

特异性 DNA 倍增技术 (PCR) 及其应用

付四清 宋后燕* 程 立

(上海医科大学病理生理学教研室, 上海)

提 要

特异性 DNA 倍增技术 (PCR) 是近年来发展的一种新技术, 具有快速、简便、灵敏、特异性高和重复性好等优点, 尤其适合于临床分子生物学检测。PCR 技术包括三个循环过程: (1) 模板 DNA 的变性, (2) 模板 DNA-引物的复性, (3) DNA 聚合酶作用下的引物链的延伸。本文对耐高温 Taq DNA 聚合酶、PCR 的反应体系、PCR 产物特异性的影响因素和 PCR 技术的应用等几个方面进行了综述。

关键词 特异性 DNA 倍增技术, 寡聚核苷酸引物, Taq DNA 聚合酶, 分子病检测

特异性 DNA 倍增技术 (polymerase chain reaction, PCR) 是美国 Cetus 公司分子生物学家 K. B. Mullis 等近年来发展的一种新方法, 在 1985 年首次报道^[1]。PCR 技术是利用两种寡聚核苷酸引物分别与特异性 DNA 区段的正链和负链末端互补, 经过模板 DNA 变性, 模板 DNA-引物复性和在 DNA 聚合酶作用下发生的引物链延伸反应。引物链的延伸产物与原来的模板 DNA 经加热变性后, 作为模板 DNA 和另一种引物互补, 在 DNA 聚合酶作用下又发生引物链的延伸反应。这样反复循环数十次, 可使特异性 DNA 区段成几何级数量倍增。PCR 技术可用来研究限制性内切酶片段长度多态性、基因突变, 检测细胞单拷贝基因和病毒感染等。PCR 技术具有快速、简便、灵敏和特异性高等优点, 尤其适合于临床实验室的应用和推广。它对推进我国临床分子生物学检测的水平具有重大的意义。

Taq DNA 聚合酶

Taq DNA 聚合酶, 又称耐高温 DNA 聚

合酶, 是 A. Chien 等在 1976 年从嗜高温性细菌 *Thermus aquaticus* 中提取的具有 DNA 聚合酶活性的蛋白质^[2]。

Taq DNA 聚合酶是单链蛋白质, 分子量为 63—68 kD, 没有单链核苷酸外切酶、磷酸单酯酶和磷酸二酯酶活性。其 DNA 聚合酶的活性需要四种三磷酸脱氧核糖核苷酸、模板 DNA、引物 DNA 和二价离子的存在。最适反应温度是 70—75℃, 最适反应体系的 pH 值为 8.0, 反应缓冲液以 Tris-HCl 为好, 单价离子浓度高至 0.1 mol/L 时不会抑制反应速度, 二价离子 Mg^{2+} 对反应的促进作用比 Mn^{2+} 的作用强。一个 Taq DNA 聚合酶的活性单位是在 70℃ 下反应 30 分钟后将 10 nmol 的核苷酸结合到引物 DNA 分子上。Taq DNA 聚合酶的显著特点是能耐高温, 在 70℃ 下反应 2 小时后其残留活性大于原来的 90%, 在 93℃ 下反应 2 小时后其残留活性是原来的 60%, 在 95℃ 下反应 2 小时后其残留活性仍有原来的 40%

* 上海医科大学分子遗传学研究室

20 Periti P F. *Boll Chim Farm*, 1974; 113: 187

21 Wu T T et al. *Proc Nat Acad Sci U S A*, 1971; 68: 1501

22 刘志平等. 生物化学与生物物理学报, 1985; 17: 657

23 华庆新等. 中国科学 B 辑, 1985; 6: 537

[本文于 1988 年 12 月 9 日收到]

左右。

PCR 的反应体系及其特异性

一、PCR 的反应体系

PCR 的反应体系包括被检测的 DNA 片段,两条与被检测的 DNA 片段正链和负链末端互补的寡聚核苷酸链(最适长度在 15—25 个碱基之间),四种三磷酸脱氧核糖核苷酸, Mg^{2+} 、Tris-HCl 缓冲液(在 70℃ 下其 pH 值为 8.0)和 DNA 聚合酶等^[3]。经 90℃ 下变性,室温下复性和引物链延伸等三个过程,反复进行数十

