

## 简并PCR技术在疾病检测中的应用

刘敏<sup>1</sup>, 程淮<sup>1</sup>, 蔡欢嫦<sup>1</sup>, 张贺伟<sup>2\*</sup>, 任静强<sup>1\*</sup>

1.温州大学病毒学研究所, 浙江 温州 325035;

2.洛阳职业技术学院食品与药品学院, 河南 洛阳 471400

**摘要:** 普通PCR引物对目的基因扩增的单一特异性,限制了其在临床疾病检测中的通用性范围,而多重PCR需要避免若干引物对之间二级结构的干扰,应用同样受到一定的限制。简并PCR技术中简并性引物是基于基因保守区域的分析并结合简并碱基而设计,可以检测出高度相似的靶基因,具有高效性、灵敏性、特异性和低成本的特点,目前已被广泛应用于多个领域。综述了简并PCR技术在临床、食品安全、动植物疫病、寄生虫、水产养殖等领域疾病检测中的应用,并对其优缺点进行了讨论,以期简并PCR的进一步发展以及在其他领域的应用提供参考和指导。

**关键词:** PCR技术; 简并PCR; 简并性引物; 疾病检测

DOI:10.19586/j.2095-2341.2024.0061

中图分类号: Q-31

文献标志码: A

## Application of Degenerate PCR Technique in Disease Detection

LIU Min<sup>1</sup>, CHENG Huai<sup>1</sup>, CAI Huanchang<sup>1</sup>, ZHANG Hewei<sup>2\*</sup>, REN Jingqiang<sup>1\*</sup>

1.Institute of Virology, Wenzhou University, Zhejiang Wenzhou 325035, China;

2.College of Food and Drug, Luoyang Vocational and Technical College, Henan Luoyang 471400, China

**Abstract:** The single specificity of ordinary PCR primers for amplifying target genes limits the universality in clinical disease detection, while multiplex PCR needs to avoid interference of secondary structures between several primer pairs, which also limits its application. The degenerate primers based on the conserved region design of genes can detect highly similar species, and degenerate PCR shows good efficiency, sensitivity, specificity and low cost in the application of correlation detection. Currently, degenerate PCR technology has been widely used in mutiple fields. This article reviewed the application of degenerate PCR technology in clinical, food safety, animal and plant diseases, parasites, aquaculture and other fields, and discussed its advantages and disadvantages, in order to provide reference and guidance for the further development of degenerate PCR and its application in other fields.

**Key words:** PCR technology; degenerate PCR; degenerate primers; disease detection

病原微生物包括细菌、真菌、病毒和寄生虫等,它们广泛分布于空气、水源、土壤和食物中,对人类健康构成威胁。为了同时满足多个指标的筛选和检测需求,需要开发更快速、更准确的技术或方法应用于病原微生物的检测。

目前,病原物的检测方法包括传统分离法、酶联免疫吸附法、基因芯片技术和PCR技术。其中,

传统分离鉴定法通过观察微生物的形态特征、生理、生化反应和血清反应等进行病原的分类鉴定,但操作时间较长。酶联免疫吸附法基于抗原与抗体的特异性反应建立,具有高度特异性,但灵敏度受取样时间和操作方法等因素影响。基因芯片技术适用于微量检测分析,具有高精度度,但成本较高,检测在一定程度上受限<sup>[1]</sup>。PCR技术由于其

收稿日期:2024-03-26; 接受日期:2024-05-28

基金项目:温州大学引进人才科研启动项目(QD2023014);温州市基础性科研资助项目(20231107)。

联系方式:刘敏 E-mail: min1011@163.com

\*通信作者 任静强 E-mail: rjq207@163.com; 张贺伟 E-mail: zhanghewei0825@126.com

卓越的性能,在检测领域中占据重要地位<sup>[2]</sup>。

普通 PCR 和多重 PCR 是 PCR 技术的常见形式,但在同源序列存在多个基因突变位点时,设计特异性引物进行扩增分析可能面临困难。而简并 PCR 通过引入简并核苷酸获得简并性引物,该类引物可以与更多基因匹配,实现多个高度同源性基因序列的扩增,基于此原理进一步拓展应用,用于快速、敏感地检测病原体的存在,进而实现对疾病的诊断与检测<sup>[3]</sup>。简并 PCR 最早于 1990 年被引入,并在随后的几十年中得到了广泛应用和发展,以简并核苷酸代表若干个可能的碱基,实现各种目标变异序列的覆盖。因此,简并 PCR 在扩增多个相关基因、突变位点或变异形式,具有独特优势<sup>[4]</sup>。由于在引物设计灵活性、多样性扩增能力、效率和经济性等方面具有明显优越性,使简并 PCR 技术在研究多态基因<sup>[5-6]</sup>、种群遗传学、疾病检测<sup>[7-8]</sup>等领域中发挥着重要作用,并为快速、准确地获取目标序列信息提供支持。本文系统归纳和总结了简并 PCR 技术在疾病检测中的研究进展,旨在推动该技术的进一步优化和创新,以满足不断增长的疾病检测需求。

## 1 简并 PCR 的原理及技术特点

### 1.1 简并 PCR 的原理

简并 PCR (degenerate PCR) 是一种基于简并引物设计的 PCR 技术,用于扩增具有高度变异性的基因或检测存在多个亚型的病原体。在简并 PCR 反应体系中,引物序列以含有代表多个可能碱基的字母表示,用于替代在多个高度相似的核苷酸序列中出现 2 个或 2 个以上的变异碱基(图 1)。这些字母被称为简并碱基,在引物序列中存在简并碱基的引物被称为简并引物 (degenerate primers),也可称为共同引物 (consensus primers) 或通用引物 (universal primers 或 general primers)<sup>[9]</sup>。简并 PCR 利用在引物中引入简并位点或混合碱基 (IUPAC 代码),以允许引物与多个相关序列结合,扩大引物的范围,从而涵盖多个可能的核苷酸选择<sup>[10]</sup>。这样的设计使得简并引物能够与多个目标序列的变异体发生互补配对,并在 PCR 反应中扩增出多个相似但不完全相同的 DNA 片段<sup>[11]</sup>。

