

PCR 技术应用的新进展

张红缨 张 今

(吉林大学酶工程国家重点实验室, 长春 130023)

摘要 近年来, 随着 PCR 技术方法学的逐步改进和完善, 更加显示出它的实用性. 这不仅扩大了其用武之地, 也促进了分子生物学的快速发展. 文章着重介绍 PCR 在基因工程和蛋白质工程应用中的某些新进展, 包括不需连接的克隆技术、随机引导/定位 PCR、cDNA 末端随机快速扩增、重组 PCR 和大引物 PCR.

关键词 PCR 技术, 基因, UDG 克隆, 引物

PCR (polymerase chain reaction) 技术一经问世, 便迅速地被应用于分子生物学、医学等领域. 最初, 仅是用于实验室条件下扩增目的基因, 或作为一种手段用于医学诊断和法医鉴定.

现在, PCR 技术已成为分子生物学中强有力的工具之一^[1], 并正在开拓新的应用领域, 许多新方法相继脱颖而出, 本文就此介绍

如下.

1 不需连接的克隆技术

限制性核酸内切酶和 DNA 连接酶的发现给基因工程的诞生提供了前提, 但它们的应用仍然受到某些限制. 例如, 靶基因附近不存在合适的识别位点, 或者其基因中某位点过多, 以及连接易出现载体背景等. 最近, 两个独立