次,即可使特异性 DNA 区段倍增至原来的几百万倍以上(图 1)。PCR 反应的模板一般是基因组 DNA,但也可直接利用细胞进行 PCR 反应^[3,4]。

二、影响 PCR 产物特异性的因素

(一) DNA 聚合酶

首次报道的 PCR 技术使用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌的 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 大片段。使用此酶进行 PCR 反应有两个缺点,(1) Klenow 大片段的酶活性在 90℃ 下会变性失活,故每一次循环都需要重新加入 Klenow 大片段;(2)引物链延伸反应在 37℃ 下进行,容易发生模板和引物之间的碱基错配,故 PCR 产物的特异性较差。目前基本上使用 Taq DNA 聚合酶进行 PCR 反应,每次循环后不必重新加入 Taq DNA 聚合酶;引物链延伸反应在 70℃ 下进行,避免了模板与引物之间的碱基错配。因此得到的 PCR 产物的特异性高,其错配率在万分之一左右^[5]。

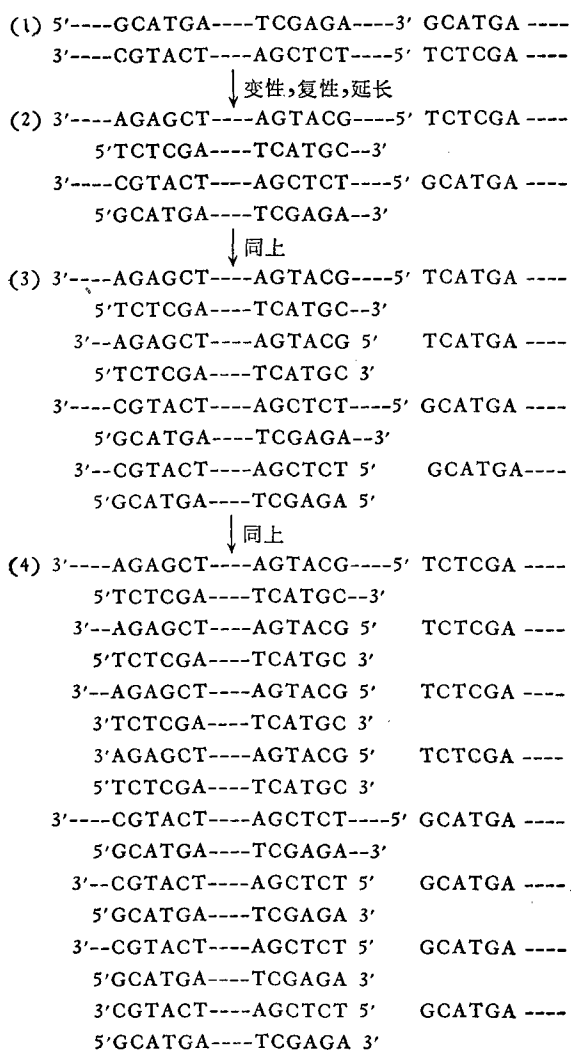
(二) 引物链的绝对特异性和相对特异性

PCR 产物的特异性主要取决于两条引物链的特异性。对某一 DNA 片段来说,由于同源顺序的存在,随意设计的两条引物链,其 PCR 产物经电泳分析时可能会出现多条电泳带。因此,在引物链的设计过程中要考虑到引物链的绝对特异性和相对特异性。所谓引物链的绝对特异性是指两条引物链的核苷酸顺序特异性,它们只与被检测的 DNA 片段互补。所谓引物链的相对特异性是指两条引物链的核苷酸顺序及两者之间的 DNA 长度对被检测 DNA 片段来说是特异性的,它们也可以与其他区域的 DNA 片段互补,但其 PCR 产物的长度与被检测 DNA 片段的 PCR 产物的长度有明显的区别。

三、PCR 产物特异性的研究

(一) PCR 产物的大小和限制性内切酶图谱

根据扩增引物 AP1 和 AP2 (amplification primer, AP) 之间的 DNA 片段长度,预计 PCR 产物的大小,与电泳分离后的 DNA 片段



循环数十次

图 1 PCR 反应程序图

相比较,初步判断 PCR 产物的特异性^[6]。然后,将 PCR 产物用限制性内切酶水解,进一步检测 PCR 产物的特异性。

(二) PCR 产物的寡聚核苷酸限制性内切酶片段分析(又称 OR 分析, oligomer restriction analysis)^[7]

