

# 基因扩增技术的一次重大改进

吴 明

(中国科学院微生物研究所,北京)

## 提 要

PCR 技术是一项新的快速的基因扩增技术,本文简述了 PCR 技术原理,操作过程及在遗传性疾病分析,检定诸如艾滋病或有关病毒序列的传染病因子,活化的致癌基因研究,等位基因序列变化分析,基因工程和蛋白质工程研究开发的广泛用途。例举了 HIV 的检定结果。文中还简述了比 PCR 技术更先进的 Q- $\beta$  复制酶技术原理、操作过程和应用前景。

**关键词** 多聚酶链反应, DNA 多聚酶, Q- $\beta$  复制酶, 基因扩增

近几年特异性核苷酸序列分析在临床诊断遗传病、传染病、分子克隆及蛋白质工程操作中显得愈来愈重要了。而把分析、筛选到的有价值靶基因再进行扩增则是遗传工程全部操作程序中关键步骤之一。

要扩增有意义的靶基因,过去都是将构建的嵌有靶基因的载体导入到细菌细胞里。细菌繁殖快,每个世代约需 20 分钟左右;细菌转化,繁殖后即完成靶基因的扩增,最后再用同位素探针筛选。此法需将靶基因在细胞与细胞之间来回搬运,然后培养,提取、纯化等,操作费时费事,还要使用同位素。加之,实际能提供分析、检定的只是极微量的靶 DNA 分子,且含其它物质。而要诊断遗传病,就必须将 DNA 靶位片段扩增 20 万倍以上;限制性片段长度多型性分析是 DNA 序列分析中最常用的方法,用于多位点分型需要微量量的 DNA;用于单一位点比较则需要数百毫微克量的 DNA<sup>[1]</sup>。这个分析量也不是常法所能达到的,因而阻碍了特异性序列分析法的实际应用。在这样的技术背景条件下要求在基因扩增技术方面有新的进展。

## 一、多聚酶链反应(PCR)技术和原理

R. K. Saiki.<sup>[2]</sup> 和 K. B. Mullis.<sup>[3]</sup> 分别

于 1985 年和 1987 年发展了一种多聚酶链反应“polymerase chain reaction (PCR)”技术,又称无细胞分子克隆系统或特异性 DNA 序列离体条件下引物定向酶促扩增法。这一技术能选择性富集一个特异性 DNA 序列,成  $10^6$  扩增。这样就使得很微量的靶 DNA,甚至被认为是不可检测的极微量的靶 DNA 扩增到足以供实验人员方便地进行检测和分析。就是说,能检测到单分子 DNA 或从 15 万个细胞中检测到 6 个靶 DNA 分子,或从 100 万个细胞中检测到 1 个靶细胞。此技术不但具有高的检测能力,还简化了操作程序,省却了将靶基因在细胞之间来回搬弄,细胞转化,基因提取,纯化等一系列操作,人称此是分子克隆技术中的一次重大革新。

PCR 技术原理: DNA 进行体外扩增,必须先使 DNA 经热变性处理,双链才能解开,从而得到两个寡核苷酸单链。再以单链为模板,实现反链杂交、退火。接着用大肠杆菌 DNA 多聚酶 1 Klenow 片段和脱氧核苷三磷酸延伸已退火的引物。全部扩增反应程序是,反复热变性处理特异性 DNA 靶位片段,令其双股链解开;进行反链杂交、退火、形成单链;接着用 DNA 多聚酶沿 DNA 链全程合成出两股双链

DNA 分子。然后开始第二个反应周期，一个引物的延伸产物可以作为另一个引物的模板，全程合成密 4 股双链 DNA 分子。这样在完成了一个反应周期后，其特异性 DNA 靶位片段的合成量都比上一个反应周期增加一倍。用  $n$  代表反应周期数，则特异性 DNA 靶位片段就按  $2^n$  指数式积累下去，一直达到所需要的数量为止<sup>[4]</sup>。全部反应程序参见图 1<sup>[5]</sup>：