### 1.2 简并 PCR 的技术特点

简并 PCR 技术的核心——简并引物,是具有

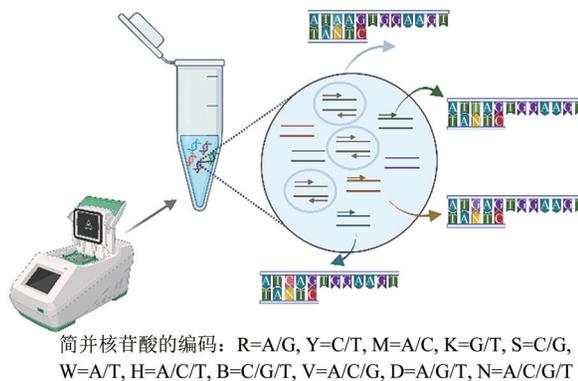


图 1 简并 PCR 技术的原理

Fig. 1 Principle of degenerate PCR technique

适应性的,可实现不同场景下的检测需求。在普通 PCR 中,简并引物设计可涵盖多个引物序列,用于扩增目标基因的不同亚型或变异位点,适用于确定目标基因的有无或特定亚型,通过检测 PCR 产物的条带判断扩增是否成功,但无法准确量化目标基因的丰度。相比之下,在实时荧光定量 PCR 中,通过实时监测 PCR 反应中的荧光信号,可以即时记录 PCR 产物的累积量,同时使用荧光探针(如 TaqMan 探针)结合特定荧光染料,可精确检测目标基因的拷贝数或表达量,适用于病毒载量检测、基因表达水平分析等需要准确量的应用场景。因此,简并引物在这 2 种 PCR 技术的应用中存在检测方式、定量能力和引物设计等方面的差异,彰显了其在不同 PCR 技术中的灵活性与适应性。

简并 PCR 具有的特殊性是相比于其他 PCR 技术而言的,设计简并性引物的目标是获得高简并性的引物,即单个简并引物就能够实现与更多基因匹配,这在一定程度上也展现了其技术特点。①多样性检测,简并 PCR 适用于检测高度差异的基因或病原体,能够覆盖不同亚型或变异体的序列变化,适用于多样性较高的目标 DNA,可实现针对多个相关序列的同时扩增,从而获得更全面的变异信息<sup>[12]</sup>。②高灵活性和特异性,简并引物的设计可以根据基因序列变化进行调整和优化,对多个同源基因进行 PCR 扩增,相比之下,普通 PCR 引物无法涵盖多个变异位点。同时,引物的简并位点可以限制非特异性杂交和扩增,从而提高检测的灵活性和特异性<sup>[13]</sup>。③快速和高通量,简并 PCR 可以在单个 PCR 反应中同时扩增多个目标序列,节省了时间和成本。此外,结合高通

量技术,如基因芯片或二代测序,可以实现快速、准确地分析大规模样本中的病原体变异<sup>[14]</sup>。④适用范围广,简并PCR技术适用于需要同时扩增多个目标序列的情况,被广泛应用于基础研究、临床诊断和环境监测等多个领域。

早在1994年,我国学者杨怀涛首次利用简并PCR技术实现了对不同基因型人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)的快速检测<sup>[9]</sup>。随后的近30年,伴随着SARS、COVID-19等各类传染病的间断性爆发,简并PCR技术也得到了快速的发展。在流行病毒性疾病频发区域,由于同一病毒株的序列突变情况多样,突变位点复杂,导致基因序列的多样性和复杂性。经序列分析表明,保守区内由突变引起的核苷酸异质性,保证了毒株各基因型间的特异性,可以据此利用简并PCR技术区分不同基因型的毒株。简并度,也称简并程度,是评价简并引物的一个重要指标,其是将简并引物中简并核苷酸代码对应的碱基种类数相乘得到的,如简并引物序列为:5'→YAG NCG YTT YAA NTY YGT-3',已知简并核苷酸代码为:R=A/G; Y=C/T; M=A/C; K=G/T; S=C/G; W=A/T; H=A/C/T; B=C/G/T; V=A/C/G; D=A/G/T; N=A/C/G/T,则简并引物的简并度应为 $2 \times 4 \times 2 \times 2 \times 4 \times 2 \times 2 = 512$ <sup>[15]</sup>。当简并引物的简并度过高时,以I(次黄嘌呤)代替N可以降低其简并度,因为I能很好的与ATCG四种碱基配对。若将上述简并引物中的N用I代替后,其简并度降低为 $2 \times 1 \times 2 \times 2 \times 1 \times 2 \times 2 = 32$ 。

## 2 简并引物的设计

目前,简并引物的设计方法通常是检查目标序列,通过多重比对进行手动设计,具体设计过程主要有:①对研究的基因序列进行搜索,查找具有代表性物种的基因序列作为引物设计的模板;②氨基酸序列比对找出高度保守区域;③采用CodeHop法(consensus degenerate hybrid oligonucleotide primers)为每个给定的多重比对构建一对引物,主要考虑上下游的简并度、退火温度、遗传密码使用的偏好性等,其中简并度最高为128,上下游引物退火温度相近,相差在5℃内<sup>[10,16]</sup>;④筛选合适的上、下游引物,每个引物包含一个简并的3'核心区域,以及一个稳定退火的5'端非简并的保守序列<sup>[16]</sup>,且每个保守区域至少有6个氨基酸残基(长度在18 bp),

上下游引物PCR产物大小在150~1 200 bp<sup>[15]</sup>。

## 3 简并PCR技术在疾病检测中的应用

随着简并PCR技术的发展,其效率高、成本低、检测速度快等优点也逐渐被发现,目前该技术已经在临床病原体、动植物疫病、食源性致病菌、寄生虫、水产养殖检测等多个领域得以应用(图2)。