OR 分析对 PCR 产物的限制性内切酶位点上碱基突变的检测尤为适用(图 2)。利用 γ -³²P ATP 末端标记特异性寡聚核苷酸片段。这段寡聚核苷酸链包括有特定的限制性内切酶位点的识别顺序并能与特异性 PCR 产物互补。寡聚核苷酸-PCR 产物复性后用特定的限制性内切酶水解,然后进行电泳分离,放射性自显影。如果发现有一定的限制性内切酶片段时,那么扩增的 PCR 产物是特异的,反之则证明 PCR 产物在限制性内切酶位点上发生了碱基突变。

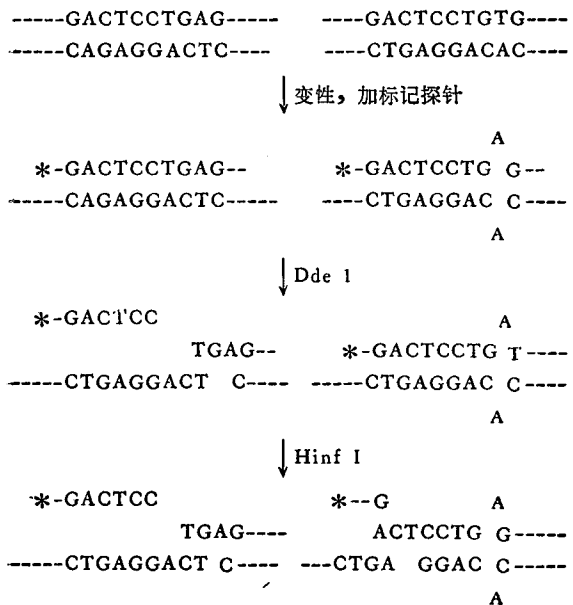


图 2 PCR 产物的 OR 分析

(三) 分子杂交

分子杂交是检测 PCR 产物特异性的有力证据,也是检测 PCR 产物的非限制性内切酶位点上碱基突变的有效方法。利用两条引物链之间特异性 DNA 片段作为探针(PCR internal probe, IP),与 PCR 产物进行分子杂交,阳性结果说明 PCR 产物是特异的。对于 PCR 产

物的碱基突变来说,利用多种等位基因特异性寡聚核苷酸探针(allele-specific oligonucleotide, ASO)与 PCR 产物进行分子杂交,检测 PCR 产物的碱基突变。

(四) 核苷酸顺序分析

利用 γ -³²P ATP 末端标记一种扩增引物,直接与 PCR 产物进行 DNA 顺序分析反应,读出 PCR 产物的核苷酸顺序。核苷酸顺序分析技术是检测 PCR 产物特异性的最可靠方法^[8,9]。

PCR 技术的应用

一、分子病的检测

镰状红细胞贫血是典型的分子病,它是由 β -血红蛋白基因第六个密码子 GAG 突变为 GTG 所致的血红蛋白高级结构异常所致,以往临床上很难从基因水平上诊断镰状红细胞贫血。利用 PCR 技术能很好地解决这一问题。如特异性扩增 β -珠蛋白基因第一 36 位碱基至第一个内含子+117 位碱基之间的 294bp 的 DNA 片段。正常人的特异性 PCR 产物经限制性内切酶 Oxa N1 水解后产生 103bp 和 191bp 的两种限制性内切酶 DNA 片段。而镰状红细胞贫血的碱基突变正好发生在限制性内切酶 Oxa N1 的识别位点上,故镰状红细胞贫血纯合子患者的特异性 PCR 产物经限制性内切酶 Oxa N1 水解后不能产生 103bp 和 191bp 的两种 DNA 片段;镰状红细胞贫血杂合子患者的特异性 PCR 产物经限制性内切酶 Oxa N1 水解后产生 103bp、191bp 和 294bp 三条 DNA 片段,每种 DNA 片段的量均是正常人和镰状红细胞贫血纯合子患者的相应 DNA 片段量的一半。

二、性别鉴定

利用 PCR 技术大量扩增 Y 染色体特异性 DNA 区域中 149bp 的 DNA 片段和 Alu 重复顺序 300bp 的 DNA 片段。其 PCR 产物经电泳分离后若出现 149bp 和 300bp 的两条 DNA 带,说明受试者为男性;若只出现 300bp 的 DNA 带,说明受试者为女性。

