

PCR 技术在基因突变研究中的应用

周晓柳 傅继梁

华西医科大学医学分子生物学研究室

1. PCR反应原理

多聚酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)是由 kary Mullis 及其同事们^[1]建立的一种体外核酸扩增方法,又有“无细胞的分子克隆”之称。它基于碱基互补原则,以待扩增的 DNA 片段为模板,在其两端加上与之互补的两段核苷酸引物,通过模板 DNA 在高温下变性、引物与其互补序列退火、用 DNA 聚合酶将退火的引物延长,这样反复进行的三步反应周期,每一周期的产物又可作为新的模板,进行新的合成反应,因此每个连续的周期使前一周期的合成产物加倍,经过几十个周期后,特异的靶 DNA 片段成 2^n 增加,通常需要几周才能完成的事,PCR 几小时就能完成,显示了 PCR 技术的巨大威力。由于耐热 DNA 聚合酶从水栖高温菌 *Thermus aquaticus*(Taq)中分离成功^[2],不仅增加了 PCR 所扩增的靶 DNA 长度,而且提高了其特异性,产率、敏感性,使 PCR 自动化成为可能,从而根本改变了整个反应性能。

2. PCR 进行专一性位点的诱变

PCR 技术广泛用于微生物检测,癌基因的探索、法医学检验、进化生物学研究和基因诊断等方面,在突变研究中的应用也日益广泛。Francois Vallette^[3]报道了用 PCR 技术进行专一位点的缺失、插入、替代诱变。传统的诱变方法所获得的突变率非常低,而且很麻烦,而一段用与野生型基因序列有一个或数个碱基不同的一段 DNA 作引物来合

成待诱变 DNA 的合成^[4,5],经复制后的片段将改变后的碱基序列带进扩增的产物中,然后用限制性酶消化,将其克隆进合适的表达载体,以代替野生型片段,获得较高的突变率。采用这种方法,Vallette 将特异的突变引入鼠肝细胞微粒体 P450b(P450 IBI)中的 20 个氨基酸残基的氨基端来研究突变后果。该方法可以对距离限制性酶切位点数百个碱基的区段进行诱变,但是它相对费时,且依赖于待诱变序列两端的限制性酶切位点的存在。Anne Hemsly^[6]等建立了更快速便简的方法来产生质粒任何所需位置的改变。以改变了一个或数个碱基的一段野生型基因序列作引物,经过 PCR 来引导合成整个含有突变的质粒(图 1)。两引物“背对背”地结合在相反的 DNA 链上,其中一个引物含有所需要的突变的一段 DNA 序列,它与质粒结合产生错配,导致点突变,经 PCR 复制后产生线状质粒分子,然后对它直接进行分离、连接、转化。这种方法可以在质粒任何所需位置引入突变,而不管它附近是否有限制性酶切位点存在。作者用 PBluescript I SK⁺作为模型,因为它可以提供一肉眼可见的检测系统来检测在 LacZ 的 α 多肽第 14 个核苷酸位置上引入移码突变(缺失一个碱基),造成 β -半乳糖苷酶失活,形成白色菌落。这种方法可以将至少 3kb 长的质粒进行复制产生线状片段。最近,Jeffreys, A.J.^[7]将此实验系统进行改进,可以诱变 10kb 的质粒,因此能在更广的范围内快速产生突变克隆。

运用 PCR 技术来产生特异位点的突变,在整个基因突变的研究领域具有很重要的作

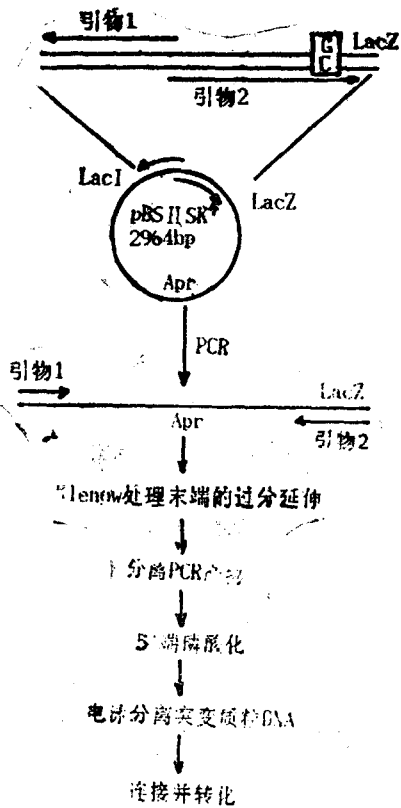


图 1 在 LacZ 又多肽的编码序列引入方框内碱基的缺失

用。

3. PCR 检测已知位点的突变

PCR 技术刚建立不久, Saiki RT.^[8] 就用等位基因特异性寡核苷酸(allele-specific oligonucleotide, ASO)与 PCR 相结合来提高镰形细胞贫血产前诊断的灵敏度, 用不到一天的时间, 代替需要几周才能完成的 Southern 杂交方法, 此后许多单碱基突变所引起的遗传病如 α -抗胰蛋白酶缺陷、多形性突变的胰岛素基因^[9]、以及地中海贫血等都有报道用 PCR 和 ³²P 标记的 ASO 探针相结合进行诊断分析。一个 ASO 探针只能与完全互补的序列退火, 因此一个碱基的错配就足以阻止在适当条件下的杂交。这种方法可检测 ng 或亚 ng 水平的 DNA 量, 1ng 的 DNA 相当于约 150 个二倍体细胞中基因组的 DNA 的量, 因此即使含有极微量细胞裂片的少量细胞粗提