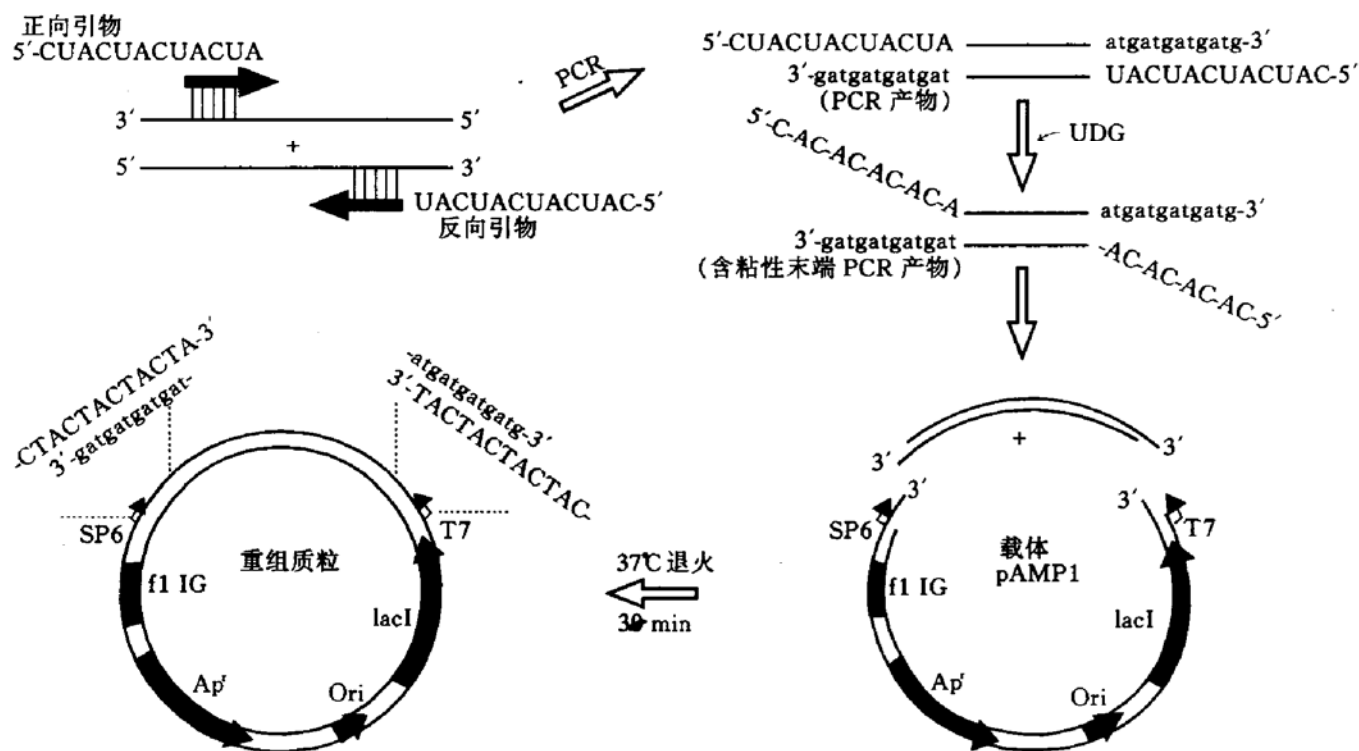


图 1 UDG 克隆法示意图

的研究小组分别报道了不需连接的克隆方法, 解决了上述问题. 两个方法均涉及在 PCR 扩增的 DNA 片段末端产生 10~12 bp 的粘性末端, 此末端可与含同样末端的载体退火, 不需连接而直接用于转化. Aslanidis^[2] 利用 T4DNA 多聚酶的 3' 外切酶活性, 消化 PCR 产物的 3' 端, 产生 5' 延长的末端. 另一方法^[3,4] 是利用尿嘧啶糖苷化酶 (uracil DNA glycosylase, UDG) 产生粘性末端 (图 1), 故称 UDG 克隆. 该法的特点是, 用于 PCR 反应的引物 5' 侧含脱氧尿嘧啶, 结果使 PCR 产物也具有这样的结构, 经 UDG 酶解而移去其中的脱氧尿嘧啶后, 该部分单链被水解, 产生 3' 延长的 PCR 产物. 一些应用实例^[4~6] 证明, 该法重组效率比需连接作用的鸟枪法约高 10 倍. 用 1 μ g 重组质粒可获得 $10^5 \sim 10^7$ 个转化子, 0.1 ng 重组质粒可获得 >98% 的阳性转化子 (表 1), 并且对于不同长度的片段同样有效. Rashtchian^[4] 用此法克隆了 2.5 kb 的 DNA 片

段. 另外, 用此法还构建出一些新的克隆载体^[5,7~11]. 由于 UDG 克隆法的高效性, 又不存在载体背景, 可使 PCR 反应循环数降至 8~10, 故可减少由 Taq DNA 多聚酶的低真实性所引起的突变.

表 1 不同浓度的插入片段对 UDG 克隆效率的影响

片段浓度/ng	阳性转化子/%
1.00	99.6
0.10	97.8
0.01	56.8
0.00	0.0

2 随机引导/定位 PCR

随机引导/定位 PCR (random-primed/anchored PCR, RPA-PCR) 是 UDG 克隆法的发展 (图 2).