三、病毒感染等的特异性研究

目前应用 PCR 技术检测病毒感染等主要是人类免疫缺陷病毒 (HIV-1)^[41,121]、人类嗜 T 淋巴细胞性白血病病毒 (HTLV-1)^[43] 和人疱疹病毒 (HPV)^[44] 等。

在美国加州中发现 11 例 HIV-1 血清学和病毒培养均为阳性的同性恋患者的外周血单核细胞中均检测出 HIV-1 的特异性 PCR 产物; 11 例 HIV-1 血清学阳性而病毒培养阴性的同性恋患者中 64% 病人的外周血单核细胞中检测出 HIV-1 的特异性 PCR 产物; 13 例正常人的外周血单核细胞中都未检测出 HIV-1 的特异性 PCR 产物。PCR 检测只需要一天, 与分离病毒所需的 3—4 周相比, 具有快速、灵敏和特异性高等优点。

四、肿瘤基因突变等的特异性检测

基因突变是指基因结构发生改变, 以点突变最为多见, 从基因水平上检测较为困难, 但 PCR 技术能很好解决这个问题。如肿瘤基因 c-ki-ras 的激活是由于第 12 位氨基酸的密码子 GGT 突变为 TGT 所致。其过程如下: 用人结肠癌细胞 DNA 作为模板, 特异性扩增肿瘤基因 c-ki-ras 的第 12 位氨基酸密码子上游 31bp 处至其下游 76bp 处的 108bp DNA 片段。利用等位基因特异性寡聚核苷酸探针 ASO-Gly 和 ASO-Cys 与特异性 PCR 产物进行分子杂交, 若 PCR 产物只与 ASO-Gly 探针杂交呈强阳性, 说明受试者为正常人; 若 PCR 产物与 ASO-Cys 探针杂交呈强阳性, 可诊断为 c-ki-ras 基因发生点突变^[15]。利用核苷酸顺序分析技术分析 PCR 产物, 也能确定 c-ki-ras 基因是否突变^[16,17]。

五、限制性内切酶片段长度多态性的分析

限制性内切酶片段长度多态性是指某一 DNA 区域内由于基因缺失、插入、碱基突变等引起的限制性内切酶识别位点发生改变或消失, 从而使这一 DNA 区域经限制性内切酶水解后产生的限制性内切酶片段长度不一致。利用 PCR 技术大量扩增含有限制性内切酶识别位点的特异性 DNA 区段, 再利用 PCR 产物

的限制性内切酶水解分析, 就可快速、简便地检测出限制性内切酶片段长度多态性。

六、基因工程上的应用

利用 PCR 技术进行基因克隆, 尤其适用于已知核苷酸顺序的基因。如利用逆转录方法合成的 cDNA 作为模板, 与合成的特异性 DNA 引物进行 PCR 反应, 使特异性的 cDNA 基因大量扩增, 以便迅速、简便地进行基因克隆。利用 PCR 技术也可对 cDNA 基因转化的高效、稳定表达的细胞克隆进行鉴定。合成两条不在同一外显子的特异性寡聚核苷酸链作为扩增引物, 与表达细胞基因组 DNA 进行 PCR 反应, 根据特异性 PCR 产物的 DNA 长度确定 cDNA 基因整合状态, 筛选出高效、稳定表达的细胞克隆株。

结 语

PCR 技术具有高度特异性、高度灵敏性、快速简便和重复性好等优点, 适用于临床检验和研究。Taq DNA 聚合酶的使用促进了 PCR 反应的自动化^[18]。但进行 PCR 反应的一个首要条件是需要知道被测 DNA 的核苷酸顺序, 因而限制了 PCR 技术在基础理论中的应用。相信随着科学的不断发展, PCR 技术必将成为临床进行基因诊断的重要常规技术。