### 3.1 简并PCR技术在临床检测中的应用

近年来,国内外研究将简并PCR技术应用于疾病检测领域,如与肝癌相关的雄激素受体(androgen receptor, AR)属于类固醇受体家族,通常在患者的肝脏中高表达。Chang等<sup>[8]</sup>应用简并PCR技术来检测肝脏中各种类固醇受体的表达,发现在人类肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和癌旁肝组织中类固醇受体类型和表达均不同,同时根据表达程度进行疾病检测与诊断,也为验证AR影响肝癌细胞的可能分子机制提供了支持。而早在1996年,Guyader等<sup>[7]</sup>采用单一简并引物用于多种人杯状病毒的cDNA合成与病毒性疾病的检测。2002年,欧盟专利局对“利用简并引物检测病毒”的专利进行了授权(专利号:WO2002/099130A2)<sup>[17]</sup>。对于人类新型圆环病毒的检测最初也是通过简并引物实现的,之后有研究表明简并引物也能够用于检测鹅圆环病毒(goose circovirus, GoCV)、鸽圆环病毒(pigeon circovirus, PiCV)和鸭圆环病毒(duck circovirus, DuCV)<sup>[18]</sup>。2014年,Ho等<sup>[19]</sup>开发了一种用于NGS的带有多条条形码的简并引物,构建了专门用于发现和检测病毒的生物信息学工具VirFind,扩展和丰富了病毒基因组序列信息。而根据病毒性疾病在国内的流行情况,有学者也进行了相应的检测研究,如手足口病是一种常见的儿童传染病,与肠道病毒(enterovirus, EV)的感染密切相关。胡群等<sup>[20]</sup>利用简并PCR技术设计了一组引物,用于同时扩增不同类型肠道病毒的特定基因片段,并通过凝胶电泳分析扩增产物,实现对肠道病毒的检测。临床感染样本的分析结果显示,阳性检出率达到90%以上,同时检测到多个不同类型肠道病毒,这表明不同分型的肠道病毒流行情况可能与地区有关<sup>[20]</sup>。

此外,简并PCR技术也应用于临床中的疾病诊断和流行病学调查。例如,儿童病毒性脑膜炎和脑炎是由多种病毒引起的疾病,其中肠道病毒又

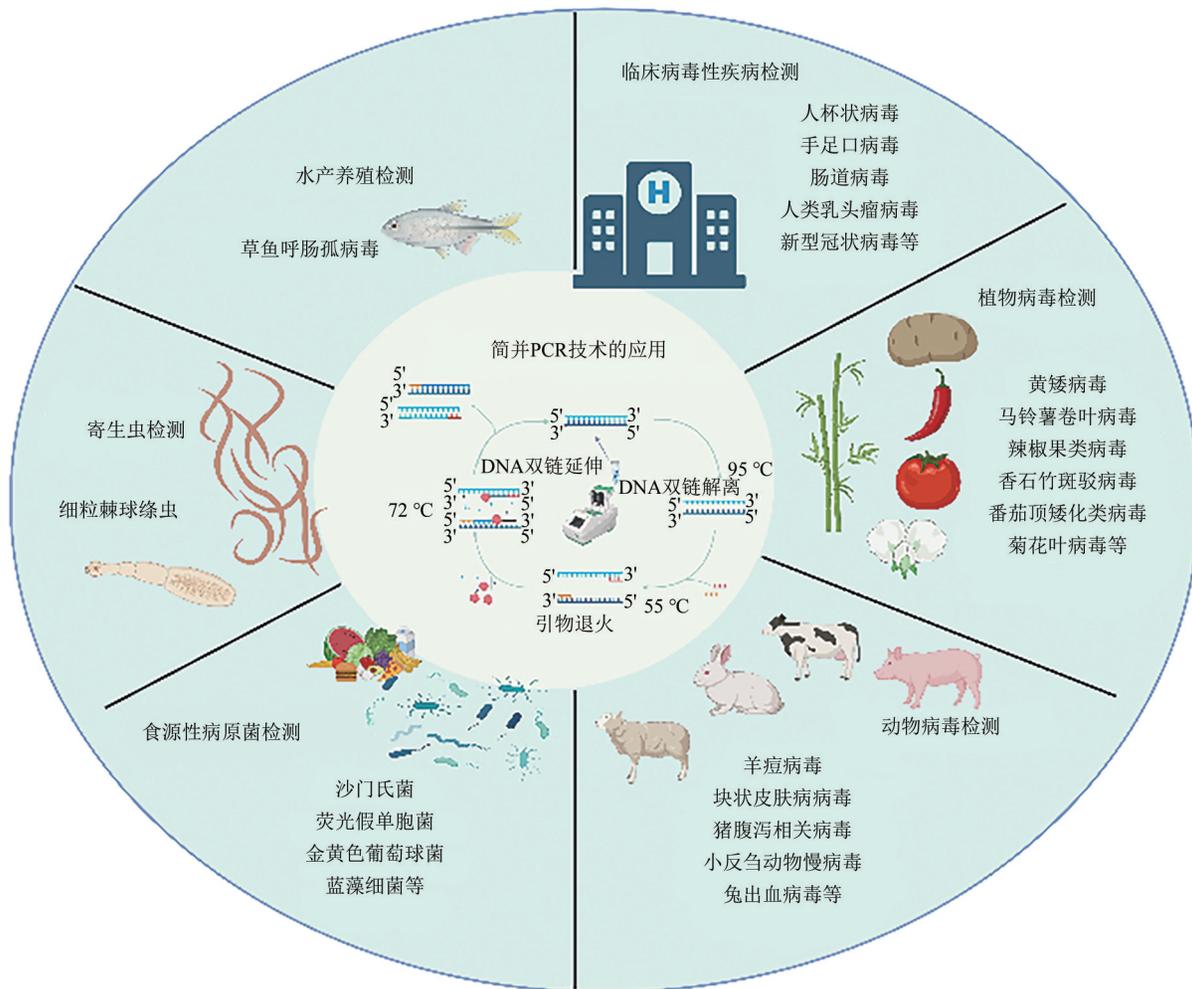


图2 简并PCR技术的应用

Fig. 2 The application field of degenerate PCR technology

是最常见的发病因子,在分子生物学检测和分型中,结合简并引物检测到了肠道病毒,并通过测序和比对发现多个类型的毒株,成功地识别出致病原的多个分型,实现了疾病类型的快速诊断<sup>[21]</sup>。另外,使用简并引物通过聚合酶链式反应或实时荧光定量 RT-PCR 法对皮肤样本进行检测,发现了与人皮肤、粘膜部分良性病损及恶性病损发生密切相关的 HPV<sup>[22-23]</sup> 和不同类别的出血热病毒 (hemorrhagic fever virus, CCHFV)<sup>[24]</sup>。同样,在 2020 年新型冠状病毒感染 (corona virus disease 2019, COVID-19) 大流行期间,Chu 等<sup>[25]</sup> 使用结合简并引物的实时定量 PCR 技术,建立了一种能快速检测人体样本中 COVID-19 的新方法,实现了快速识别患者的目的。

