

看透基因的顯微鏡

Polymerase Chain Reaction (PCR)

原理篇

撰文 / 黃正宗

生物由細胞構成。要研究生命現象，最根本而直接的方式便是研究細胞核中的DNA，由四種核苷酸A、T、C、G，任意構成千變萬化的DNA，大致上每一長鏈的DNA上羅列分佈有表現區（exon）和不表現區（intron），exon中自5'端到3'端，依序每三個核苷酸為一個密碼（codon）代表一種胺基酸（amino acid），而不表現區則極可能隱含有調節“表現區”的功能。三個三個核苷酸組成的密碼經過轉錄（transcription）、轉譯（translation）的過程製造出蛋白質，藉以控制生命現象。七〇年代以來，分子生物學突飛猛進，研究人員殫精竭慮地試圖找尋細胞核中每一DNA的核苷酸排列方式及其表現結果，透過此研究，生命的奧秘，逐漸無所遁形地被發掘出來。

實際上，實驗室中每次都僅只針對一小段（fragment）DNA為研究對象來探索其核苷酸序列（sequence），這麼一點點連電子顯微鏡都不容易看見。因此必須針對這段的量予以放大（amplify通常指複製數千萬個相同fragment以便研究）。在過去，放大DNA fragment之量是很浩繁的工程，你得培養一大群細胞，然後自每個細胞中純化出你要的一點點DNA fragment。直如大海撈針般艱難；或者你得把所要的DNA fragment，選取（clone）出來，植入大腸桿菌（E. Coli）或噬菌體（phage）中予以繁殖後再純化（purify）出來，你同樣得披星戴月，這些放大的技術都很糟、錯誤率高、效率低、速度慢、純化不易。嚴重阻滯了我們對DNA的研究。

PCR的發明讓所有基因工作者都“烈火青春”

起來！因為它可以迅速、簡便、準確地放大我們所要的DNA fragment。一個吃驚的事實可以說明PCR的神勇。1988年PCR正式問市，同年以PCR輔佐的研究論文有36篇；1989年便有上百篇，1990年截稿為止已逾數百篇，這項新技術排出倒海地攻佔每一個基因研究室，包括台灣的。

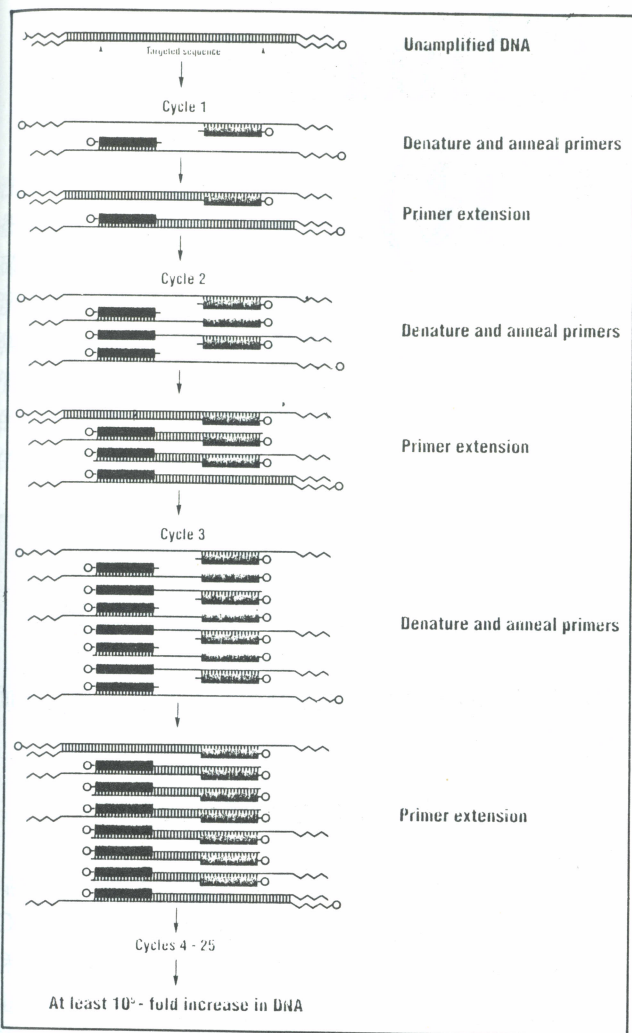
PCR的原理其實很簡單，它就像一個大量生產的工廠一年共需要六大條件，以工廠為例；