参 考 文 献

- 1 Saiki R K *et al.* *Science*, 1985; 230: 1350
- 2 Chien A *et al.* *J Bacteriol*, 1976; 127(3): 1550
- 3 Kogan S C *et al.* *New Engl J Med*, 1987; 317(16): 985
- 4 Saiki R K *et al.* *Nature*, 1986; 324: 163
- 5 Erlich H A *et al.* *Nature*, 1988; 331: 461
- 6 Engelke D R *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 544
- 7 Embury S H *et al.* *New Engl J Med*, 1987; 316(11): 656
- 8 McMahon G *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 4978
- 9 Wong C *et al.* *Nature*, 1987; 330: 384
- 10 Chehab F F *et al.* *Nature*, 1987; 329: 293
- 11 Kwok S *et al.* *J Virol*, 1987; 61: 1690
- 12 Ou C Y *et al.* *Science*, 1988; 239: 295
- 13 Duggan D *et al.* *Blood*, 1988; 71(4): 1027
- 14 Shibata D K *et al.* *J Exp Med*, 1988; 167: 225

γ, δ 链 T 细胞抗原受体的基因结构及其生物学作用

吴 敏

(泸州医学院)

提 要

TCR 有 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 两种异二聚体形式, 使 T 细胞可分为 TCR1($\gamma\delta$) 和 TCR2($\alpha\beta$) 两种类型。TCR1T 细胞特异识别 MHC-I 类抗原, 在监视上皮细胞以及 TCR2T 细胞的分化过程中有重要作用。

关键词 T 细胞抗原受体, 基因, 上皮细胞, MHC 约束性

T 细胞抗原受体 (TCR) 赋予 T 细胞识别外界抗原的特异性, 因而始终是免疫学中诱人的研究环节。八十年代初阐明的 TCR 有 α, β, γ 三种基因, 但只发现 α, β 基因产物。1986 年又找到 γ 基因, 使对 TCR 结构功能的认识趋向深入。TCR 三种产物都以与 CD3 有关的形式表达, 故发现有 $CD3^+4^-8^-TCR1(\gamma\delta)$ 和 $CD3^+4^+8^+TCR2(\alpha\beta)$ 两类 T 细胞。Goodman 等^[1]报告, 肠上皮淋巴细胞 (IEL) 表型也为 $CD3^+4^-8^+TCR1(\gamma\delta)$ 。

一、Ti $\gamma\delta$ -CD3 复合体

Brenner 等^[2]在免疫缺陷病人外周血 T 细胞系 IDP₂($CD4^-CD8^-$) 和未成熟的人胸腺上

表 1 TCR 的分子量及基因定位

TCR 分子	分子量 (KD)	染色体定位
小鼠 α	43	14L ₁ -D ₂
β	43	6
γ	36—40 或 55—60	13A ₁ -A ₃
X(δ)	40	14
人 α	45—50	11q ¹¹ -q ¹²
β	40	7q ³² -q ³⁶
γ	36—40	7P ¹³
X(δ)	40	11q ¹¹ -q ¹²

发现了 γ 基因产物。由 55—60kD 与 44kD 分子以非共价结合方式构成异二聚体, 其中 55—60kD 成分与抗 γ 抗体反应, 而 44kD 成分不能, 前者为 γ 链, 后者为 δ 链 (有人称 TiX)。后来发现 γ 蛋白还有一种类型为 36—40kD^[3], 与 δ 链通过二硫键共价偶联。而 55—60kD γ 蛋白与 δ 链为非共价偶联^[4]。

二、TCR $\gamma\delta$ 基因

1. 结构 小鼠 γ 基因位于 13 号染色体 (表 1), 有 4 个 J γ , C γ , 7 个 V γ (图 1)。其中 C γ 3 是假基因。功能性 V γ -J γ 重排结合体数目为 6

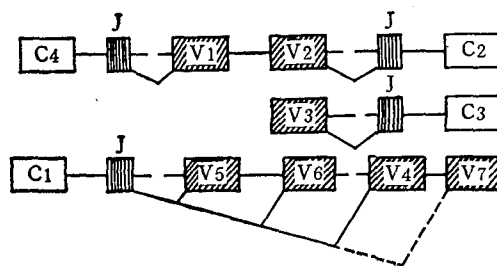


图 1 TCR1 γ 基因的结构与重排方式

几个片区连续排列次序还未揭示。实验证实者实线示之; 推想的连接方式虚线示之。C γ 3 是假基因。C 基因更详细结构此处未列出。每一 V 基因领头处外显子也未给出

15 Bos J L et al. Nature, 1987; 327: 293

16 Janssen J W G et al. Nucleic Acids Res, 1987; 15: 5669

17 Lee M S et al. Science, 1987; 237: 175

18 Saiki R K et al. Science, 1988; 239: 487

[本文于 1988 年 12 月 8 日收到]