

综述与专论

分子信标核酸检测技术研究进展

陈忠斌 王升启 孙志贤

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 介绍了分子信标设计和分子信标核酸检测原理、技术特性和在基因突变大规模自动化检测中的应用。分子信标是一种基于荧光共振能量转移现象设计的发卡型寡核苷酸探针, 空间结构上呈茎环结构, 环序列是与靶核酸互补的探针, 茎序列由与靶序列无关的互补序列构成, 茎的一端连上荧光分子, 另一端连上淬灭分子。通过空间结构改变决定分子信标发射荧光特性, 从而对核酸进行定量检测。分子信标技术具有操作简单、敏感、特异、可对核酸进行液相实时检测和对活体内核酸动态进行检测等特点, 已应用于 HIV 辅助受体基因等基因突变的大规模自动化检测, 是一种新型核酸定量检测技术。

关键词 分子信标, 荧光共振能量转移, 液相实时检测, 基因突变检测

学科分类号 Q523

随着疾病分子生物学特别是人类基因组研究取得突破性进展, 人类疾病的分子机制研究证明, 人类主要疾病如癌症、心血管疾病、微生物感染甚至肥胖、糖尿病和自杀等均是由基因或其表达异常引起; 基因表达研究、药物筛选、药效学评价和致病基因检测诊断等都与核酸定量检测有关。因此, 在生物医学研究和疾病临床诊断中基因的定量检测具有重要的理论意义与应用价值。

目前核酸检测常用的方法有 DNA 印迹、RNA 印迹和 PCR 等。这些方法操作中的一个共同点是必须把未杂交的探针和引物与杂交体分离后才能借助其他信号对靶核酸进行检测, 操作繁琐复杂, 费时, 技术难度大, 而且难以对核酸进行准确定量检测, 更不能对活体内的核酸进行研究。本文介绍最近发展起来的一种操作简单、敏感、特异、可对核酸进行实时(real-time)检测, 同时也可应用于活体内核酸动态检测的分子信标技术。

1 分子信标的设计和作用原理

分子信标(molecular beacon)是根据酸碱基配对原则和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)现象设计的。FRET 是一种非常有趣的荧光现象^[1]。当一个荧光分子(又称为供体分子)的荧光光谱与另一个荧光分子(又称为受体分子)的激发光谱相重叠时, 供体荧光分子的激发能诱发受体分子发出荧光, 同时供体荧光分子自身的荧光强度衰减, 这种现象即是荧光 FRET。FRET 程度与供、受体分子的空间距离紧密相关, 一般为 7~10 nm 时即可发生 FRET; 随着距离延长, FRET 呈 10^6 显著减弱。FRET 现象已广泛应用于生物大分子内和分子间相互作用等生物学研究^[2]。

分子信标是基于 FRET 现象设计的一段

与特定核酸互补的寡核苷酸探针 (图 1)^[3]. 分子信标长约 25 nt, 在空间结构上呈茎环结构, 其中环序列是与靶核酸互补的探针; 茎长约 5~7 nt, 由与靶序列无关的互补序列构成; 茎的一端连上一个荧光分子, 另一端连上一个淬灭分子 (quencher). 当无靶序列存在时, 分子信标呈茎环结构, 茎部的荧光分子与淬灭分子非常接近 (7~10 nm), 即可发生 FRET. 荧光分子发出的荧光被淬灭分子吸收并以热的形式散发, 此时检测不到荧光信号; 当有靶序列存在时, 分子信标的环序列与靶序列特异性结合, 形成的双链体比分子信标的茎环结构更稳定, 荧光分子与淬灭分子分开, 此时荧光分子发出的荧光不能被淬灭分子吸收, 可检测到荧光 (图 2).

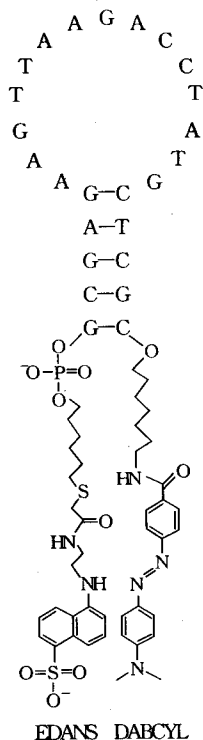


图 1 分子信标的结构

常用的荧光-淬灭分子对是 5'-(2'-氨基-2-萘基-1-磺酸) (EDANS) 和 4'-(4'-二甲基氨基叠氮苯) 苯甲酸 (DABCYL)^[3]. 当受到 336 nm 紫外光激发时, EDANS 发出波长为

