

多聚酶链式反应

毛裕民 盛祖嘉

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

1985年以前进行遗传病的产前诊断一般都用羊膜穿刺术采取羊水水中的胎儿脱落细胞, 抽提它们的DNA, 然后用分子杂交等方法进行检测。一次检测需要几天时间, 而且胎儿至少四周, 操作既复杂又较不安全。1985年美国Cetus公司人类遗传学实验室的科学家发明了一种检测镰形细胞贫血症的方法^[1], 它的优点是灵敏度比已有的方法高出至少一百倍, 每次检测可以在10h内完成, 而且怀孕两周便可检测, 并且手续简便安全。

已经知道镰形细胞贫血症患者和正常人的差别是正常人的 β^A 基因的第六个密码子的第二位碱基是A, 患者的 β^S 基因的相应的碱基是T。由于这一改变便带来某些限制酶(例如DdeI或MstII)酶切位点的改变。根据这一改变, 可以通过限制酶的处理和分子杂交来进行产前诊断。这一新的方法的原理是将包括突变位点的一个DNA片段进行体外扩增, 把扩增得来的DNA进行检测。 β 珠蛋白基因的核苷酸顺序是已知的。首先合成包括突变位点在内的110bp片段两端的两个20bp的寡核苷酸片段作为引物, 一个引物可以和110bp片段的(+)链的一端相结合, 另一引物可以和这一片段的(-)链的另一端相结合, 在大肠杆菌DNA多聚酶I的Klenow片段的作用下进行体外DNA扩增, 一再重复变性、引物结合、DNA复制这一周而复始的过程, 便可以取得这一110bp片段的大量拷贝。 $1\mu\text{g}$ 的DNA经过20个周期的扩增增加了 2×10^5 倍。这一方法称为多聚酶链式反应(PCR)。

这一方法的缺点是变性必须在高温中进行, 而高温使DNA多聚酶失活, 因此必须在每一DNA复制过程中加入新的多聚酶, 这不但使操作费事, 而且更容易造成差错。1988年Cetus公司的科学家把嗜热细菌Thermus aquaticus的耐热的DNA多聚酶(商品名称Taq)应用于PCR, 于是克服了上述困难^[2], 出现了DNA重组技术中的又一次飞跃。应用耐热DNA多聚酶的PCR有许多优点, 如专一性高、得率高、灵敏度高、扩增片段长、操作简便而且可以使操作自动化、可以适用于变性的DNA等。

1. 专一性 用耐热DNA多聚酶进行PCR时引物结合在40℃中进行, DNA复制则在70℃中进行。在40℃中引物可以和核苷酸顺序并不完全相应的模板链结合, 在由40℃转向70℃的过程中与模板链结合不够专一的引物就从模板链上脱离, 这样就会使扩增的专一性提高。而且由于前一周期中复制得来的DNA成为后一周期中的模板, 专一性将随着复制周期的增加而更加提高。如果把引物结合的温度由40℃提高到55℃, 那么专一性还可以进一步提高。

本文1989年4月29日收到。

2. 得率 体外 DNA 扩增达到某一程度时效率便下降。用 Klenow 片段进行扩增 β 珠蛋白时大约 20 个周期后效率明显下降, 这时扩增倍数约 3×10^5 。用耐热 DNA 多聚酶进行扩增则至少可以提高到 25 个周期, 扩增倍数可达 4×10^5 。

3. 灵敏度 由于大量扩增和扩增的高度专一性, 使检测的灵敏度大为提高。将不同量的正常人的 DNA 加入到发生缺失突变的 DNA 中, 然后用耐热的多聚酶进行体外扩增。通过这样的实验证明在 10^5 — 10^6 个细胞的 DNA 中加入一个待检测的 DNA 分子(相当于 10^6 个基因组中的一个基因), 经过扩增以后可以检出这一分子。

4. 扩增片段的长度 用 Klenow 片段进行体外扩增只能限于 250bp 的片段, 用耐热多聚酶则可以扩增不下于 400bp, 甚至长达 2kb 的片段。

5. 忠实性 用耐热多聚酶对 239bp 的片段进行 28 个周期的扩增后, 发现有 17 个错误参入但没有缺失和插入, 相当于每对核苷酸每一周期错误参入率 2×10^{-4} 。这一错误参入率比用 Klenow 的 PCR 进行 DNA 扩增的错误参入率 (8×10^{-5}) 约高出 2.5 倍。不过这样的错误参入率在实际工作中不至于带来困难。少量错误参入在许多实验中不会影响结果, 而且同样的错误很少出现在重复实验中。

6. 操作简便 和用 Klenow 片段进行的 PCR 相比, 用耐热的多聚酶进行 PCR 可以避免经常加酶, 所以既便于操作, 又能使操作自动化^[3]。用自动化仪器进行 DNA 扩增可以在 4h 以内同时扩增 48 个样品达 10^6 倍, 而且不必抽提 DNA, 用细胞的粗抽提物也可以达到同样的目的。

由于以上种种原因, 使用耐热的多聚酶进行 PCR 这一方法得到广泛的应用。例如用来检测由碱基置换带来的镰形细胞贫血症^[2], 与限制酶切位点多态性有关的血友病 A, 由于缺失造成的 α -地中海贫血等; 同样的方法可以用于胎儿性别鉴定以及染色体易位的检测等; 同一方法还可以用来检测病毒^[4]。在病毒检测方面, 它比一般的免疫学方法有两个优点: (1) 免疫学方法并不直接检测病毒, 而这一方法则直接检测病毒; (2) 免疫学方法只能检测成熟的病毒, 而这一方法可以检测没有成熟的病毒。用这一方法还可以检测癌基因或癌变。癌基因可以由致癌物质激活, 激活过程中常伴随着碱基置换等变化。经黄曲霉素激活的 c-ki-ras 癌基因曾通过 DNA 扩增和核苷酸顺序直接测定方法测定^[5]。初步实验结果说明它还可以用来检测原发性肝癌^[7]。据统计有下列病变曾经用 PCR 方法检测^[3]: 自毁容貌症、肌肉萎缩症、依赖胰岛素的糖尿病、胰腺癌、慢性白血病、艾滋病。