1. 四種核苷酸（dNTP）—這是原料。
2. DNA聚合酶（polymerase）—如同機器。
3. 模板（templete）—即是藍圖。
4. 起動子（primer 或曰引信）—起動機器之用。
5. 變動的溫度及時間—代表此部機器的特質。
6. in vitro tube—擬如廠房。

工廠的大量生產過程，是以藍圖為基礎，讀入機器之後供應原料，再啟動機器，在讓機器可以運轉的條件下便可得到大量齊一化的產品，此與DNA的半保留複製（semiconservative replication）過程完全類似，描述如下：以我們要複製的DNA fragment為模板，以之與DNA聚合酶引信三者結合之後，聚合酶便開始以供應的核苷酸一個個順序複製、時間、溫度配合得當時，聚合酶可以在複製後脫離，重新附上新的模板，再複製，整個複製過程在溫度時間特殊控制下的試管中進行。

以下有幾點是PCR藉以發展的幾個突破性重點

1. PCR的全稱是聚合酶連鎖反應，連鎖反應的精神在於：產物可以是下一循環的反應物，如此，DNA複製方配一變二，二變四，以乘方快速放大。但DNA每經複製一次後由單股變雙股，此時相對應之鹼



PCR原理圖示

基便以 A = T, C ≡ G 氫鍵結合，無法分開，也自然無法複製，因此要讓複製後的雙股DNA再變回單股，只有加熱至 94°C 把雙股分開。

2. 但DNA polymerase 是一種酶，諸君必知蛋白質必然無法承受九十度的高溫而會變性 (denature)，無法再擔任酶的功能。此時陷入兩難：不加熱，DNA 雙股無法分開，若加熱，酶便會變性。

3. 所幸中國人的發現改變了歷史。一位現在於陽明神研所任教的錢嘉韻教授，在她 1976 年碩士論文中有一項新發現：某種溫泉菌 (Thermus aquaticus) 之DNA聚合酶具有耐高溫的特性，此篇報告後來被 cetus 公司研究人員爰用以改進 PCR，它不久便正式問市。

4. 整個連鎖反應中需經常變化的是溫度：DNA 複製過程中需在 3 個不同溫度進行：Primer 附上DNA 的適宜溫度是 50 餘度；因為非完全吻合之 Primer 黏結位，其 Primer 會下來，DNA polymerase 在

70 餘度最適合進行複製，雙股DNA要denature成單股則高達 90°C 以上，每經過一個複製循環，便需依次達此三種溫度。(其溫度循環詳見圖一)再者，每種溫度所需維持的時間亦需設定，不能太長或太短，以七十餘度而言，是核甘酸一個個聚合成鏈的階段，若時間太長，則可能在第一個cycle複製“做過頭”，若時間太短，則還沒複製完整段所需的 fragment，Polymerase 未到另一端 Primer 前就脫離DNA 模板，兩者都影響實驗結果，故要以實驗經驗及熱力學方法計算出最適宜的溫度及時間，現今有一種可以控溫控時的儀器，這也是PCR商品化中的“硬體”(見P 135 附圖)。

5. 引信 Primer 一小段DNA所構成，在複製之前，此段DNA必須與起始複製點附近的DNA發生 Annealing 後才能由該起始點繼續複製下去至另一端，因此，這段 primer 決定我們所需複製的DNA片段之大小。

DNA 蘊藏著生物之所以為生物的所有機制，PCR發明後，人類可以逐一分析人類 23 對染色體上所有 Gene，一窺所有生命堂奧。這是一個當今世上最熱門的領域，也是最迷人的科學。

如同陽明醫學院張南驥教授所說「在這目不暇給的知識爆炸時代裡，一個醫學院學生如果不對複雜的 Gene 有所瞭解，他將缺少對生命的基本認識」有志從事Gene 研究者，PCR 是一項不可或缺的利器。

圖一