此外,结合简并引物扩增出流感病毒的全长基因组<sup>[26]</sup>,并进一步使用实时荧光定量 PCR 检

测,实现样本中流感病毒拷贝数的定量分析,这提示在临床检测中利用简并 PCR 技术,可快速检测出目的病毒,同时结合分型引物、克隆送测和进化树分析等方法,缩小范围从而快速明确病毒的感染情况或同时检测多个基因分型的毒株,提高检测灵敏度与特异性<sup>[27]</sup>。综上可知,这些技术的应用有助于早期临床疾病诊断和流行病学调查,为疾病的防控与治疗提供重要的支持。

### 3.2 简并 PCR 技术在病毒检测中的应用

**3.2.1 植物病毒** 植物病毒病对农业造成重大损失,是制约全球农业发展的主要因素,因此快速准确地检测与诊断植物病毒,对于减少疾病传播和制定有效的管理策略具有关键作用。2010 年,Chomič 等<sup>[28]</sup> 建立的简并 PCR 引物可对黄症病毒科进行全面评估,同时该方法也可用于检测黄症病毒组和马铃薯卷叶病毒属中尚未发现的物种。

香石竹斑驳病毒侵染香石竹引起环斑、斑驳、叶和花扭曲、畸变,直接威胁寄主植物的生长。廖富荣等<sup>[29]</sup>在5'端加入非互补富含AT序列的简并引物,结果检测到3种不同分型的香石竹斑驳病毒(alphacarmo virus),同时该方法还提高了简并引物的灵敏度。此外,利用简并引物对相似病毒感染症状的物种进行病毒检测及鉴定也是简并PCR技术应用上的新突破,利用这一方法成功发现感染菊花叶上原种属的致病新毒株<sup>[30]</sup>。Digiaro等<sup>[31]</sup>设计了3组简并引物,分别检测同种属的3个病毒亚群,并且结合特异性引物对同一亚群的所有病毒进行检测,实现了不同亚群间种的区分,这对于快速鉴定植物致病原、寻找治病方案提供了参考。

类病毒(viroid)与植物病毒类似,是由250~400个核苷酸组成的具有感染性的环状单链RNA分子,其会引起植物寄主发育不良、叶片和茎秆变色、扭曲或坏死、植株死亡等不良症状。Tseng等<sup>[32]</sup>综合分析了30个类病毒的全基因组序列,设计的一对简并引物能同时检测6种病毒,这种多重检测的能力可以及时发现和监测不同病原体的存在,实现对植物疫情的早期诊断与控制。可见,利用简并引物检测植物疫病,可以实现对同种属植物病毒亚群的检测。

**3.2.2 动物病毒** 简并PCR技术在动物病毒检测中也有较广泛的应用,尤其对于动物表现出相似病原症状的病原体的检测与诊断,有助于实现疾病的早期治疗和实施有效防控措施。羊痘病毒(sheep pox virus, SPPV)、山羊痘病毒(goat pox virus, GTPV)和块状皮肤病病毒(blocky skin disease virus, LSDV)这3种病毒是世界卫生组织列出的法定报告种,它们给世界范围内的反刍动物养殖业造成了严重的损失。国内学者Nan等<sup>[33]</sup>使用基于简并引物的PCR技术实现了对3种病毒的检测与诊断,为病毒性动物疫病的检测提供了快速的诊断方法。与猪腹泻相关的病毒病原包括猪圆环病毒2型(PCV2)、猪流行性腹泻病毒(porcine circovirus type 2, PEDV)、猪传染性胃肠炎病毒(porcine infectious gastroenteritis virus, TGEV)、猪轮状病毒A(porcine rotavirus A, RVA)和RVC。Nan等<sup>[34]</sup>使用病毒特异性嵌合引物(chimeric primer, CP)进行短循环多重扩增,在通用引物(universal primers, UP)的5'端添加尾巴,然后使用UPs进行通用扩增,设计了5条含有CPs(UP1~5)的简并引

物,并在基于UP的单重PCR(UP-S-PCR)中进行评估,鉴定出了猪腹泻病毒的混合感染,同时及时发现和监测到不同病原体的存在,为流行性病毒的变异监测和疫苗设计提供了重要信息。

此外,由于简并引物的高度选择性和特异性,可以迅速识别目标病毒的存在,例如杨义琴等<sup>[35]</sup>、王波等<sup>[36]</sup>都使用该技术分别成功地检测到低水平的小反刍动物慢病毒前病毒、兔出血病毒,显示出检测灵敏度高的特点。Chassalevris等<sup>[37]</sup>采用寡精胺(阳离子精胺单元)修饰的简并引物结合半巢式实时PCR检测到了小反刍动物慢病毒,提高了检测灵敏度与特异性。有研究发现,结合SYBR Green I实时荧光检测体系,基于3步法检测的基础上,在延伸步骤后增加一步5s的恒温荧光检测,可以实现引物二聚体和特异性扩增产物两者熔解温度之间的优化区分<sup>[24]</sup>。该方法对病毒RNA检测的灵敏度优化至59.6 pg,这是简并PCR技术的创新性应用,对于病毒早期感染的检测和干预具有重要的指导意义,同时也可应用于未来的动物疫情监测和流行病学调查。

### 3.3 简并PCR技术在食品质量安全检测中的应用

在食品质量安全检测中,主要涵盖微生物学分析和化学成分分析2个方面。微生物学分析旨在检测食品中潜在的病原微生物,包括肉类制品、水产品、新鲜牛奶、新鲜蔬果等,以评估其安全性并识别可能存在的致病因子。2004年, Lin等<sup>[38]</sup>成功实现在肉类制品中快速检测沙门氏菌,同时发现在PCR之前若进行8h的预培养步骤,可以检测到低至 $1\sim 9\text{ CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ (mL)的食物样品,且食物本身的微生物群落不会受到检测结果的干扰。步雨珊等<sup>[39]</sup>将疑似含有荧光假单胞菌的牛奶作为检测对象,基于荧光假单胞菌蛋白酶基因 $aprX$ 设计简并引物,并以该区域作为检测靶标,发现了牛奶中危害最大的嗜冷菌微生物荧光假单胞菌,检出限为 $2.57\times 10^3\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。刘继超等<sup>[40]</sup>以常见的能引起食物中毒的病原体金黄色葡萄球菌为研究对象,对其产生的葡萄球菌肠毒素A和金黄色葡萄球菌肠毒素B进行了检测。Dehaut<sup>[41]</sup>针对鱼类腐败的标志性三甲胺变质鱼味,以其编码的特异性标志物 $torA$ 基因作为检测靶标,通过简并引物扩增弧菌和光杆菌 $torA$ 基因,同时利用qPCR法检测整个鱼片储存过程 $torA$ 拷贝数变化,实现了对