由于应用耐热多聚酶的 PCR 的特别高的灵敏度和适用于变性 DNA, 这一方法在司法工作中也有广泛的用途。犯罪分子留下的生物学证据中最多的是毛发和血迹, 在这些样品中的 DNA 分子常是变性的。实验结果说明可以用单个毛发作为样品鉴定这一毛发的主人^[6]。在动物学研究和人类学研究中取毛发样品比取血液样品更为简便易行, 所以这一方法在动物学和人类学研究中也很有用。

在基础研究方面, 这一方法可以用于核苷酸顺序分析、染色体畸变和基因突变研究等, 在以上所引用的文献中都可以看到有关的实例。

PCR 方法还在不断地扩大应用范围。PCR 一般用来扩增两个引物之间的一个 DNA 片段, 但是稍加改变可以用来扩增引物外侧的两个 DNA 片段^[7]。这一方法的原理是把包括所要扩增的两侧 DNA 片段的整个 DNA 片段切下, 把两端连接起来成为一个环状的分子, 然后把中间切开, 这样便把内外颠倒过来。再把引物结合在两端使中间的 DNA 片段扩增, 实际上所

扩增的便是原来处在两个外侧的片段。这种方法称为反向多聚酶链式反应 (Inverted PCR)。另一种方法称为不对称多聚酶链式反应 (Asymmetric PCR), 或者称为不平衡多聚酶链式反应 (Unbalanced PCR)^[8]。在这种方法中两个引物所用的克分子量不等, 这样扩增可以得到大量的一个单链, 可以用来直接测定核苷酸顺序。还有一种方法称为复合多聚酶链式反应 (Multiplex PCR)。用这一方法可以同时扩增几个基因, 例如可以同时用 9 组引物扩增有关杜氏肌肉萎缩症的 9 个基因^[9]。这种方法非但提高了工作效率, 而且还提高了专一性。

除了 1985 年首创 PCR 反应的一篇论文以外, 这里所引用其他有关 PCR 应用和改进方面的文献都是 1987—1988 年两年里面的, 由此可见它的发展有很大的潜力, 前景将是十分诱人的。

我们近年来从事嗜热细菌分子遗传学研究和大肠杆菌的 DNA 复制研究。正是在这两项研究的基础上从 1988 年开始进行嗜热细菌的耐热多聚酶研究, 我们从温泉中分离得到二十几株嗜热细菌, 分别测定了它们的 DNA 多聚酶的耐热性和酶的产率, 从中选出一株较为理想的菌株 FD3009。它的 DNA 多聚酶的耐热性达 93℃ 以上, 与 Taq 多聚酶相同, 而酶的产率则比 Taq 酶的生产菌 YT-1 高出许多, 经优化培养条件后 FD3009 的产率达 15000U/L, 而据文献报道, YT-1 的产率是 130U/L^[10]。FD3009 所产的酶已经纯化, 酶制品经电泳后染色只显示出一条蛋白带, 电泳后进行原位反应并放射自显影, 也只显示出一条酶活力带, 这带和蛋白带位置重合。酶制品的比活高于 40000U/mg 蛋白质。酶制品经试用符合于进行 PCR 的要求, 这将有助于国内广泛开展应用 PCR 的基础和应用研究。

在 PCR 的应用研究方面我国已经取得一系列的成就。例如上海市儿童医院医学遗传研究室已经完成了 α -地中海贫血、 β -地中海贫血、血友病 A、苯丙酮尿症等的产前诊断, 进行了异常血红蛋白基因 (HbD、HbS) 和 β -地中海贫血基因的鉴定和胎儿性别鉴定。他们用一滴干血完成了 β -地中海贫血突变的检测, 说明了这一技术的广泛应用前景^[11]。中国医学科学院基础医学研究所应用 PCR 技术广泛地研究了广西、广东、四川等地的 β -地中海贫血基因突变类型^[12]。复旦大学遗传学研究所已将这一技术应用到血友病基因的研究中^[13]。上海第二医科大学也已经采用这一技术检测人的巨细胞病毒。可以预见, 这一技术的进一步推广必将大大地推进我国的计划生育工作和医学分子遗传学研究。

参 考 文 献

- [1] Saiki, R. K. et al., *Science*, 230(1985), 1350—1354.
- [2] Saiki, R. K. et al., *Science*, 239(1988), 487—491.
- [3] Landegren, U. et al., *Science*, 242(1988), 229—237.
- [4] Kwok, S. et al., *J. Virol.*, 61(1987), 1690—1694.
- [5] McMahon, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(1987), 4974—4978.
- [6] Higuchi, R. et al., *Nature*, 332(1988), 543—546.
- [7] Ochman, H. et al., *Genetics*, 120(1988), 621—623.
- [8] Gyllenstein, U. and Erlich, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88(1988), 7652—7656.
- [9] Chamberlain, J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 16(1988), 141—156.
- [10] Chien, A. et al., *J. Bacteriol.*, 127(1976), 1550—1557.
- [11] Huang Shu-zhen et al., *Hum. Genetics (in press)*.
- [12] 刘敬忠等, 中国医学科学院学报(待发表).
- [13] 周洁民等, 科学通报(待发表).