物亦可作为 PCR 扩增的模板, 显示出很高的灵敏度。其局限性每一种 ASO 每次只能杂交结合在尼龙膜上的一种 PCR 产物, 经改进后的 PCR-ASO 系统可以同时用多个 ASO 探针来确定多个位点^[10]。ASO 探针, 接上 dT 多聚尾巴, 再结合在固体支持物上, 用生物素标记的引物经 PCR 合成产物可与探针杂交, 生物素标记的 DNA 可结合辣根过氧化物酶, 使无色的基质变成有色沉淀(图 2A)。不同的 ASO 可检测样品 DNA 中各片段特异的等位基因(图 2B)。这样多个等位基因的突变可以同时被检测。Saiki, RT 用镰形细胞贫血及珠蛋白基因等六个密码子的血红蛋白突变来证明 PCR-ASO 系统的特异性^[11]。用正常(β^A)、镰状细胞(β^S)和血红蛋白 C(β^C)序列的 ASO 作探针, 检测 PCR 扩增基

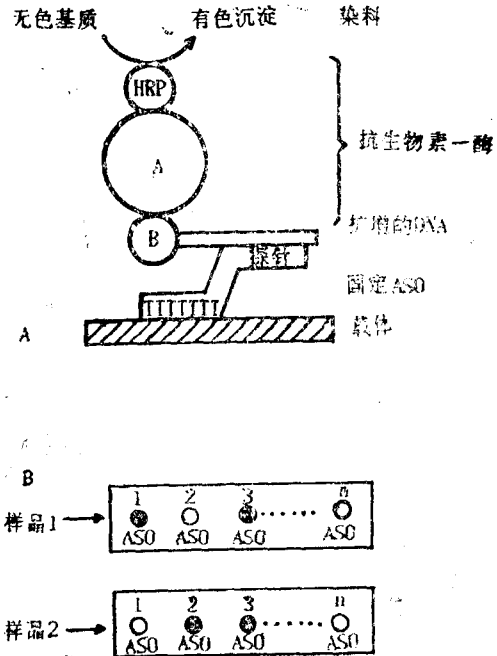


图 2. 用固定的寡核苷酸探针检测 PCR 扩增的 DNA

因组样品中这些等位基因的存在。实验证明: β^A 特异性探针只同带有 β^A 等位基因的可能的二倍体组合的样品杂交, 而与纯合子 β 珠蛋白基因缺失的细胞系 GMZ 2064 的 DNA 不呈现任何可检出的杂交。

利用PCR反应当限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析相结合来检测那些发生在酶切位点的点突变。例如, PCR-RFLP 可用于迅速检测癌组织中的癌基因 c-Ha-ras 第 12 位密码子若发生了突变, 它由 GGC 变成 GTC, 分别对这两种基因进行 PCR, 然后用 Hpa I 酶切, 进行 PFLP 分析, 不存在突变的基因扩增后的 100bp 可被切成二个相等的 50bp 片段, 如果发生突变, Hpa I 酶的识别位点丢失, 不能被消化, 用琼脂糖或聚丙烯酰胺凝胶电泳, EB 染色观察结果。另有报道用 PCR 合成脊髓性肌营养不良位点九个易缺失的外显子, 再用 RFLP 检测发生在营养障碍编码区的缺失^[12]。PCR-RFLP 不仅用于核 DNA, 而且用于线粒体 DNA 突变的检测。

Saiki, R. T. 用限制性寡聚物 (oligomer restriction, OR) 来检测镰形细胞突变^[13]。OR 是利用一个末端标记的寡核苷酸探针在溶液中同扩增序列的一个特定区域杂交, 重建一个特异核酸内切酶位点, 经特异性核酸内切酶切割产生一个确定大小的末端标记的寡核苷酸片段经放射自显影或电泳产生一个信号。若建立的酶切位点的碱基发生突变, 这个信号就发生改变。

4. 未知突变位点的检测

检测未知位点突变最直接的方法是 PCR 直接测定核苷酸序列或将 PCR 产物进行克隆后测定。此外 Almoguera, C 采用 RNA 酶 A 酶切电泳分析来检测那些发生在非酶切位点和不能构成酶切位点的位置上的 DNA 损伤^[14]。如果某基因片段发生了突变, 该正常 RNA 的互补片段由人工合成并用同位素标记作为探针, 与待测样品中的 DNA 或 RNA 杂交, 就形成 DNA-RNA 或 RNA-RNA^[15] 错配, RNA 酶 A 的酶切电泳图谱中出现较小的片段。若待检样品未出现突变, 酶切电泳不出现小片段。