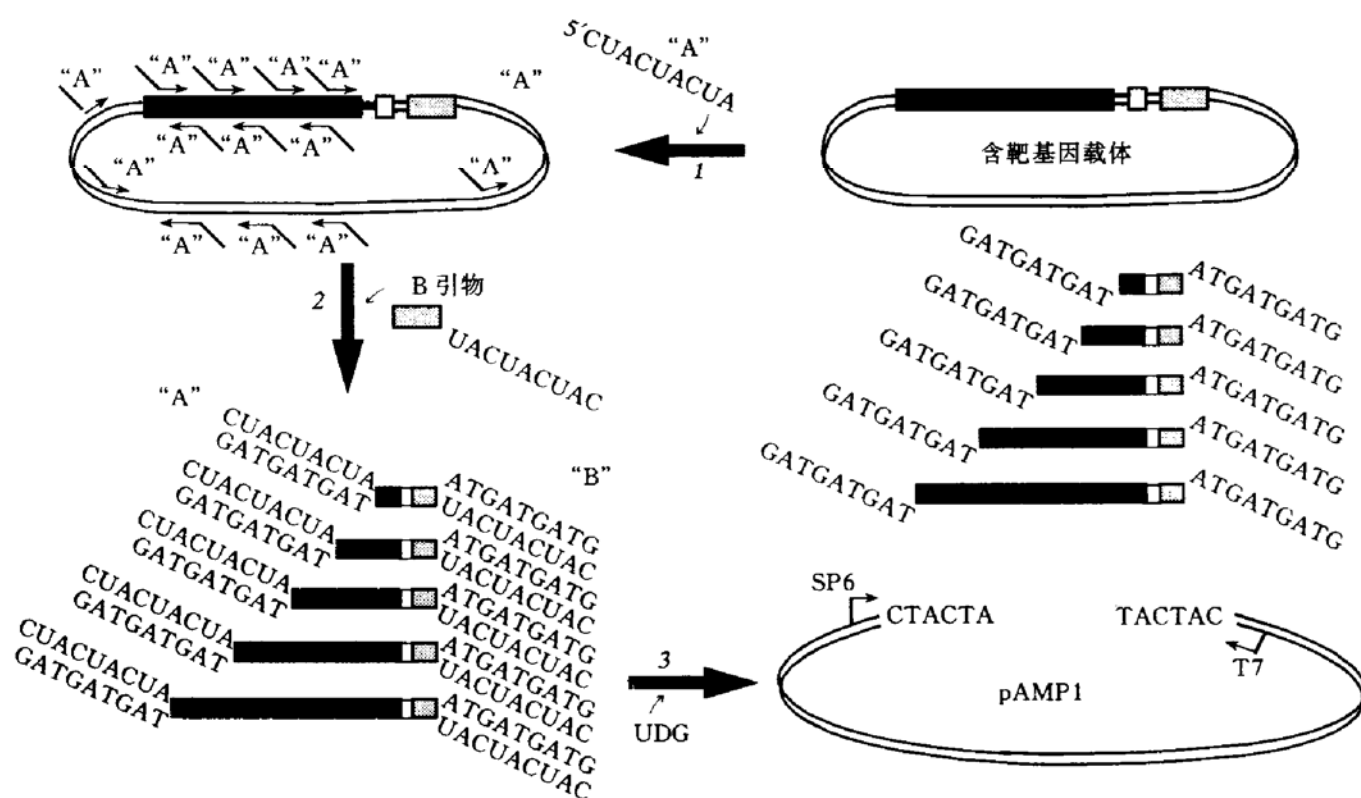


图 2 随机引导/定位 PCR 示意图

1: 一套 A 引物的随机引导合成; 2: PCR 反应; 3: UDG 酶解产生与重组载体互补的粘性末端;

“A”: A 引物的 5' 末端顺序; ■: 特定顺序.

所谓“随机引导”，即是首先随机引导合成一套 5' 侧具有确定顺序、并含脱氧尿嘧啶的引物，引物 3' 侧顺序则是靠加入等量四种单核苷酸随机合成的。所谓“定位”，即是在随后的 PCR 反应中，配合另一端（即位置固定）的一个具有特定顺序，并 5' 侧也含有脱氧尿嘧啶的引物，进行扩增，再经 UDG 克隆，便产生一套“巢式缺失”（nested deletion）克隆^[12]。该法适用于快速 DNA 测序、基因漫步（gene walking）、结构域绘图（domain mapping）和基因的其他功能分析。并可从质粒、λ 载体以及更复杂的基因组选择性扩增 DNA 片段，还可用于真核生物基因启动子调节区的缺失分析等。

3 cDNA 末端随机快速扩增

UDG 克隆法的另一个引深是 cDNA 末端随机快速扩增（random rapid amplification of

cDNA ends, random RACE)^[13]。该法是利用一个 5' 引物，从众多的 mRNA 提取物中，首先合成出一套相应的 cDNA，再利用一个含 CAG 重复序列的引物和另一个 5' 端引物，从这套 cDNA 中选择性地扩增出含 CAG 重复的基因。可见，该法适用于筛选和钓取未知序列的基因片段，以及从痕迹量 mRNA 获取特定的 cDNA。