加工鱼类的新鲜度表征,克服了鱼类新鲜度检测不及时的问题。Ghazali等<sup>[42]</sup>通过细菌的高度保守序列16S rRNA,对16种常见蔬菜样品中的细菌群落进行检测,检测到了包括蓝细菌门、异常球菌-栖热菌门、放线菌门、变形菌门和厚壁菌门5个门类的细菌种类,其中蓝细菌门在样本中占据主导地位,这一研究实现了对蔬菜样品中潜在病原体的快速检测,为相关疾病的检测与防控提供了重要的科学依据。

化学成分的分析则是为了验证食品中的成分是否符合法规和标准要求,包括营养成分、添加剂使用情况以及重金属残留,以确保食品安全,同时为疾病检测提供必要的技术支持。简并PCR技术对化学成分的检测分析主要以食品中的转基因成分与营养成分为代表。李飞武等<sup>[43]</sup>将转基因作物中常见的8种*Bt*基因作为检测转基因成分的靶标。李葱葱等<sup>[44]</sup>进一步扩大了转基因作物检测的种类,选取使用频次最高的目的基因*cryIA*,检测灵敏度可稳定达到0.1%,*cryIA*基因可作为高效筛选抗虫转基因食品的检测方法,该方法可以同时检测多个转基因成分,为食品中转基因成分的鉴定和食用安全提供了有效工具和保障。Liu等<sup>[45]</sup>通过在狗肉(ATPase 6)、驴肉(tRNA phe 12S rRNA)、狸肉(16S rRNA)、鸡肉(Cytb)、牛肉(Cytb)、猪肉(Cytb)、马肉(Cytb)、兔肉(Cytb)等8种不同肉类的线粒体基因设计检测位点,实现了对多种肉制品成分的检测与区分。Li等<sup>[46]</sup>将检测种类扩大至14种,且检测灵敏度仍能对ng级别DNA进行识别。简并PCR技术在食品质量防控中发挥了重要作用,为确保食品安全和提供早期预警提供了重要技术支持。

### 3.4 简并PCR技术在寄生虫检测中的应用

简并引物也可用于寄生虫检测,但目前应用范围尚不广泛,仍有待进一步探索。王会品等<sup>[47]</sup>应用简并引物介导的qPCR法检测羊肝组织中的细粒棘球绦虫,以线粒体*b*基因作为检测靶基因进行序列分析,然后与肝内的常见寄生虫,如肝片吸虫和莫尼茨绦虫等进行特异性检测验证,结果表明建立的简并引物qPCR法特异性好,扩增效率达92.6%,这为后续棘球绦虫病的检测提供了诊断和分型依据。

### 3.5 简并PCR技术在水产养殖中的应用

病原体感染会给水产养殖业造成严重损失,

采用相关技术对其进行监测对于病原体的预防和控制具有重要意义。如草鱼呼肠孤病毒(grass carp reovirus, GCRV)引起的草鱼出血病是一种严重的病毒性疾病,对养殖鱼类造成了重大经济损失。范玉顶等<sup>[48]</sup>利用一对简并引物设计了一种通用RT-PCR检测方法,可同时检测GCRV的3种基因型,研究表明家养鱼类中草鱼呼肠孤病毒引起的草鱼出血病主要以GCRV I、II、III单一基因型病毒感染为主。此外,还存在部分I、II型的混合感染情况,这一方法的应用克服了使用特异性引物进行分子鉴定的局限性,对于草鱼出血病的早期检测和疾病防控具有重要意义。综上可知,简并PCR技术为水产养殖行业提供了有效的工具和方法,有助于及时发现和控制病害,提高养殖效益和生物安全性。

## 4 简并引物多重PCR存在的问题及对策

当前简并PCR技术广泛应用于多个领域,尽管存在一些问题,但仍有改进的空间,针对目前简并PCR技术存在的问题,可以采取以下改进方法。

### 4.1 引物的设计优化

首先,可以根据目标序列的复杂性和变异性,合理选择引物的简并度,而对于高度保守的区域,可以降低引物的简并度,以提高特异性。其次,精确计算引物的 $T_m$ 值。可通过调整引物长度,从单个引物的5'端去除核苷酸,将核苷酸多样性引入引物库,并缩小简并引物池中引物的 $T_m$ 范围,此外3'端选择性的去除碱基,也能够整体调整引物的 $T_m$ <sup>[11]</sup>;在传统的引物设计中,若要求引物尽可能地匹配目标DNA序列和一些未知序列,则可以统计沿序列每个位置的碱基数目,确定合适的引物长度,调整引物 $T_m$ 值<sup>[49]</sup>。最后,同一PCR中使用多个不同的引物时,可以使用额外的工具(如利用Oligo 7或DNAMAN软件分析评估)提前检查设计的引物,避免引物之间可能发生的交叉杂合。

### 4.2 引物的验证与优化

首先,实验前进行引物的验证与优化,通过进行单独PCR扩增、测序验证等方法,确保引物的特异性与可靠性。其次,使用探针染料标记的通用引物,替代基因分型方法,减少非特异性扩增<sup>[50]</sup>,同时,5'端加入非互补的富含AT序列的方法提高检测灵敏度<sup>[29]</sup>。最后,引物的5'端可以使

用简并碱基,同时3'端采用双脱氧碱基终止的方法也能提高扩增的特异性。

### 4.3 优化PCR条件

首先,实时荧光定量检测中,利用特异性扩增片段的 $T_m$ 值区间,选择一个作为荧光信号采集的温度,以去除非特异性扩增的影响<sup>[24]</sup>。其次,可以在反应体系中加入一定浓度的四甲基氯化铵、甲酰胺、甘油、DMSO、NP-40等<sup>[51,53]</sup>,其中扩增片段>1 kb的产物,可添加DMSO,提高PCR的特异性。最后,采用touchdown PCR,通过调整扩增时引物的 $T_m$ ,前4~5个循环采用低于计算机预计的退火温度5~10℃,往后的循环提高退火温度,以此增加特异性扩增产物和促进简并PCR反应<sup>[4,54]</sup>。

### 4.4 检测样本的准备

首先,以RNA为遗传物质的样品检测中,因RNA易降解,通常在反转录时,需要选择添加ligo-dT得到的cDNA作为简并PCR的模板,否则转录本的3'末端易扩增失败。其次,基因组DNA作模板容易获得,但存在的内含子会影响引物与模板的配对结合,也会导致扩增产物太长不能有效扩增,因此要避开内含子基因编码区域。

