

signalling event. The recent progress in this research area is briefly summarized with special emphasis placed on the newly proposed models for various intracellular signalling

pathways in animal cells.

**Key words** signal transduction, second messenger, cAMP, cGMP,  $\text{Ca}^{2+}$ , DG,  $\text{IP}_3$ , protein kinase

## 高速 DNA 序列分析\*

程介克

(武汉大学化学系, 武汉 430072)

**摘要** 高速 DNA 序列分析是人类基因组研究的关键技术. 文章对高速 DNA 序列分析方法如阵列毛细管电泳、超薄层凝胶板电泳、质谱、杂交法、原子探针法、流动单分子荧光检测法等新进展进行了评论.

**关键词** DNA 序列分析, DNA 电泳, 阵列毛细管电泳, 超薄层板电泳

1953 年 Watson 和 Crick 创立了生物遗传分子脱氧核糖核酸 (DNA) 的双螺旋结构理论, 奠定了生物遗传基因分子机理的基础, 开创了生物学及生命科学的新时代. 近半个世纪以来, 生命科学的研究进入了蓬勃发展的光辉时期. 1990 年美国制定了世界最庞大的基因研究计划——“人类基因组项目”(human genome project), 在 15 年内投资 30 亿美元, 拟完成人类基因组的全部 DNA 序列分析、定位及遗传学研究. 1992 年我国制定了世界第 2 庞大的基因研究计划——“水稻基因组项目”(rice genome project), 将在 15 年内完成水稻基因的全部测序. 这些研究对人类的生命和生存具有极其深远的意义, 并将推动分子生物学、分子医学及生命科学的迅速发展.

DNA 序列分析是基因研究的重要基础, DNA 序列分析方法的研究是关键. 但轻视分析检测的世俗偏见, 严重地影响基因研究项目的进程. 1993 年美国对“人类基因组项目”进行了深入的检查, 发现由于大部分研究经费投入在基因定位的研究, DNA 序列分析的研究经费严重不足, 导致进展缓慢, 已成为整个项目进展中的“瓶颈”<sup>[1]</sup>. 为此不得不对原第 1 个五年计划 (1991—1995 年) 进行了大幅度调整, 重

新制定了新的五年计划 (1994—1998 年)<sup>[2]</sup>. 新订计划将加强 DNA 序列分析技术研究, 并明确规定每年将半数经费 (1 亿美元) 用于研究及开发 DNA 序列分析新技术及新方法. 美国基因研究的经验和教训, 值得我们参考和借鉴.

### 1 人类基因组 DNA 序列分析概况

基因是具有遗传功能的单元, 一个基因是 DNA 片段中核苷酸碱基特定的序列, 此序列载有组建蛋白质、细胞和组织的结构组成, 基本的生物化学反应酶等遗传信息. 人们形象地将 DNA 碱基序列称为遗传密码, DNA 序列分析是揭开遗传密码的关键, 也是基因研究的基础. 人是复杂的高等生物, 人类基因组有约 30 亿碱基对. 表 1 为人类基因组和某些典型生物基因组的比较. 若将人类基因组 30 亿碱基编辑成书, 就相当于 200 本电话簿 (1000 页/本), 从头到尾阅读一遍需要 26 年. 目前已测定最大的、连续的酵母染色体 III (32 万碱基), 它由 35 个欧洲实验室 147 人合作研究 2 年 4 个月取得的成果. 若将它编辑成书, 仅有 14 页, 它和人类基因组 200 本书相比较, 相差 4 个数量级. 由

\* 国家自然科学基金及国家教委博士点基金资助项目.

收稿日期: 1994-06-08, 修回日期: 1994-11-09

此可见人类基因组项目的庞大, DNA 序列分析任务之繁重. 若不大力加强 DNA 序列分析新技术和新方法的研究, 难以在 15 年内完成人类基因组的全部 DNA 序列分析任务.