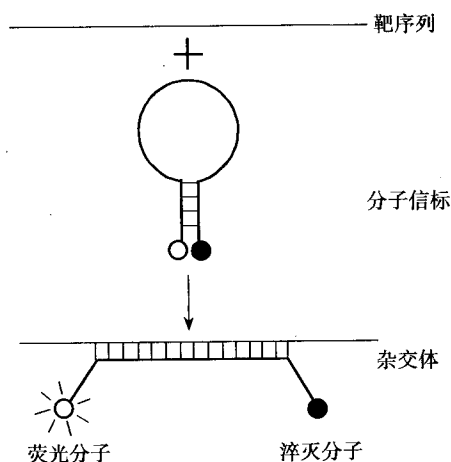


图 2 分子信标核酸检测原理

490 nm 的亮蓝荧光; DABCYL 是非荧光分子, 但其吸收光谱与 EDANS 的发射荧光光谱重叠. 只有分子信标时, EDANS 和 DABCYL 距离非常接近足以发生 FRET, EDANS 受激发产生的荧光转移给 DABCYL 并以热的形式散发, 不能检测到荧光; 相反, 当有靶核酸时即可检测到荧光.

实验证实^[3,4], 把分子信标加入核酸扩增系统中, 一方面可以对扩增产物直接进行定量检测, 从而消除了核酸的交叉污染; 另一方面可以对核酸扩增过程随时进行监测. 此外可选择不同的荧光分子-淬灭分子对, 设计产生不同荧光的多个分子信标 (又称为多色分子信标, multicolor molecular beacons) 用于对多个靶核酸或核酸的不同位点同时检测. 常用的荧光-淬灭分子对有: 香豆素 (Coumarin) (蓝色)-DABCYL; EADNS (蓝绿)-DABCYL; 荧光素 (fluorescein) (绿色)-DABCYL; 荧光黄 (lucifer yellow) -DABCYL; 四甲基罗丹明 (tetramethylrhodamin) (橙色)-DABCYL; 德克萨斯红 (texas red) -DABCYL 等, 以上荧光-淬灭分子对的淬灭效率均超过 95%, 即检测的荧光背景很低.

2 分子信标应用于核酸检测的特点

根据分子信标的设计原理和目前的实验结

果,与常规核酸检测方法相比,分子信标具有如下特点^[3~5]。a. 可以进行液相杂交检测:常规核酸检测方法主要为固相杂交,要把未结合的探针和引物分离后才能利用其他信号对靶核酸进行检测;分子信标可以直接加入核酸扩增体系进行检测,检测方法可以直接在紫外灯下或借助荧光光谱仪进行定量检测。b. 有效消除核酸交叉污染:利用分子信标可以直接对封闭微量离心管或多孔板中的核酸检测,完全避免核酸中间操作环节,彻底消除核酸交叉污染。c. 可进行核酸实时(real-time)检测:在PCR体系中加入分子信标,并把PCR仪与荧光光谱仪相连,可以对PCR反应过程随时进行监测。d. 特异性强:在对分子信标与靶序列杂交特异性研究中意外发现,与线性寡核苷酸探针相比,茎环状结构的分子信标检测特异性更高,对靶序列中单个碱基的错配、缺失或插入突变均能检测出来。e. 灵敏度高:分子信标可以直接检测核酸;在应用过程中常与PCR等核酸扩增技术联合应用,因而低至1拷贝的核酸也能检测,敏感性很高。f. 可实现核酸大规模自动化检测:分子信标的最大优点是可实现核酸的大规模自动化检测,分子信标在核酸检测应用中的例子充分证明了这一点。g. 可对活体内核酸动态进行检测:目前尚缺乏有效方法对活体内核酸直接进行研究,分子信标技术为对活体内核酸代谢转移等动态过程研究提供了可能并已用实验证实。

3 分子信标核酸检测的应用

随着人类基因组计划研究进展,越来越多的证据表明基因突变在人类疾病中具有重要作用,建立简单、敏感、特异和快速自动化的基因检测方法对疾病的预防、诊断和治疗有重要现实意义。利用分子信标技术建立了基因突变自动化检测技术——光谱基因分型(spectral genotyping)^[6]。主要原理是:设计两个分子信标,其中一个为野生型等位基因特异并用绿色荧光分子和淬灭分子标记;另一个是等位基因突变体特异并用红色荧光素和淬灭分子标记。

检测基因突变时把两个分子信标同时加入PCR体系中,用荧光光谱仪或直接用紫外灯对PCR产物检测。当只检测到绿色荧光时,表明被检测的基因为野生型;当只检测到红色荧光时表明被检测的基因为同型突变体;当同时检测到绿色和红色荧光时,表明被检测的基因为异型突变体。