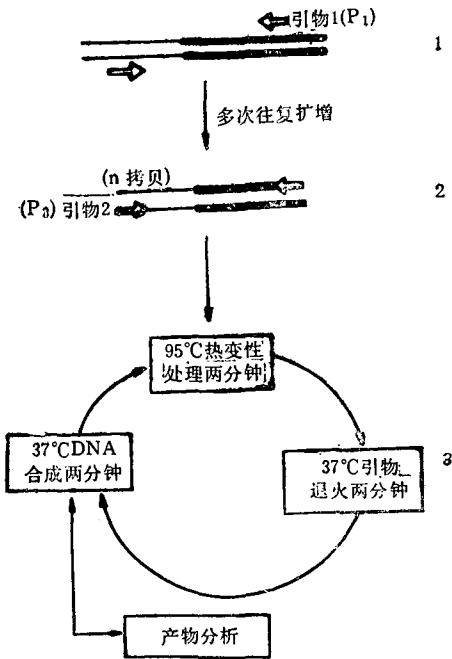


图 1 PCR 技术全程图解

1. 待扩增的特异性 DNA 靶位片段双链（粗线部分）和与之互补的 PCR 引物（引物 1 和引物 2）之间的关系。空箭头指引物和 DNA 多聚酶催化延伸的方向。2. PCR 经过数个周期后所得到的产物，实际上就是两个引物的 5' 端之间的基因组 DNA 序列，根据引物之间的距离，即可确定产物的长度。3. PCR 总的操作流程

PCR 技术比起传统的基因扩增法虽然具备了许多突出的优点，但由于扩增反应的每一个周期起始时的热变性处理，会导致 DNA 多聚酶钝化，就是说，每加入一次酶只能完成一个扩增反应周期。要是再继续下一个扩增反应周期，势必要在反应系统内再添加新酶，以代替被热钝化的 DNA 多聚酶，这就给 PCR 技术操作程序添了不少困难。这也是 PCR 技术在一段时期内没有引起生物工程学界的足够重视的

原因，人们期待对这一技术的进一步完善。

## 二、热稳定 DNA 多聚酶完善 PCR 技术

1988 年美国 R. K. Saiki. 等<sup>[6]</sup>从温泉水中分离到一株水生嗜热杆菌 (*Stearophilus aquaticus*)，这株菌能产生遇热稳定的 DNA 多聚酶，用它来代替大肠杆菌多聚酶 1 Klenow 片段可显示出许多优点。为了区别起见，便将它命名为 Taq 多聚酶。将它应用于特异性 DNA 靶位片段扩增反应，在热变性处理时，不会被钝化，也就不必在每次扩增反应后再加入新酶供下一个扩增反应周期使用，而是连续反应下去。这样就大大地简化了工序，使扩增反应能够在较高的温度条件下完成，显著改进扩增产物的特异性、产率、敏感性及长度。经过计算，在 4 小时内约可完成 30 个周期的扩增反应，1 个靶 DNA 序列理论上可以扩增成 10 亿个以上的拷贝。应用此技术去检定一个靶 DNA 分子，即使这个靶 DNA 分子在  $10^9$  细胞样品中只出现过一次，也无一遗漏<sup>[7]</sup>。

如果引物的 5' 端存在少数与原先的 DNA 模板错配的碱基，这对 PCR 技术的扩增率也无重大影响，故而可以将诸如限制性酶切位点连接物、核苷酸替换、缺失、插入或调节性因子通过寡核苷酸引物加入到 PCR 技术扩增产物中<sup>[4]</sup>。

这项技术的另一个特点是，还可以利用来扩增 RNA 转录片段。先按标准方法用寡脱氧胸苷引物和逆转录酶将 mRNA 转变成为主链 cDNA，再将得到的单链 cDNA 直接用 Taq 多聚酶进行扩增。使用 HLA-DQa PCR 引物时<sup>[8]</sup>，mRNA 转录片段即便只有淋巴样干细胞多腺苷酸 [poly(A)<sup>+</sup>] RNA 制备的 100 ng cDNA 中的 0.01% 左右，也可以方便地进行扩增，产生 1 μg 有 242 碱基对长度的特异性片段<sup>[6]</sup>。

当然，PCR 扩增产物呈指数相累积也不是一个无止境的过程，作为多聚酶底物的引物-模板要是累积得多了，而现有酶量在额定时间内又不足以实现全程延伸。扩增反应效率即开

始下降, PCR 产物的累积呈线性,而非呈指数相累积。以  $\beta$ -珠蛋白靶位序列扩增为例,在 Taq 聚合酶活性成为限制性因子前,较高的酶催化反应特异性能够延续 25 左右个周期,靶序列扩增量达到  $4 \times 10^6$ ,然后保持“平稳”。“平稳”效应与扩增周期数或扩增度没有直接关系,而是取决于总 PCR 产物浓度、酶浓度和在 70℃ 条件下延伸时间的长短。