4 重组 PCR

Booth^[10]将 UDG 法应用于克隆人纤毛亲神经因子（human ciliary neurotrophic factor, CNTF）基因。该基因被一个内含子分成两段。通过设计含脱氧尿嘧啶的部分重叠引物，将两个基因片段分别进行 PCR 扩增，用 UDG 处理混合的 PCR 产物，两产物互补区退火，便得到完整的 CNTF 基因（图 3）。这就是“重组 PCR”（recombinant PCR）。

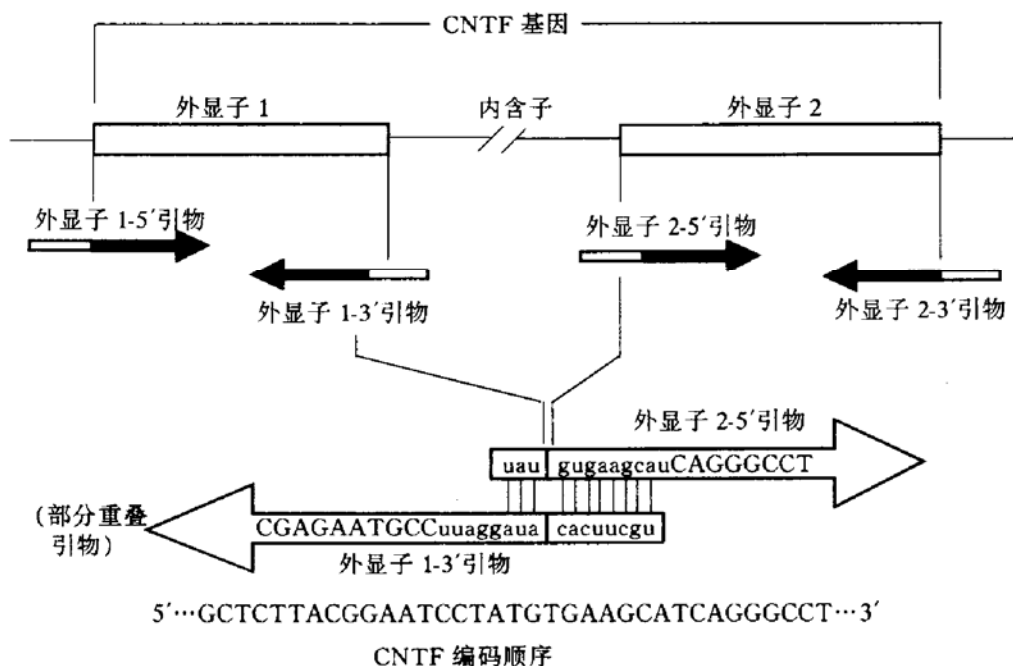


图 3 用重组 PCR 技术克隆人纤毛亲神经因子（CNTF）基因

该法应用于抗体工程，可产生抗体的重组 cDNA 库、嵌合抗体和类人化抗体（humanized antibody）。

除了用于组建天然基因外，重组 PCR 技术还适用于制备合成基因。因为通常无法一次

完成一个长基因的合成。

5 大引物 PCR

“大引物”（megaprimer）法是至今在体外进行定位诱变的最简单、最实用的方法之

—^[14]. 它利用了三个引物和两次 PCR 扩增 (图 4). A 和 B 引物仍含有脱氧尿嘧啶. 由于在第二次 PCR 反应中, 采用了大引物 (第一次 PCR 反应的产物), 故几乎 100% 的产物含所需的突变.