利用光谱基因分型方法检测了决定人类对HIV-1敏感性的HIV辅助受体CCR5等位基因突变^[6]。已证明,CCR5等位基因中缺失32nt的基因型(CCR5 Δ 32nt)个体,即使在与HIV-1感染者有频繁性接触的情况下对HIV-1具有抗性,CCR5异型缺失突变体对HIV-1感染发病具有一定程度抗性^[7,8]。因此建立CCR5辅助受体基因突变大规模检测方法,对HIV的预防具有重要流行病学意义。为了检测CCR5野生型等位基因,设计一个与缺失部分互补并以荧光素标记的分子信标;检测突变体时设计一个用四甲基罗丹明标记的与缺失部分两端序列互补的分子信标。把两个分子信标同时加入PCR体系中对人基因组DNA扩增并检测荧光。结果发现,同型野生型个体DNA扩增体系中只有荧光素标记的分子信标与产物结合,因而只能检测到绿色荧光;同型突变体DNA扩增产物中只有四甲基罗丹明标记的分子信标与之结合,因而只检测到红色荧光;但异型突变体DNA扩增产物能同时与两种分子信标结合,因而可同时检测到绿色与红色荧光。当无DNA模板时检测不到任何荧光。说明所设计的分子信标可以准确特异地检测基因型突变。

用该技术检测了179例样品,发现其中24个样品产生绿色与红色荧光,表明24个样品为异型突变体;151个样品只发出绿色荧光,表明是同型野生型基因型;其中4个样品只产生红色荧光,表明是同型突变体。以上结果与电泳迁移分型方法检测的结果完全吻合。

Giesendorf等^[9]利用分子信标检测了人甲叉四氢叶酸还原酶(MTHFR)基因的点突变。MTHFR基因的点突变是导致心血管疾病

和神经管缺陷的主要因素. 结果发现, 利用分子信标可以快速、准确地对 MTHFR 基因点突变进行半自动化检测, 而且完全避免核酸交叉污染. 分子信标为致病基因点突变的自动化大规模检测奠定了基础.

分子信标不仅可以检测基因缺失突变、点突变, 还可以对长段 DNA 突变进行分析. 结核分枝杆菌抗药性是结核防治的难题, 建立快速、敏感和自动化的结核杆菌抗药性筛选方法是结核防治和公共卫生的重要课题. 已发现, 96% 的结核杆菌利福霉素抗性 with *rpoB* 基因中一个 81 bp 区域核酸突变有关^[10]. Piatek 等^[5]根据结核杆菌 *rpoB* 野生型基因中 81 个碱基序列, 设计了 5 个用不同荧光素标记的分子信标 (15~ 20 nt), 5 个分子信标覆盖 *rpoB* 基因 81 bp 且每个分子信标之间有 1~ 3 个碱基重叠; 同时设计了与 16 S RNA 杂交的分子信标以监测 PCR 反应. 检测在 96 孔板中进行, 每个反应体系中含有其中一种分子信标和 16 S RNA 特异性分子信标. 结果发现, 当模板为利福霉素敏感菌株时, 五个分子信标均与扩增产物结合并可检测到荧光; 当 DNA 样品来自利福霉素抗性菌株时, 五个分子信标中至少有一个不产生荧光信号. 应用该技术检测了 75 个结核杆菌临床样品, 其中 52 个为利福霉素抗性菌株, 23 个为利福霉素敏感菌株, 与 DNA 指纹分析和 *rpoB* 基因测序以及细菌药敏实验结果完全相符, 证明分子信标可应用于微生物基因变异的快速大规模检测.

利用分子信标技术还可以对生物大分子在生物活体内的代谢转运等动态过程进行示踪分析. Matsuo^[11]以人碱性成纤维细胞生长因子 (bFGF) 基因为模型, 利用分子信标研究了 bFGF mRNA 在细胞内的代谢转运过程. 设计的 15 nt 长分子信标两端分别以荧光基团 EDAS 和淬灭分子 DABCYL 标记, 在脂质体作用下进入细胞. 结果发现, 在倒置显微镜紫外灯照射下, 与 bFGF mRNA 互补的分子信标在细胞内发出蓝色荧光, 而对照序列的分子信标在细胞内检测不到荧光; 而且, 分子信标

对细胞的生长状态无影响. 分子信标技术开辟了检测活体内核酸的新方法.

4 结束语

自 1996 年 Tyagi 等根据荧光共振能量转移现象首次设计分子信标以来, 在分子信标液相杂交反应特性, 基因检测特异性等方面进行了深入研究. 分子信标现已应用于基因定量分析、疾病基因检测与诊断等生物学基础和临床研究. 我们实验室在国内已同步开展了分子信标研究, 已成功设计合成了应用于病毒性疾病 (HBV、HCV) 和肿瘤检测的分子信标, 为这一新技术在国内医学基础和临床应用研究奠定了基础.