表 1 人类和典型生物基因组大小的比较

| 生物基因组                    | 碱基数<br>/万 |
|--------------------------|-----------|
| 已知最大的连续的 DNA 序列(酵母染色体 I) | 35        |
| 大肠杆菌(细菌)基因组              | 460       |
| 已绘制最大的酵母染色体图谱            | 580       |
| 酵母全部基因组                  | 1 500     |
| 水稻全部基因组                  | 4 600     |
| 人类最小的染色体(Y)              | 5 000     |
| 人类最大的染色体(I)              | 25 000    |
| 人类全部基因组                  | 300 000   |

美国在“人类基因组项目”新的五年计划中要求 DNA 序列分析速度必须提高 100 倍. 即必须达到快速、灵敏、准确、价廉、自动化. 目前的 DNA 序列分析技术可分为三代: 第一代测序技术包括目前普遍采用的手工 DNA 测序法(板凝胶电泳自辐射显影法)和自动化 DNA 测序法(板凝胶电泳激光荧光适时检测法); 第二代测序技术仍以凝胶电泳为基础的毛细管凝胶电泳激光荧光法、阵列毛细管电泳激光荧光法、超薄层凝胶板电泳激光荧光法; 第三代测序技术指不用电泳分离的直接测序技术, 如质谱法、原子探针法(扫描隧道显微镜、原子力显微镜)、杂交法、流动式单分子荧光检测法等.

在第二代测序技术中, 毛细管凝胶电泳比板凝胶电泳分离速度提高 25 倍, 但板电泳在每块板上可同时电泳分离多达 24 个样品, 如 ABI-373A 自动化 DNA 测序仪. 而毛细管电泳 1 支毛细管只能电泳分离 1 个样品, 因此其分析效率并未提高, 故尚未应用在人类基因 DNA 序列分析中. 为了提高分析效率, 从而提出阵列毛细管电泳, 以及提高电泳分离速度的超薄

层板电泳法. 他们是目前高速 DNA 序列分析研究的主攻方向, 也是当前提高测序效率的有效途径.

第三代测序技术指不用电泳分离直接测序, 是较理想的高速 DNA 序列分析方法. 但目前这些方法仍处于不成熟的研究及开发阶段, 在 3—5 年内难以应用于 DNA 序列分析.

本文对近期有应用前景的阵列毛细管电泳激光荧光法和超薄层板电泳激光荧光法作重点评述. 对第三代直接测序新技术仅作简略介绍.

## 2 阵列毛细管电泳激光荧光法

1992 年美国加州伯克莱大学 Mathies 等<sup>[3]</sup>首先提出阵列毛细管电泳高速 DNA 序列分析新方法, 采用激光聚焦荧光扫描检测装置. 25 支毛细管并列同时电泳, 每支毛细管在 1.5h 内可读出 350 碱基. DNA 序列分析效率达到 6000 碱基/h. 使用可更换的羟乙基纤维非凝胶基质, 7 支毛细管阵列电泳, 在 20min 内完全分离了 DNA 限制性片段  $\Phi$ X 174/HaeIII 所有 11 个碱基<sup>[4]</sup>. 由于扫描检测是连续获得数据, 不是平行阵列同时检测, 测序速度取决于每个 DNA 电泳带所需观测时间, 高速测序效率将受扫描检测时间所限, 是此法最大缺陷.

日本日立公司中心研究室 Kambara 等<sup>[5]</sup>提出另一种阵列毛细管电泳 DNA 测序装置. 20 支毛细管并列电泳, 采用激光荧光电荷耦合阵列检测器(CCD)检测, 并用套式流动池减小光散射, 灵敏度高, 检出限达  $1 \times 10^{-13}$  mol/L. 且省去了机械扫描装置. 但阵列套式流动池装置复杂, 在大规模 DNA 测序中, 恐难以推广应用.

