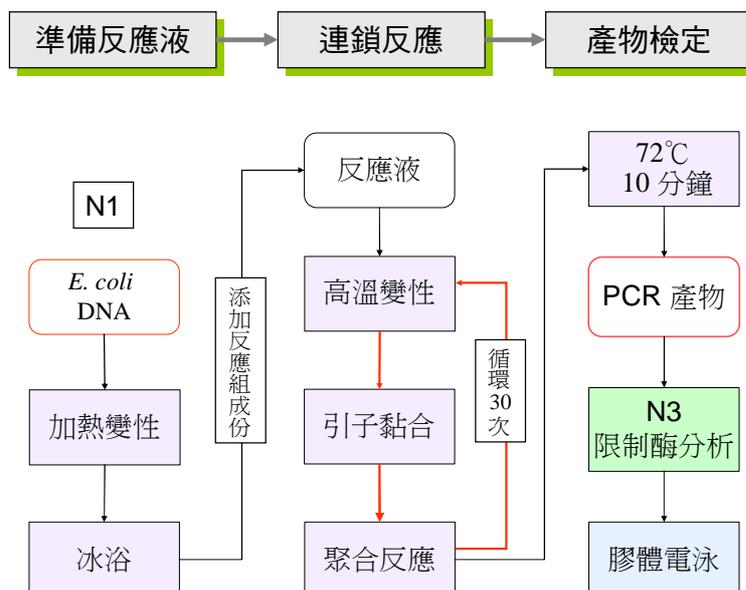
- b) Annealing : 引子與模版黏合的溫度與時間隨引子組成、長度及使用之濃度而異。Annealing 溫度太低時，非專一性黏合的機會增加，導致 PCR 產物中會含有許多非目標基因的 DNA 片段；但若溫度太高，則引子不易黏合至模版，DNA 的合成量會很少。通常可先設定於引子之 T_m 值減 5°C ，並在這溫度上下範圍內測試最佳條件。Annealing 時間通常設定 5-30 sec，延長時間雖增加引子黏合的量，但也增加了非專一性黏合的機會。
- c) Polymerization : 反應溫度隨使用之熱穩定 DNA polymerase 而異。使用 *Taq* DNA polymerase 時，通常將反應溫度設定於 72°C （接近此酵素之最適反應溫度），在此溫度，此酵素之聚合速度約為 2000 nt/min。在設定反應時間時，需考慮目標 DNA 的長度，每 1000 bp 可設定為 1 min。
- d) Number of cycles : 視最初加入之模版 DNA 量而定，若含有 10^4 - 10^5 copies 之目標基因，約 30 cycles 即可得到大量的 PCR 產物。循環次數過多時，會造成非專一性產物量增加。

2.1.5 PCR 的應用

由於 PCR 可以由複雜的一群 DNA 中合成出特定的 DNA 片段，以及引子序列不需要與模版 DNA 完全互補等特點，使得 PCR 的應用極為廣泛，包括：基因選殖 (gene cloning)、定點突變 (site-directed mutagenesis)、核苷酸定序、親源關係、種源分析、遺傳疾病、致病病毒及細菌的檢定.....等。

2.1.6 實驗大綱

N2 以聚合酶連鎖反應增殖 DNA



2.2 實驗操作— 由大腸桿菌染色體 DNA 增殖 *lacZ* 基因片段

2.2.1 儀器設備

a) Thermal cycler : Biometra Tpersonal

◆ 請先熟悉使用方法。

b) 0.2 mL 薄壁微量離心管

2.2.2 藥品試劑：

a) *E. coli* genomic DNA : N1 得到的 DNA

b) *Taq* DNA polymerase : 2.5 units/ μ L

c) Primers : P1 及 P2 , 各 20 μ M 。序列分別為：

P1: 5'-TACACCAACGTGACCTATCC-3'

P2: 5'-TACATCGGGCAAATAATATCGG-3'

d) 10 \times reaction buffer : 500 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween。