Taq DNA 多聚酶扩增的特异性既受引物延伸所需时间的影响,又受反应时所使用的酶量的影响。不同的延伸时间和 Taq DNA 多聚酶单位所得 PCR 产物的电泳图表明,随着延伸时间加长和 Taq 多聚酶单位量增大,非特异性 DNA 量也随之增加。把引物的退火所用的温度从 40℃ 提高到 55℃,可大大提高 Taq DNA 多聚酶扩增的特异性,这一结果也已由  $\beta$ -珠蛋白基因的扩增所证实<sup>[6]</sup>。

### 三、PCR 技术的应用

1988 年初,美国西北大学医学院运用 PCR 技术检测新生儿血清检查阳性的末梢血液单核细胞 DNA,从中确诊婴儿是否携带人体免疫缺陷病毒 (HIV-1)<sup>[7]</sup>。用常法检查,只能检测婴儿体内 HIV-1 抗体,而抗体既可能来自婴儿自身,也可能来自带病毒的母亲。婴儿自身虽然有来自母亲的抗体,但他们自身可能实际上是不带 HIV-1 的。因为母亲的抗体在婴儿出生后能够在婴儿体内继续存在 15 个月之久,所以婴儿体内虽然发现有抗体,不一定说明有病毒通过胎盘感染子宫里胎儿的。

另一个例子,一个人可能被好几个品系的 HIV 侵染,被侵染的某些人体细胞内有多到 7 个 HIV 遗传变异株,它们之间的差别都很细微。目前通用的方法是,用人细胞培养病毒,经过几代后,才能人工选育某些品系在培养时生长良好,检查 HIV 的真正变异性。有了 PCR 技术,能使单株病毒马上扩增成能够进行 DNA 序列分析的量,无须通过病毒繁殖进一步检查遗传变化。分析病毒 DNA 序列的结果表明,病毒学家们过去对这类的病毒变异性是低估

了,不仅病毒与病毒是不一样的,就是病毒基因组之间也是不一样的,从人体分离到的每一组病毒也可能是病毒的混合体。其中一个最有意义的发现是,病毒也有缺陷型,这些病毒经过突变产生了一些称为“终止密码子”的短序列。它们是嵌镶在编码氨基酸的序列位置上,有阻止病毒 DNA 在细胞内表达的功能。预期这一重大发现有可能弄清某一病毒致病的原因,为什么这一品系的 HIV 会比另一个品系的 HIV 更具有致病力。

运用 PCR 技术还能检定急性骨髓母细胞白血症患者血细胞中的体细胞 ras 变异,或者用来研究结肠直肠癌。还有近期的一项应用,杜氏肌病 (Duchenne myopathy) 患者面部、肩、臂肌明显萎缩,还伴随肌病面容的表情。现在弄清楚 DMD 基因是造成这类疾病的遗传变化的靶基因<sup>[5,9]</sup>,其产物杜氏病肌胞内膜蛋白 (dystrophin) 也是近两年才检测到的。它存在于人体 13 种不同组织中,运用 PCR 技术便能检测人体这些组织中经过处理的转录片段,估价它们在这些组织中产物的比较量,范围从骨骼肌占总 mRNA 的 0.02%—0.12% 到淋巴细胞细胞的比这个量还要小 25000 倍的量<sup>[10]</sup>。

PCR 技术的全部操作过程已实现自动化,PCR 仪已见之市场<sup>[1]</sup>。预期不久将用于产前诊断,遗传病、艾滋病等。美国 Cetus 公司仅艾滋病病原试验今年将达到 4 万次,每次约需 145 美元。明年将达到 1150 万次,每次费用将降低到 10 美元。PCR 技术总的潜在市场单是医学应用一项将达到 15 亿美元。我国复旦大学遗传学研究所、上海第二军医大学分子遗传学实验室也在从事 PCR 技术的研究与开发,其中复旦大学研制的耐热 DNA 多聚酶,产酶率可达 1000 单位/升以上,比美国 Cetus 公司及中美合资的华美公司的 YT-1 菌的产酶率 (130 单位/升)高<sup>[11]</sup>。PCR 技术对研究活化的致癌基因、等位基因序列变异、法医,分子生物学的许多领域都有广泛用途。