美国衣阿华州立大学 Yeung 等<sup>[6]</sup>研究一种较简单的阵列毛细管电泳装置, 采用光导纤维插入电泳毛细管末端, 导入激光, 以 CCD 检测器检测, 不需复杂的光学调节系统. 但光导纤维插入电泳毛细管中, 对电泳分离造成一定的影响, 曾应用于 10 支毛细管阵列电泳系统. 最近他们提出了 100 支毛细管阵列电泳装置<sup>[7]</sup>, 研究了多种激光激发方式, 如采用光导纤

维导入激光;不用光导纤维,将激光直接照射到电泳毛细管上,并试验了激光照射的角度,如 $45^\circ$ 及 $90^\circ$ 等.发现激光以 $45^\circ$ 直接照射到电泳毛细管上激发效果最好.采用CCD检测器同时检测100支毛细管阵列电泳分离 $\Phi$ X 174/HaeIII DNA限制性片段,除271和281两个碱基未分离外,其他10个碱基均获得满意的分离,并有很好的重现性.他们认为若采用具有4096象素的CCD多道检测器,可以组装4000支毛细管阵列电泳装置.人类基因组项目30亿碱基测序任务有可能在35d完成.当然这仅从电泳分离步骤来考虑,由于人类基因DNA序列分析还包括很多工作,如Sanger反应步骤等,必须提高各个步骤的速度,才有可能达到高速DNA测序的目的.

### 3 超薄层板电泳激光荧光法

常规凝胶板电泳DNA测序,一般采用200—400 $\mu$ m厚度凝胶,由于控制电泳产生的焦耳热,降低分辨率,电场强度一般使用75V/cm左右,从而限制了测序速度的提高.

美国威斯康星大学Smith等提出水平式超薄层凝胶板电泳自辐射显影法高速DNA测序.采用50—100 $\mu$ m厚度凝胶板,设计流水冷却装置,电场强度提高到250V/cm,电泳速度大幅度提高.不久又改进用荧光试剂标记,采用激光荧光CCD检测器检测,电泳50min,每条泳道可读出485碱基,比常规电泳测序速度提高9倍.仪器的测序速度达到8000碱基/h以上<sup>[8]</sup>.

欧洲分子生物学实验室Anson等<sup>[9]</sup>报道,在商品Pharmacia自动化测序仪上,研究超薄层凝胶板电泳测序.采用100 $\mu$ m厚度凝胶板,电场强度75—84V/cm, DNA测序速度有所提高.此仪器是采用单个荧光试剂标记,每个测序样品须在4条泳道上同时电泳测序,样品容纳量减少到 $\frac{1}{4}$ .且未采用高电场强度,提高电泳速度.

在凝胶电泳DNA测序中,凝胶板或凝胶柱的制备费时费力,如电泳分离仅需1h,但制

备凝胶板或凝胶柱需0.5—1d,且均为手工操作.因此,非凝胶基质的研究引起人们广泛的兴趣. Karger等<sup>[10]</sup>在毛细管电泳DNA测序中,首次报道应用线性聚丙烯酰胺非凝胶基质.采用低粘度的非凝胶基质,电泳30min,可读出350碱基,较凝胶基质结果稍差.但电泳后可压出更换基质,仅需15min.采用非凝胶基质电泳测序,由于不用手工操作,可以采用封闭式测序仪器,为实现高速全自动化测序系统奠定了基础.

阵列毛细管电泳和超薄层板电泳用于高速DNA测序各有优缺点.阵列毛细管电泳由于毛细管的高表面/体积比,传热快,可以采用更高电场强度电泳.且毛细管壁具有抗对流性能,使用非凝胶基质时,可抑制横向扩散.但数百支甚至数千支毛细管阵列装置,操作亦非易事,实现商品化的难度较大.超薄层板电泳是在常规凝胶板的基础上发展,在一块板上进行多个样品平行分析,操作较简便易行,较易实现商品化.但其热扩散慢,保持恒温,必须有高效冷却装置.使用非凝胶基质,如何克服各泳道之间横向扩散,也是有待研究的关键问题.在DNA测序方面做了大量工作的著名学者Karger在最近的评论<sup>[11]</sup>中认为,目前尚难断定那一种方法可应用于人类基因高速DNA序列分析,将根据其商品化及自动化的程度而定.