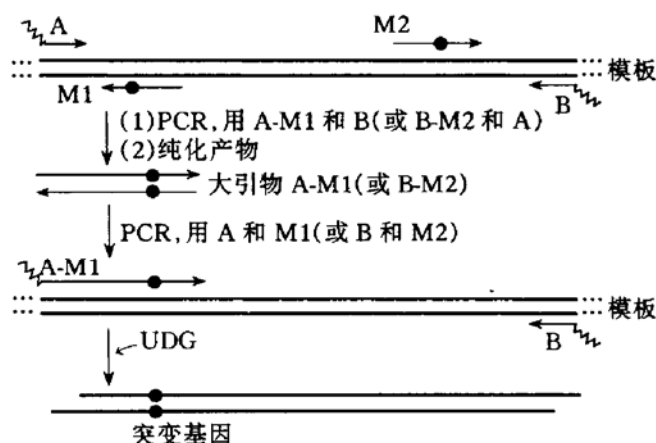


图 4 大引物 PCR 技术用于定位诱变

●: 突变位点.

若待突变基因已装入质粒载体, 则设计一对含突变碱基的重叠引物, 用脱氧尿嘧啶取代其中部分或全部胸腺嘧啶. PCR 扩增后, 完整环状质粒成为等长的线性片段, UDG 酶解而产生的互补末端退火, 则自动成环, 成为含突变的新质粒, 直接用于转化 (图 5). 若所用质粒太长, 不能被完整地扩增, 也可分两段进行.

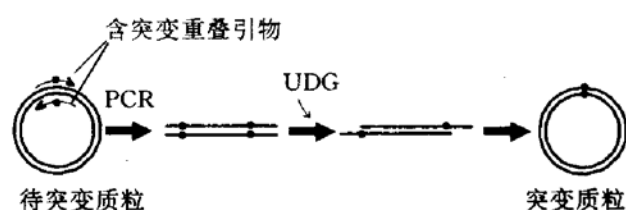


图 5 UDG 法在质粒上直接定位诱变

●: 突变位点.

尽管大多数研究者希望 PCR 反应准确无误, 但低真实性的也是有用的. 通过控制产生低真实性的条件, 可以获得某些随机突变^[15,16]. 若配合“DNA 缓慢移动 (DNA shuffling)”^[17], 可在体外进行蛋白质的快速分子进化. 这是改造天然蛋白质, 并获得新活性蛋

白质的重要方法.

综上所述, 由于 PCR 技术的发展, 在基因工程和蛋白质工程的应用中, 不仅提高了效率和真实性, 而且增强了灵活性和实用性. 人们可不再为待操作的 DNA 片段上无合适的, 或存在多个相同的酶切位点而苦恼, 也不必考虑限制性酶识别位点的结构特征, 便可在任意点处连接任意长度^[18]的 DNA 片段. 因此, PCR 方法学的改进给分子生物学工作者带来了极大的方便. 我们相信, 随着分子生物学的发展, PCR 技术将得到普及和深化. 越来越多的新基因、新蛋白质必将应运而生. 造福于人类的新生物产品也将陆续问世. 酶、蛋白质以及核酸的理论研究和实际应用都将步入一个崭新的阶段.

参 考 文 献

- 1 Erlich H A, Gelfand D, Sninsky J J *et al.* Science, 1991; 252: 1543
- 2 Aslanidis C, De Jong P J. Nucleic Acids Res, 1991; 18: 6069
- 3 Nisson P C, Rashtchian A, Watkins P C. PCR Methods Appl, 1991; 1: 120
- 4 Rashtchian A, Buchman G, Schuster D *et al.* Anal Biochem, 1992; 206: 91
- 5 Buchman G W, Schuster D M, Rashtchian A. Focus, 1992; 14: 41
- 6 Davis R E, Singh H, Botka C *et al.* J Biol Chem, 1994; 269: 20026
- 7 Buchman G W, Booth P, Rashtchian A. Focus, 1993; 15: 36
- 8 Nisson P E, Hadley R G, Watins P C *et al.* Focus, 1993; 15: 26
- 9 Anderson B, Povinelli C M, Wentland M A *et al.* Anal Biochem, 1994; 218: 300
- 10 Booth P M, Buchman G M, Rashtchian A. Gene, 1994; 146: 303
- 11 Hanzlik A J, Osemlak-Hanzlik M, Kurhit D M. Gene, 1992; 122: 171
- 12 Witcomb J M, Rashtchian A, Hughes S H. Nucleic Acids Res, 1993; 21: 4143
- 13 Carney J P, Mcknight C, van Epps S *et al.* Gene, 1995; 155: 289
- 14 Barik S. Mol Biotech, 1995; 3: 1