### 4.5 引入新技术

结合新兴的分子生物学技术,如高通量测序、数字PCR等,可以提供更准确和可靠的检测结果。

## 5 展望

简并引物的设计经历了HYDEN设计简并引物、给定DNA序列设计最小简并引物、自定义设计最大简并引物、多重迭代引物选择器(multiple iterative primer selector, MIPS)、CodeHoP等算法优化等过程,因此,目前对于设计简并引物并非难题。多项专利与研究成果表明,基于简并引物的PCR技术是一种多样性的基因扩增技术,以简并性引物对高度同源性基因序列进行扩增,可实现即时高效的全覆盖序列分析与扩增,同时能提高反应的特异性和敏感性,简并引物的这种独特优势,是无可替代的。近年来,简并PCR技术在多个研究方向已经得到应用,包括疾病检测、病原体检测、基因组扩增、基因多态性分析和种群遗传学等,而随着现有分子生物学技术的更新与迭代,简并引物展示出更多的发展趋势,如与CRISPR技术相结合,利用简并引物设计的向导RNA,克服了因基因多态性导致的靶向活性降低等问题。由

此可见,简并引物的应用并非停滞不前,也不会被淘汰,而是借助当前成熟的简并引物设计方法,广泛应用于基因研究相关领域,又能与新兴技术方法结合,实现新的研究目标,拓展简并引物的新应用与发展前景。

目前,简并PCR技术尽管已在许多领域得到了广泛的应用,但仍存在一些挑战和改进空间。如目前仍缺乏简并引物设计的相关标准,可能有以下原因。①在设计简并引物时,需要考虑到可能的序列组合,同时确保引物的特异性。这种复杂性和难度使简并引物的设计并非简单地追求低简并性或高简并性,而是需要根据具体实验目的来确定引物简并性的适应程度。②由于不同实验室、不同研究领域对简并引物的要求不同,缺乏统一的设计标准也导致了标准化困难。尽管目前尚未有统一的标准,但简并PCR技术可实现对具有较高同源性基因序列的检测,同时通过简并引物的设计或者将其与其他技术联合使用,可以解决上述问题。另一方面,这些问题也为未来简并PCR技术的发展提供了方向。首先,简并PCR技术在引物设计和优化方面要更注重提高特异性,避免与非目标序列发生杂交,以确保PCR反应的准确性与可靠性。其次,随着计算机技术的发展,可以借助生物信息学工具和算法设计更精准、更高效的简并引物,提高PCR的效率和成功率。总体而言,简并PCR技术是一项具有长期应用前景的技术,其优势远远超过其局限性。

由于简并引物涉及碱基的简并性,其发展与基因序列分析领域密切相关,借助当前已有的研究成果和技术方法,既能在已知研究领域发挥技术优势,又能根据原理及适用性与新兴技术方法结合,如基因组学、转录组学、蛋白组学等,未来也可能在药物研发、疾病诊断等方面得到进一步拓展。总之,简并PCR技术在分子生物学研究和临床诊断中具有广泛的应用,相信通过不断改进和创新,简并PCR技术将继续在各个领域发挥作用,为研究者提供更准确、高效和全面的分子生物学工具,进而推动科学研究和医学诊断的发展。

### 参 考 文 献

- [1] 钱佳婕,黄迪,徐颖华,等. 食源性致病微生物检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报,2021,12(12):4775-4785.  
QIAN J J, HUANG D, XU Y H, et al. Research progress of de-