## 4 未来的新技术和新方法

### 4.1. 质谱法

由于核酸是长链生物大分子极易断裂,质谱法用于分析核酸,难度较大.近年来由于离子化技术的进展,也有所突破.目前发展最快的基体协助激光解吸离子化(matrix-assisted laser desorption and ionization, MALDI)新技术用于DNA测序已获得部分成功.此法基于利用外加基体协助核酸分子解吸离子化. Wu等<sup>[12]</sup>试验了近50种外加基体,发现3-羟基吡啶甲酸是最好的基体,并用于分析了有67个碱基的核酸低聚物,这是目前质谱分析核酸碱基最多的报道. Smith等<sup>[13]</sup>采用上述基体,用

MALDI-飞行时间质谱法分别对合成的 A、C、G、T 的低聚核苷酸测序,再组成混合碱基序列图谱。目前对外加基体协助核酸解吸离子化的机理尚未深入研究,主要依靠经验来探索新的基体物质。此法不用电泳分离,测序速度可高达 100 碱基/s,灵敏度为 10pmol。应用于高速 DNA 测序,其质谱范围和灵敏度至少须提高 1 个数量级。

## 4.2 杂交法

杂交法是有希望用于高速 DNA 序列分析的一种新技术<sup>[14]</sup>。用已知序列核苷酸探针(如 8 个核苷酸),与待测序的样品杂交,获得样品的序列信息。8 个核苷酸一组的探针能成功杂交多达 65 000 个互补杂交物。此法简便、快速、价廉,但误差较大,且不能重复测定。

## 4.3 原子探针显微镜

原子探针显微镜的新技术——扫描隧道显微镜 (STM) 和原子力显微镜 (AFM) 能快速、高分辨直接观测 DNA 分子图象,有可能直接观测 DNA 碱基序列,引起人们极大的兴趣。

扫描隧道显微镜是采用相当原子直径的针尖,在样品表面扫描,并连续测量移动的针尖与表面之间电子隧道电流,获得样品的三维图象。已成功地得到了 DNA 片段的图象,如单链 DNA 中单个核苷酸;双链 DNA 的双螺旋体结构和单个碱基对,图象与 X 射线结晶法所测得数据相符。扫描隧道显微镜直接观测 DNA 图象,根据扫描速度, DNA 测序速度能达到 1000 碱基/min 以上<sup>[15]</sup>。

原子力显微镜是测量扫描尖端和样品表面之间的力,不要求样品导电,更适合于 DNA 等生物大分子图象的观测。应用原子力显微镜已获得液体中 DNA 分子重现的图象<sup>[16]</sup>。

原子力显微镜及扫描隧道显微镜具有直接观测 DNA 序列的能力,可能提供一种崭新的直接观测 DNA 序列的新技术。但目前制样技术及获得清晰的 DNA 序列图象方法仍在探索中,有待人们去研究和开发。

## 4.4 流动式单分子荧光检测法

美国 Alamos 国家实验室 Keller 等提出基

于单分子检测的高速 DNA 序列分析新技术。在单链 DNA 片段上标记荧光基团,采用流动式细胞光度术 (flow cytometry),用水流载带 DNA 片段流动,并用核酸外切酶依次切断 DNA 片段中标记的单个碱基,在水流载带下的单个碱基,依次用激光荧光检测,得到 DNA 碱基序列。该方法从理论上可测长达 40 000 碱基的 DNA 片段,测序速度可达到 100—1000 碱基/s<sup>[17]</sup>。此法目前存在的主要障碍是快速酶切单个荧光标记的核苷酸分子;其次是 4 种不同的荧光试剂标记不同的 4 种碱基;检测单个荧光分子正在不断取得进展<sup>[18]</sup>,已经不是主要困难。

## 5 结 语

人类基因组研究 30 亿碱基序列分析,对分析化学提出了严峻的挑战,也给分析化学带来了巨大的机会,开辟了生命科学中分析化学前沿领域研究,促进了分析化学学科的发展。如单个碱基的高分辨分离及高灵敏检测,提出了毛细管凝胶电泳分离聚脱氧胸腺嘧啶核酸,分辨率达到  $3.0 \times 10^7$  理论塔板/m<sup>[19]</sup>,它是目前所有分离方法中分离效率最高的报道。在 DNA 序列分析中,经电泳后,每个电泳带中约含 10amol DNA,检测方法的检出限须低于 0.1amol。最近采用双激光器及双窗增强光二级管阵列检测系统,检出限已达到 0.9zmol ( $z$ : zepto =  $10^{-21}$ ) 即 540 个分子。在例行分析中达到如此高的灵敏度极其罕见。在流动式单分子荧光检测法测序中,要求检测单个分子,它是分析化学中检测的最终目标。