分子信标进入广泛应用还有些问题值得进一步深入研究. 目前报道的分子信标主要与 PCR 等核酸扩增系统结合进行核酸检测, 但对活体内不能扩增和体外尚未扩增的核酸分子, 分子信标检测的敏感性如何? 另外, 分子信标应用于核酸检测要有荧光光谱仪, 如果要进行自动化大规模检测, 还要具备对 PCR 产物直接进行检测的荧光光谱热循环仪, 可见分子信标核酸检测技术的普及推广尚存在硬件上障碍. 无论如何, 分子信标核酸检测技术是核酸检测方法上的重要突破, 必将对生物学基础和临床应用研究起到巨大推动作用.

参 考 文 献

- 1 Stryer L. Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Ann Rev Biochem*, 1978, **47**: 819~ 846
- 2 Ota N, Hirano K, Warashina M, *et al.* Determination of interactions between structured nucleic acids by fluorescence resonance energy transfer (FRET): selection of target sites for functional nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (3): 735~ 743
- 3 Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotech*, 1996, **14** (3): 303~ 308
- 4 Tyagi S, Bratu D P, Kramer F R. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotech*, 1998, **16** (1): 49~ 53
- 5 Piatek A P, Tyagi S, Pol A C, *et al.* Molecular beacon sequence analysis for detecting drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Biotech*, 1998, **16** (4): 359~ 363

6 Kostrikis L G, Tyagi S, Mhlanga M M, *et al.* Molecular beacons: spectral genotyping of human alleles. *Science*, 1998, **279** (20): 1228~ 1229

7 Samson M, Libert F, Doranz B J, *et al.* Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*, 1996, **382** (6593): 722~ 725

8 Rappaport J, Cho Y Y, Hendel H, *et al.* 32 bp CCR-5 gene deletion and resistance progression in HIV-1 infected heterozygotes. *Lancet*, 1997, **349** (9056): 922~ 923

9 Giesendorf B A, Vet J A, Tyagi S, *et al.* Molecular beacons: a new approach for semiautomated mutation analysis. *Clin Chem*, 1998, **44** (3): 482~ 486

10 Telenti A, Imboden P, Marchesi F, *et al.* Detection of rifampicin resistance mutation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Lancet*, 1993, **341** (8846): 647~ 650

11 Matsuo T. *In situ* visualization of messenger RNA for basic fibroblast growth factor in living cells. *Biochim Biophys Acta*, 1998, **1379** (2): 178~ 184

Research Advances in Molecular Beacons for Nucleic Acids Probing. CHEN Zhong-Bin,

WANG Sheng-Qi, SUN Zhi-Xian (*Institute of Radiation Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China*).

Abstract Molecular beacons are hairpin-shaped oligonucleotide with a fluorescent moiety and a non-fluorescent quenching moiety attaching to each ends and can be used to report the presence of specific nucleic acids in homogeneous solution or in living cells. The design principles and advantage of molecular beacon and the application for gene mutation detection were briefly introduced.

Key words molecular beacon, fluorescence resonance energy transfer, homogeneous real-time assay, gene mutation discrimination

人雄激素芳香化酶基因 (CYP19) 结构及其表达调控研究进展*

何海琼 王金发

(中山大学生命科学院, 广州 510275)

摘要 人雄激素芳香化酶与乳腺癌的发生和发展密切相关. 综述了编码该酶的 CYP19 基因的结构、独特的组织特异性表达和调控 CYP19 基因表达的各种因素及其有关的调控机制.

关键词 人雄激素芳香化酶, 组织特异性表达, CYP19, 乳腺癌

学科分类号 Q75

人雄激素芳香化酶是体内催化雌激素生物合成的限速酶. 正常生理条件下, 人雄激素芳香化酶基因 (CYP19 基因) 在下丘脑和大脑其他部位的表达对与性别有关的行为印迹及下丘脑-垂体轴分泌促性腺激素都是必需的; 另外, 该基因在植入前囊胚细胞中的表达为体外培养的胚胎植入子宫提供了信号^[1]. 在乳腺癌等癌变组织中均可检测到 CYP19 基因的过量表达或表达模式的改变^[2~4]. CYP19 基因的表达模式很不一般, 弄清该基因的表达调控

机制不仅是针对 CYP19 基因进行癌症治疗的基础, 也有助于从分子水平了解其他基因表达的调控机理.

1 CYP19 基因的结构和组织特异性表达

人 CYP19 基因的 cDNA 全序列已经清楚, 其基因以单拷贝位于人染色体组的 15q21.1 区

* 国家自然科学基金资助项目 (39370402).

收稿日期: 1997-07-03, 修回日期: 1997-11-17