- tection technologies for foodborne pathogens[J]. *J. Food Saf. Qual.*, 2021, 12(12): 4775-4785.
- [2] MARKOULATOS P, SIAFAKAS N, MONCANY M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach[J]. *J. Clin. Lab. Anal.*, 2002, 16(1): 47-51.
- [3] RAJALAKSHMI S. Different types of PCR techniques and its application[J]. *Int. J. Pharm. Chem. Biol. Sci.*, 2017, 7(3): 285-292.
- [4] 史兆兴,王恒禄,苏国富,等. 简并PCR及其应用[J]. *生物技术通讯*, 2004, 15(2): 172-175.  
SHI Z X, WANG H L, SU G F, *et al.* 简并PCR及其应用[J]. *Lett. Biotechnol.*, 2004, 15(2): 172-175.
- [5] JORDAN B, CHAREST A, DOWD J F, *et al.* Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, 99(5): 2942-2947.
- [6] NAYAK S N, BALAJI J, UPADHYAYA H D, *et al.* Isolation and sequence analysis of DREB2A homologues in three cereal and two legume species[J]. *Plant Sci.*, 2009, 177(5): 460-467.
- [7] GUYADER F L, ESTES M K, HARDY M E, *et al.* Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses[J]. *Arch. Virol.*, 1996, 141(11): 2225-2235.
- [8] CHANG T J, HSIA C Y, CHAU G Y, *et al.* Characterization of androgen receptor complex associated protein (ARCAP) in hepatocellular carcinoma and liver[J]. *J. Chin. Med. Assoc.*, 2021, 84(12): 1100-1108.
- [9] 杨怀涛,杨秀英. 检测HPV的新策略:简并引物PCR[J]. *国外医学·临床生物化学与检验学分册*, 1994, 15(2): 71-73.  
YANG H T, YANG X Y. A new strategy for HPV detection-degenerate primer PCR[J]. *Foreign Med. Sci.*, 1994, 15(2): 71-73.
- [10] 侯林,李楠,伊男,等. 中国卤虫早期胚胎发育相关基因的研究: *Orthodenticle* 基因克隆中简并引物的设计和优化[J]. *辽宁师范大学学报(自然科学版)*, 2009, 32(1): 98-101.  
HOU L, LI N, YI N, *et al.* A study on the related genes of early embryonic development of *Artemia sinica*: degenerate PCR primer design and improvement for *Artemia sinica Orthodenticle* clone[J]. *J. Liaoning Norm. Univ. Nat. Sci. Ed.*, 2009, 32(1): 98-101.
- [11] NAQIB A, JEON T, KUNSTMAN K, *et al.* PCR effects of melting temperature adjustment of individual primers in degenerate primer pools [J/OL]. *PeerJ*, 2019, 7: e6570[2024-0306]. <https://peerj.com/articles/6570/>.
- [12] SAS M A, VINA-RODRIGUEZ A, MERTENS M, *et al.* A one-step multiplex real-time RT-PCR for the universal detection of all currently known CCHFV genotypes[J]. *J. Virol. Meth.*, 2018, 255: 38-43.
- [13] 王依,胡丹,钟璟皓,等. 基于序列非依赖性扩增技术发现未知病毒的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2016, 27(4): 576-581.  
WANG Y, HU D, ZHONG J H, *et al.* Discover unknown viruses based metagenomics sequence-independent amplification[J]. *Lett. Biotechnol.*, 2016, 27(4): 576-581.
- [14] CHOI S, KIM K W, KU K B, *et al.* Human alphacoronavirus universal primers for genome amplification and sequencing [J/OL]. *Front. Microbiol.*, 2022, 13: 789665[2024-06-17]. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.789665>.
- [15] 王少峡,陈丽媛,张竞秋,等. 利用生物信息学资源设计简并引物[J]. *天津师范大学学报(自然科学版)*, 2006, 26(2): 26-29.  
WANG S X, CHEN L Y, ZHANG J Q, *et al.* Designing the degenerate primers with bioinformatics resource[J]. *J. Tianjin Norm. Univ. Nat. Sci. Ed.*, 2006, 26(2): 26-29.
- [16] LINHART C, SHAMIR R. The degenerate primer design problem: theory and applications[J]. *J. Comput. Biol.*, 2005, 12(4): 431-456.
- [17] JOHN G D, PAUL K, ANTHONY W R. Virus detection using degenerate PCR primers: W0099130[P]. 2002-06-07.
- [18] RECTOR A, TACHEZY R, VAN RANST M. A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification[J]. *J. Virol.*, 2004, 78(10): 4993-4998.
- [19] HO T, TZANETAKIS I E. Development of a virus detection and discovery pipeline using next generation sequencing[J]. *Virology*, 2014, 471-473: 54-60.
- [20] 胡群,倪红霞. 应用一致简并引物RT-PCR检测手足口病患者粪便肠道病毒[J]. *中国国境卫生检疫杂志*, 2017, 40(4): 239-241+292.  
HU Q, NI H X. Detection and genotyping of enterovirus in feces of HFMD patients by consensus degenerate hybrid oligonucleotide primers RT-PCR[J]. *Chin. J. Front. Health Quar.*, 2017, 40(4): 239-241+292.
- [21] 郭华,丁惠,李慧娟,等. 儿童病毒性脑膜炎、脑炎中肠道病毒感染分子生物学分型检测及临床研究[J]. *实用临床医药杂志*, 2016, 20(1): 35-38.  
GUO H, DING H, LI H J, *et al.* Molecular biology typing and clinical research of enterovirus infection in children with viral meningitis/encephalitis[J]. *J. Clin. Med. Pract.*, 2016, 20(1): 35-38.
- [22] 吴瑶,吴亮,阴晴,等. 6对通用引物检测不同型别人乳头瘤病毒效果分析[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2019, 29(5): 405-409.  
WU Y, WU L, YIN Q, *et al.* Detection efficacy of 6 universal primers in different types of papillomavirus[J]. *J. Jiangsu Univ. Med. Ed.*, 2019, 29(5): 405-409.
- [23] FORSLUND O, ANTONSSON A, NORDIN P, *et al.* A broad range of human papillomavirus types detected with a general PCR method suitable for analysis of cutaneous tumours and normal skin[J]. *J. Gen. Virol.*, 1999, 80 (Pt 9): 2437-2443.
- [24] 胡群,邹春颖,马思杰. 沙粒病毒属四步法一致简并杂合寡核苷酸引物实时荧光PCR检测体系的建立[J]. *中国媒介生物学及控制杂志*, 2016, 27(3): 248-252.  
HU Q, ZOU C Y, MA S J. Development of CODEHOP 4-step program realtime PCR to detect Arenaviruses in rodents[J]. *Chin. J. Vector Biol. Contr.*, 2016, 27(3): 248-252.
- [25] CHU D K W, PAN Y, CHENG S M S, *et al.* Molecular diagnosis of a novel coronavirus (2019-nCoV) causing an outbreak of Pneumonia[J]. *Clin. Chem.*, 2020, 66(4): 549-555.
- [26] HOFFMANN E, STECH J, GUAN Y, *et al.* Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses [J]. *Arch. Virol.*, 2001, 146(12): 2275-2289.
- [27] HARKNESS A, MATTHEWS Q L, SMITH L, *et al.* Optimization of universal primer set for the identification of all influenza A viruses using real-time PCR[J/OL]. *BioRxiv*, 2022, doi: 10.1101/2022.08.30.505914[2024-06-15]. <https://doi.org/10.1101/>