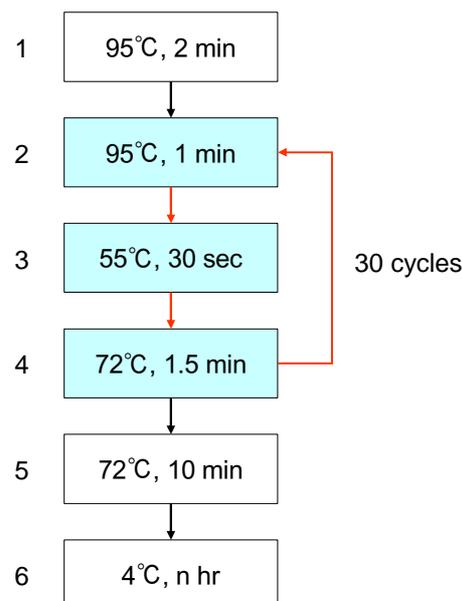
e) MgCl₂ : 50 mM

f) dNTPs : dTTP, dCTP, dATP, dGTP 之混合液，濃度各為 2.5 mM

2.2.3 操作步驟：

設定 Thermal cycler 反應程式：

1) 如下設定反應程式：



準備反應液：

- 2) N1 得到的 DNA 以無菌水調整濃度為 10 ng/ μ L。以 95°C 加熱 10 分鐘後，立即置於冰浴中。
- 3) 取 5 支 0.2 mL 離心管，分別標上 P、A、B、C、S，如下表依序添加各成分於管壁上（每加一種溶液，請更換新的 tip；吸取 1-2 μ L 請用 P2 微量吸管及白色 tips）：

反應組成份	編 號					
	P	A	B	C	S	T
Primer 1	2	2	2	2	2	0
Primer 2	2	2	2	2	2	0
10×Reaction Buf	5	5	5	5	5	5
dNTPs	8	8	8	8	8	8
	◆ 為減少誤差，上述四成分已事先混合好，請由 Pre-mix 管中吸取 17 μ L，加入 P、A、B、C 各管中。					◆ 助教提供之 T 管中，已加入上述兩成分。
MgCl ₂	2	1	2	4	x	2
dH ₂ O	30	21	20	18	22-x	24
將各管移至冰浴中，如下添加 DNA 及酵素：						
DNA	0	10	10	10	10 (由助教提供)	10
Taq DNA polymerase	1	1	1	1	1	1

註：x 加入之量由助教告知。

進行反應：

- 4) 將每管溶液混合均勻（以微量吸管吸放溶液，記得更換 tips）並緊蓋管蓋後，置於 Thermal cycler 反應槽中，啟動反應程式。
 - ◆ 注意！若 Thermal cycler 不具有上蓋加熱功能，則需在每管反應液中添加礦物油，以防溶液因高溫蒸發，繼而凝集在管蓋及管壁上

產物分析及檢定：

- 5) 進行膠體電泳分析及限制酶分析檢定，請依 N3 之方法步驟進行。

2.3 結果與報告

與 N3 實驗結果一併撰寫，但回家後請先練習下列問題：

- a) 以生物資訊課程中學到的方法，由資料庫中找出 *E. coli lacZ* 序列，並練習比對 *E. coli lacZ* 序列及此次實驗所用的兩個引子序列，找出引子在 *lacZ* 上的位置，計算出 PCR 產物之預期大小。

2.4. 參考文獻：

Erlich HA (1989) PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. M Stockton Press.

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerase. J Mol Biol **56**: 341-361.

Micklos DA, Freyer GA (2003) DNA Science: A First Course, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Saiki RK, Gelfand, DH, Stoffel S, Scharf SJ, Mullis KB, Horn GT, Erlich, HA, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, , Horn GT, Mullis KB, Erlich, HA (1989) Primer-directed enzymatic amplication of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.

Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Vol 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Switzer RL, Garrity LF (1999) Experimental Biochemistry, 3rd ed, W. H. Freeman and Company, New York.

<http://highveld.com/f/findex.html> -- The World Famous PCR Jump Station