#### 四、比 PCR 技术更先进的 Q- $\beta$ 复制酶技术

比扩增特异性 DNA 分子 PCR 技术更先进的,还出现了扩增重组型 RNA 分子的 Q- $\beta$  复制酶技术<sup>[12]</sup>。病毒侵入细菌细胞内,经 20 分钟左右,即由 1 个繁殖成 100 万个左右,这是大肠杆菌噬菌体分泌的一种病毒 RNA 多聚酶的作用,此酶又称 Q- $\beta$  复制酶。此技术跟 PCR 不同,主要是扩增特异性 RNA 探针,按指数相高效地拷贝天然 RNA 分子序列。30 秒钟可使病毒基因增加一倍;20 分钟即扩增到 1 万个拷贝;1 小时即达到 10 亿个拷贝<sup>[13]</sup>。Q- $\beta$  复制酶有如此高的扩增率,便有将它应用于临床诊断、全能性检定细菌、真菌、病毒传染病、癌症及艾滋病等。

其操作过程是,先制备 222 个核苷酸长度的重组型 MDV-1 RNA 分子模板,再将来自恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 的 21 个核苷酸长度的特异性单链 RNA 序列插入,构建成一个 RNA 探针。通过一种常规的 RNA 杂交试验,洗脱去所有未结合的 MDV-1,然后用 Q- $\beta$  复制酶扩增此杂交序列。这样检测到的重组型 RNA 分子便具备了两种功能:一方面能通过 RNA 探针序列与特异性靶 DNA 杂交,另一方面能作为 Q- $\beta$  复制酶模板,由 Q- $\beta$  复制酶催化合成互补单链产物。在产物链延伸合成后,产物链和模板链都能从复制复合物中释放出来。两者又可以游离状态作为下一轮合成时的模板,如此往复,成指数相扩增。重组型 RNA 分子探针开始反应时只有 890 个分子,与病毒 RNA 多聚酶反应 30 分钟,可达到 8200 亿个分子。如此巨大的分子足以通过

测热法检测,无需使用同位素。

嵌合到重组型 RNA 分子里的探针结合疟原虫靶基因,就是说在疟疾发作前就能够诊断病症;也可以确定引致此类病的寄生虫种的特性,这对于研究细菌基因调控和反链 RNA 无疑也是一种很有用的手段。

要是对该项技术再略加改进,便可以应用于临床同时诊断各类病原菌,迅速准确。而要达到完善的程度还有一个重要问题要解决,即探针分子的非特异性结合问题。因为非特异性结合会使背景干扰 (background noise) 超过了前景信号 (foreground signal)。如能设计出某种新型分子,把一些结构性因子嵌合到重组型 RNA 分子中,构建成一个分子开关,应答探针是否结合到了靶位上了。这样就大大降低背景干扰,从而能绕过这个问题。

Q- $\beta$  复制酶技术在某种意义上就是 PCR 技术的镜像,但它比 PCR 技术更为优越,在操作程序上省却了一系列热变性周期处理和终产物的分析。目前研究这项技术的除美国外,还有联邦德国、苏联、墨西哥等也在积极研究。

#### 参 考 文 献

- 1 Alberini C. *Trends in Biotechnology*, 1988; 6: 201
- 2 Saiki R K *et al. Science*, 1985; 230: 1350
- 3 Mullis K B *et al. Methods Enzymol*, 1987; 155: 335
- 4 Erlich H A *et al Nature*, 1988; 331: 461
- 5 Gros F. *Biofutur*, 1988; 73: 16
- 6 Saiki R K *et al. Science*, 1988; 239: 487
- 7 Cherfas J. *New Scientist*, 1988; 118: 33
- 8 Schart S J *et al. Science*, 1986; 233: 1076
- 9 Hoffman E P *et al. Cell*, 1987; 51: 919
- 10 Chelly J *et al. Nature*, 1988; 333: 858
- 11 张伯生. *工业微生物*, 1989; 3: 14
- 12 Lizardi P M *et al. Bio/Technology*, 1988; 6: 1197
- 13 A McGraw-Hill Publication's *Biotechnology Newswatch*, 1988; 8: 1

[本文于1989年4月27日收到]