- 2022.08.30.505914.
- [28] NANDA S, JAYAN G, VOULGAROPOULOU F, *et al.*. Universal virus detection by degenerate-oligonucleotide primed polymerase chain reaction of purified viral nucleic acids[J]. *J. Virol. Meth.*, 2008, 152(1-2): 18-24.
- [29] 廖富荣,陈红运,沈建国,等. 香石竹斑驳病毒属简并引物 RT-PCR 检测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2023, 56(12): 2288-2301.  
LIAO F R, CHEN H Y, SHEN J G, *et al.*. Development of a degenerate primer RT-PCR assay for detection of carmovirus[J]. *Sci. Agric. Sin.*, 2023, 56(12): 2288-2301.
- [30] KUBOTA K, CHIAKI Y, YANAGISAWA H, *et al.*. Novel degenerate primer sets for the detection and identification of emaraviruses reveal new chrysanthemum species[J/OL]. *J. Virol. Methods*, 2021, 288: 113992[2024-06-17]. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113992>.
- [31] DIGIARO M, ELBEAINO T, MARTELLI G P. Development of degenerate and species-specific primers for the differential and simultaneous RT-PCR detection of grapevine-infecting nepoviruses of subgroups A, B and C[J]. *J. Virol. Methods*, 2007, 141(1): 34-40.
- [32] TSENG Y W, WU C F, LEE C H, *et al.*. Universal primers for rapid detection of six poospiviroids in Solanaceae plants using one-step reverse-transcription PCR and reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification[J]. *Plant Dis.*, 2021, 105(10): 2867-2872.
- [33] NAN W, GONG M, LU Y, *et al.*. A novel triplex real-time PCR assay for the differentiation of lumpy skin disease virus, goatpox virus, and sheeppox virus[J/OL]. *Front. Vet. Sci.*, 2023, 10: 1175391[2024-06-19]. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1175391>.
- [34] NAN P, WEN D, OPRIESSNIG T, *et al.*. Novel universal primer-pentaplex PCR assay based on chimeric primers for simultaneous detection of five common pig viruses associated with diarrhea[J/OL]. *Mol. Cell. Probes*, 2021, 58: 101747[2024-06-18]. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2021.101747>.
- [35] 杨义琴. 小反刍动物慢病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立和初步应用[D]. 新疆石河子:石河子大学, 2018.
- [36] 王波,李桂黎,王印,等. 兔出血症病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及初步应用[J]. *浙江农业学报*, 2016, 28(3): 400-405.  
WANG B, LI G L, WANG Y, *et al.*. Establishment and application of SYBR Green I real-time PCR for detection of rabbit hemorrhagic disease virus[J]. *Acta Agric. Zhejiangensis*, 2016, 28(3): 400-405.
- [37] CHASSALEVRIS T, CHAINTOUTIS S C, APOSTOLIDI E D, *et al.*. A highly sensitive semi-nested real-time PCR utilizing oligospermine-conjugated degenerate primers for the detection of diverse strains of small ruminant lentiviruses[J/OL]. *Mol. Cell. Probes*, 2020, 51: 101528[2024-06-17]. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101528>.
- [38] LIN C K, HUNG C L, HSU S C, *et al.*. An improved PCR primer pair based on 16S rDNA for the specific detection of *Salmonella* serovars in food samples[J]. *J. Food Prot.*, 2004, 67(7): 1335-1343.
- [39] 步雨珊,乔文君,黄冬成,等. 聚合酶链式反应技术快速检测原料乳中荧光假单胞菌[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(15): 4766-4772.  
BU Y S, QIAO W J, HUANG D C, *et al.*. Rapid detection of *Pseudomonas fluorescens* in raw milk based on polymerase chain reaction assay[J]. *J. Food Saf. Qual.*, 2022, 13(15): 4766-4772.
- [40] 刘继超,陈柏儒,姜铁民,等. 利用简并引物检测金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 基因[J]. *食品与机械*, 2015, 31(5): 59-61.  
LIU J C, CHEN B R, JIANG T M, *et al.*. Research on degenerate primers for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A, B gene[J]. *Food Mach.*, 2015, 31(5): 59-61.
- [41] DEHAUT A, KRZEWINSKI F, GRARD T, *et al.*. Monitoring the freshness of fish: development of a qPCR method applied to MAP chilled whiting[J]. *J. Sci. Food Agric.*, 2016, 96(6): 2080-2089.
- [42] GHAZALI N S H, RASHID N H A. Molecular identification of bacterial communities from vegetables samples as revealed by DNA sequencing of universal primer 16sRNA gene[J]. *Int. J. Med. Sci.*, 2019, 4 (1): 19-26.
- [43] 李飞武,闫伟,龙丽坤,等. 应用多重 PCR 技术筛选检测转 Bt 基因作物[J]. *现代食品科技*, 2014, 30(5): 262-266+124.  
LI F W, YAN W, LONG L K, *et al.*. Screening detection of Bt genes in genetically modified crops using a multiplex PCR assay[J]. *Mod. Food Sci. Technol.*, 2014, 30(5): 262-266+124.
- [44] 李葱葱,闫伟,夏蔚,等. 应用简并 PCR 方法检测转 cryIA 基因作物[J]. *食品科学*, 2018, 39(14): 317-322.  
LI C C, YAN W, XIA W, *et al.*. Detection of genetically modified crops with cryIA gene by PCR with degenerate primers[J]. *Food Sci.*, 2018, 39(14): 317-322.
- [45] LIU W, TAO J, XUE M, *et al.*. A multiplex PCR method mediated by universal primers for the identification of eight meat ingredients in food products[J]. *Eur. Food Res. Technol.*, 2019, 245(11): 2385-2392.
- [46] LI J, LI J, XU S, *et al.*. A rapid and reliable multiplex PCR assay for simultaneous detection of fourteen animal species in two tubes[J]. *Food Chem.*, 2019, 295: 395-402.
- [47] 王会品,李欣,孙世珺. 简并引物 qPCR 法检测新疆喀什地区羊肝组织中细粒棘球绦虫[J]. *广东医学*, 2022, 43(1): 46-50.  
WANG H P, LI X, SUN S J. Detection of *Echinococcus granulosus* in sheep liver from Kashi region of Xinjiang by degenerate primer qPCR method[J]. *Guangdong Med. J.*, 2022, 43(1): 46-50.
- [48] 范玉顶,马杰,周勇,等. 不同基因型草鱼呼肠孤病毒通用 RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(6): 9-16.  
FAN Y D, MA J, ZHOU Y, *et al.*. Establishment and application of a universal RT-PCR assay for detection of different genotype grass carp reovirus[J]. *Freshw. Fish.*, 2018, 48(6): 9-16.
- [49] LIU R, NING J, JIANG Y, *et al.*. A method for degenerate primer design based on artificial bee colony algorithm[J/OL]. *Appl. Sci.*, 2022, 12(10): 4992[2024-06-17]. <https://doi.org/10.3390/app12104992>.
- [50] DE ARRUDA M P, GONÇALVES E C, SCHNEIDER M P, *et al.*. An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications[J]. *Mol. Biol.*

- Rep., 2010, 37(4): 2031-2036.
- [ 51 ] VARADARAJ K, SKINNER D M. Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases[J]. *Gene*, 1994, 140(1): 1-5.
- [ 52 ] JANG M, KIM S. Inhibition of non-specific amplification in loop-mediated isothermal amplification via tetramethylammonium chloride[J]. *Biochip J.*, 2022, 16(3): 326-333.
- [ 53 ] KOVÁROVÁ M, DRÁBER P. New specificity and yield enhancer of polymerase chain reactions[J/OL]. *Nucleic Acids Res.*, 2000, 28(13): E70[2024-06-19]. <https://doi.org/10.1093/nar/28.13.e70>.
- [ 54 ] 朱晓静,戴忠敏. 利用抑制性PCR提高兼并引物扩增效率及特异性[J]. *杭州师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 14(6): 581-584.
- ZHU X J, DAI Z M. Enhance the amplification efficiency and specificity of degenerate primers with suppression PCR[J]. *J. Hangzhou Norm. Univ. Nat. Sci. Ed.*, 2015, 14(6): 581-584.