生命科学正在促进现代分析化学的发展。早期的手工测序方法是在单个实验室中研究出来的。80 年代发展的自动化测序仪是化学家、生物化学家、光学专家、计算机软件及仪器仪表工程师共同研究的成果。由于更高级分析方法学的发展,这一趋势将更为突出。在人类基因组及水稻基因组项目中高速 DNA 序列分析的研究及开发,必须在学科之间渗透及交叉训练上作出巨大努力,才能完成人类史上所赋予

的光荣使命。

**致谢** 本文在美国威斯康星麦迪森大学 Smith 实验室合作研究期间完成, 作者对 L. M. Smith 教授和陈丹华博士热情提供资料及帮助谨此致谢。

### 参 考 文 献

- 1 Roberts L. Science, 1993; **262**: 20
- 2 Collins F, Galas D. Science, 1993; **262**: 43
- 3 Huang X H, Quesada M A, Matheis R A. Anal Chem, 1992; **64**: 967
- 4 Clark S M, Matheis R A. Anal Biochem, 1993; **215**: 163
- 5 Karbara H, Takahashi S. Anal Chem, 1994; **66**: 1021
- 6 Taylor J A, Yeung E A. Anal Chem, 1993; **65**: 956
- 7 Ueno K, Yeung E S. Anal Chem, 1994; **66**: 1424
- 8 Kostichka A J, Brumley R L, Smith L M. Nucl Acids Res, 1993; **21**: 4350
- 9 Ansorge W, Voss H, Wiemann S *et al.* Electrophoresis, 1992; **13**: 616
- 10 Ruiz-Martinez M C, Berka J, Karger B L *et al.* Anal Chem, 1993; **65**: 2851
- 11 Karger B L, Foret F. In: Guzman N A ed. Capillary electrophoresis technology. New York: Dekker, 1993: 42
- 12 Wu K J, Steding A, Becker C H. Rapid Commun Mass Spectrom, 1993; **7**: 142
- 13 Lin Z, Smith L M. Rapid Commun Mass Spectrom, 1993; **7**: 895
- 14 Drmanac R. Science, 1993; **260**: 1694
- 15 Lindsay S M, Philipp M. Genet Anal Tech Appl, 1991;

8: 8

- 16 Hansma H G, Vesenska J, Siegerist C *et al.* Science, 1992; **256**: 1180
- 17 Keller R A, Davis L M, Fairfield F R *et al.* Genet Anal Tech Appl, 1991; **8**: 1
- 18 Tellinghuisen J, Goodwin P M, Keller R A *et al.* Anal Chem, 1994; **66**: 64
- 19 Guttman A, Cohen A S, Karger B L. Anal Chem, 1990; **62**: 72

**High-Speed DNA Sequence Analysis.** Cheng Jieke (*Department of Chemistry, Wuhan University, Wuhan 430072, China*).

**Abstract** High-speed DNA sequence analysis is a central technology in biological and biomedical research. The progress in high-speed DNA sequencing such as the ultrathin slab gel electrophoresis, capillary array electrophoresis, mass spectrometry, sequencing by hybridization, atomic probe microscopy (scanning tunneling or atomic force microscopy), and single molecule fluorescence detection in flowing sample streams are reviewed.

**Key words** DNA sequencing, DNA electrophoresis, capillary array electrophoresis, ultrathin slab gel electrophoresis

## 基因治疗研究进展

周 辰 徐 铃

(第一军医大学生物化学教研室, 广州 510515)

**摘要** 基因治疗研究的最新成就是非常鼓舞人心的, 但是还有许多问题等待解决. 首先回顾了近年来有关基因治疗的重要基础研究, 包括基因导入技术的研究. 后者是基础研究中最重要的课题之一, 包括逆转录病毒载体和 DNA 病毒载体的应用, 以及非病毒学方法. 其次叙述了实验模型建立的研究. 最后着