另一分析 DNA 突变的有力方法是采用变性剂梯度凝胶电泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE)^[16]。DNA 分子发生一个碱基的改变, 其解链温度 T_m 改变 1.5°C , DNA 序列的改变造成其解链温度的变化, 在变性剂梯度凝胶上表现出不同的迁移率, 理论上 DGGE 能分辨一个碱基的改变。在溶液中, DNA 分子以不同的区段进行解链(解链区域)。当 PCR 产物用含有线性浓度分布的变性剂的聚丙烯酰胺凝胶电泳时, 一旦 DNA 片段进入能使其最低 T_m 解链区域解链的浓度区时, DNA 分子就形成分枝结构, 其迁移率在凝胶介质中降低, 但是若碱基改变发生在高 T_m 区, 通常的 DGGE 不能检测出, 就需要在 DNA 片段的 5' 加上一个富含 GC 的片段(GC 夹), GC 片段本身就形成一个变性区, 其 T_m 高达 90°C , 保证在通常的变性剂梯度范围内无论待检 DNA 分子的哪一部分碱基发生突变, 变性后都保持分枝结构, 从而在电泳图谱上表现出来, 呈现出不同的带形。但是实验证明, DGGE 不易保证变性剂在凝胶中梯度分布的均匀性和重复性, 这一点可以通过温度梯度凝胶电泳^[17](temperature gradient gel electrophoresis, TGGE) 来克服, TGGE 与 DGGE 原理相同, 但操作更简便易行, 用 TGGE 代替 DGGE, 能得到相同的结果。

由于 PCR 技术具有高特异性、高效率、高灵敏度的特点, 它越来越成为研究分子突变最有效的方法, 为我们在分子水平上阐明突变的发生及其后果提供了有力的实验手段。

参考文献

1. Erlich HA. Basic Methodology. In: Erlich HA, eds, PCR technology principles and applications for DNA amplification. New York, Stockton press, 1989; 1-6
2. Saiki RK, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable

- DNA polymerase, *Science* 1988, 239: 433
3. Vallete F, et al. Construction of mutant and chimeric genes using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Research* 1989, 17(2): 723
 4. Hemsly A, et al. A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Research* 1989, 17(16): 6545
 5. Higuchi R, et al. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acid Research* 1988, 16(15): 7351
 6. Kadowaki H, et al. Use of polymerase chain reaction catalyzed by Taq DNA polymerase for site-specific mutagenesis. *Gene* 76(1): 161
 7. Jeffreys AJ, et al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction: towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acid Research* 1988, 16(23): 10953
 8. Saiki RK, et al. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes (ASO). *Nature* 1986, 324(6093): 163
 9. Miyano M, et al. Use of invitro DNA amplification to screen family members for an insulin gene mutation. *Diabetes* 1988, 37(7): 862
 10. White TJ, et al. The polymerase chain reaction. *Technical Focus* 1989, 5(6): 185
 11. 邓国仁. 一种测定癌基因 c-Ha-ras 点突变的简易方法. *生物化学杂志*. 1989, 5(6): 482.
 12. Chamberlain JS. Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification. *Nucleic Acid Research* 1988, 16(23): 11141
 13. Saiki RT, et al. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985, 230(4732): 1350
 14. Almoguera C, et al. Most human carcinomas of the exocrin pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988, 53(4): 549
 15. Forrester K, et al. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987, 327(2): 6188
 16. Myers RM, et al. Mutation detection by PCR, GC-clamps, and deaturing gradient gel electrophoresis. In: Erilich HA, eds. PCR technology principles and applications for DNA amplification. New york: stockton press, 1989, 71-88
 17. 陈雁, 等. 一种新的 DNA 双向电泳技术——温度梯度凝胶电泳. *遗传与疾病* 1989, 6(1): 1

(上接第35页)

(2-3%)有4例吸烟在1-8年外,其余11例吸烟时间均在16年以上,最长达50年。这样看来,吸烟引起的微核率改变的程度,除与个体敏感性的差异有关外,可能还与吸烟时间的长短密切相关。

3. 外周血淋巴细胞核异常的观察

全组外周血淋巴细胞除微核率较高外,还常可观察到核的形态异常改变,如核裂解和核固缩等。有时在淋巴细胞中观察到微核由核变形、膨出延伸;连丝消失等一系列中间形成过程(见封二照片1-6)。上述各种核

的异常改变,提示了吸烟可诱发细胞核的损伤,进而导致遗传结构的改变。

本工作100例吸烟者观察结果表明,吸烟可引起体细胞遗传物质的损伤,这表现在自发微核率和核损伤的增加。体细胞遗传结构损伤是癌变基础。因此,吸烟对健康的危害应引起重视。

参考文献

1. 薛开先, 等. 人体末梢血微核测试法的改进. *辐射防护* 1988, 8(3): 224
2. 薛开先, 等. 老年人淋巴细胞微核率及其一些影响因素的初步观察. *遗传* 1988, 10(4): 37