- 15 Caqdwel R C, Joyce G F. PCR Methods Appl, 1992; 2: 28
- 16 Arnold F H. FASEB J, 1993; 7: 744
- 17 Stemmer W P C. Nature, 1994; 370: 389
- 18 Cheng S, Fockler C, Barnes W M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 5695

Advances of PCR Technique in Application.

Zhang Hongying, Zhang Jin (State Key Laboratory of Enzyme Engineering, Jilin University, Changchun 130023, China).

Abstract In recent years PCR technique has shown its advantages and flexibility with the

development of its methodology. This not only extended its application, but also promoted the rapid development of molecular biology. The advances of PCR used in gene and protein engineering are reported here, including ligation-independent cloning, random-primed/anchored PCR, random rapid amplification of cDNA ends, recombinant PCR and megaprimer PCR.

Key words PCR technique, gene, UDG cloning, primer

端粒与端粒酶研究进展

杨学辉 冯威健¹⁾ 温进坤

(河北医科大学生化教研室, 石家庄 050017)

摘要 细胞分裂中染色体因其末端(端粒)的 DNA 不能完全复制而短缩, 使细胞逐渐失去增殖能力而衰老。端粒酶可延长染色体末端 DNA, 端粒酶的活化使细胞无限增殖。85%左右的恶性肿瘤端粒酶表达阳性, 生殖细胞和无限繁殖的细胞系中端粒酶表达也呈阳性。文章综述了端粒的构成和功能、端粒酶在端粒合成中的作用, 介绍了端粒酶活性的测定方法、细胞恶变与端粒酶激活的关系, 并论及通过抑制端粒酶活性来治疗癌症的可能性。

关键词 端粒, 端粒酶, 恶性肿瘤

一般认为癌症是由基因多位点突变引起细胞的生长失控造成的。不同的癌症, 其突变发生于特定部位的特异性基因。然而最新的研究表明, 端粒酶(telomerase)激活在细胞癌变过程中发挥重要作用。细胞连续分裂过程中, 染色体末端(即端粒, telomere)的 DNA 不能复制, 导致染色体逐渐短缩, 失去稳定性。这一所谓“末端复制问题”可被端粒酶的 DNA 聚合活性所解决。与其他 DNA 聚合酶不同, 端粒酶是由 RNA 和蛋白质组成的核蛋白(RNP)^[1,2]。利用高灵敏度的酶活性分析法可在绝大部分恶性肿瘤和无限增殖的细胞系中检测到端粒酶活性, 而良性肿瘤细胞中测不出此酶活性。这表明端粒酶在肿瘤恶变的过程中起着重要作用, 有可能成为癌症治疗的新靶点。

本文将综述端粒与端粒酶研究的最新进展。

1 端粒及端粒序列

本世纪三四十年代 Muller^[3]首先发现染色体末端或端粒是维持染色体完整所必需的。之后, Blackburn 等^[4]报道: 四膜虫端粒是 5'-GGGGTT-3' 的连续重复序列, 并且每条染色体的端粒重复单位的重复次数不同。其他生物也存在类似的端粒重复序列^[5]。端粒重复序列位于染色体 DNA 的 3' 末端, 长约 5~8 bp, 富含 G。人的端粒重复单位是 5'-TTAGGG-3', 重复长达 15 kb^[6]。

¹⁾河北医科大学第四医院肿瘤内科。