

用无细胞克隆系统进行特异 DNA 扩增的技术——PCR

刘 宏 迪

(中国科学院微生物研究所,北京)

作为分子生物学基石之一的分子克隆技术,是一系列技术的总称,包括目的基因的提纯、选择有自主复制能力的载体 DNA,选用不同的限制性内切酶,构建新的重组 DNA,导入受体细胞,重组 DNA 的转化,转化后遗传物质和性状的转移及重新组合,重组 DNA 的纯化扩增等。该系列技术的操作相当复杂繁琐且耗时长。如何从极微量的生物材料中简便快速地得到大量特定的基因,或是在众多复杂的生物基因 DNA 中,如人的 5 万多个结构基因中,检测单拷贝基因,辨别庞大的基因家族中的基因真伪等,这些已是传统的分子克隆技术不能轻而易举所能办到的了。1985 年,美国 Cetus 公司人类遗传部的 Mullis 等,为解决识别核酸序列灵敏度和专一性问题,在体外对检测序列进行酶促扩增,建立了“无细胞分子克隆系统”(cell-free molecular cloning),即多聚酶催化的链反应 (polymerase chain reaction,简称 PCR),使传统分子克隆技术中的诸多不足得到了突破性的改进。PCR 技术既无需事先构建含有目的基因的载体,又无需将载体导入细胞进行转化扩增和复杂的抽提、纯化等后处理,该技术只需要一对很短的引物,在体外短时间内即可得到大量的特定目的基因。因此,PCR 的发明是分子生物学研究中的重大突破。

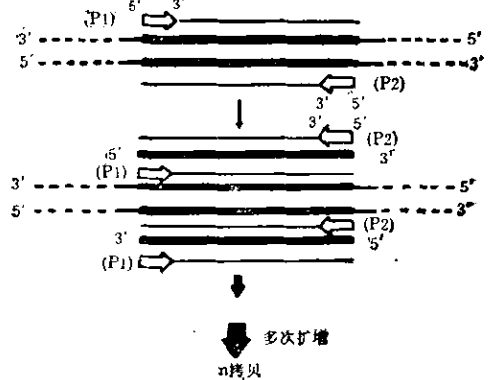
1988 年 9 月在美国 Banbury Center 举行的 PCR 技术研讨会上,美国和来自欧洲的近 40 名代表报告了 PCR 技术在应用方面的最新进展,特别是在临床诊断方面的快速应用,检测点突变和检测真核生物 DNA 序列时缺失的补救 (additional step) 等。PCR 技术在基础研究、生物工程和医学等诸多领域上的应用,对传统的基因克隆、分子杂交、序列分析等现代分子生物学技术的发展,具有难以估量的推动作用。本文将就此技术的原理、操作、应用及发展前景作一介绍。

(一) 原理

在体外对 DNA 中作为模板的特异性靶序列进行扩增,应用 PCR 技术,即在一对引物介导下的酶促扩增(放大)的方法,在数小时内即可将所需的特异性靶序列合成 100—200 多万拷贝。

人工化学合成的两个寡聚核苷酸引物决定了 PCR 扩增 DNA 时作为靶序列的特异性。首先,将作为模板靶序列的 DNA 其基因组同引物一起热变性,然后进

行引物与其互补的 DNA 靶序列配对复性,此时这对引物将分别同所需的特异性靶序列 DNA 片段两侧相对应的两条链进行互补配对,再经过 DNA 聚合酶对复性引物的延伸。经过多次重复“热变性-复性-延伸”这样一个循环性周期。在这一对引物之间所需要的那一段特异性靶序列就可以得到大量扩增。因为每重复一个循环周期,这段靶序列就会比上一周期扩增 1 倍,循环周期的不断重复使靶序列以近似 2^n 的指数(n 在此处代表周期数)进行扩增。在这种形式中,每次重复一个周期的结果,都会使其中一个引物延伸的产物,在热变性后就可复性时成为另一引物配对及酶促反应时的模板。靶序列的成倍递增,加上这对引物的“交叉换位”定向结合,就是说酶促反应后延伸的新链 5' 端必然是上一周期 PCR 反应引物的相同序列,所以又是下一循环周期相对应引物寡核苷酸配对的结合位点,从而保证了引物特异性的定向结合。这对引物 5' 端是相互背向的,当它们准确地定向结合在扩增靶序列区域的两侧时,在酶促反应中又是从 3' 端相互面向延伸,进而也就确保了反应产物的特异性。随着循环周期的增加,新合成的产物也必将成为主要模板,而作为起始模板的 DNA 将相应地急剧减少,扩增产物的 5' 末端也是受引物 5' 末端的限制,所以最终获得的产物绝大



— 靶序列
--- 基因组 DNA
— 新延伸链
⇨ 引物

图 1 PCR 反应示意图

多都是这对引物定向结合时,相互背向的5'末端之间的靶序列区域。

PCR 扩增方法最引人注目的特点是,作为引物的5'端如果人为地加以修饰,可以增加一些与原有模板DNA不完全互补的错配序列。这不会影响靶序列的扩增,因此大可利用这一特点进行人为修饰添加其他序列(起始密码、终止密码、限制性内切酶位点等),通过对寡核苷酸引物在PCR扩增的过程中加入到扩增产物中,按人的意愿进行定向地修饰扩增产物。

(二) 技术操作

以PCR方法完成的特异性DNA序列的扩增,技术操作的本身并非是条款的堆砌,在具体操作时首先应该知道如何做和为什么这样做。

从上述原理中可以看到,PCR方法在体外进行酶促扩增DNA的形式,完全类似天然DNA的复制机制,均属DNA聚合酶依赖于DNA模板进行复制这一特性。因此,从细胞中分离出的基因组DNA,应该没有外源和内源蛋白酶、DNA结合蛋白、核酸酶(这些都是影响聚合酶及合成产物的因素)。有了模板DNA,模仿体内的复制过程,附加一对人工合成的寡核苷酸引物,即可进行扩增。这对引物的设计,其序列是依照基因组DNA作为模板靶序列扩增区域两侧的边缘序列碱基(通常为20个碱基左右)而确定的。所谓一对引物,是指设计时应考虑到每种引物应分别同靶序列DNA中相对应的一条DNA链互补配对。根据PCR方法的另一特性,可将人为修饰的错配碱基在设计时添加进去,使产物按人的意愿加以改造。

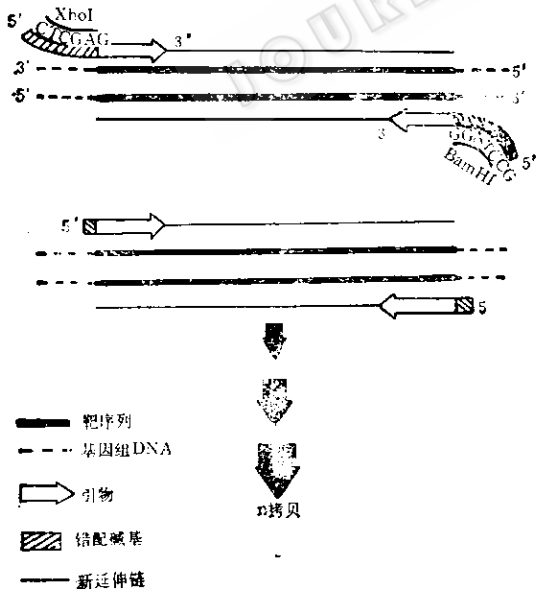


图2 引物酶切位点的设计

有了模板、引物在聚合酶的作用下诱发聚合反应,就能使所需要的靶序列DNA得到扩增。PCR扩增

的全过程是由变性、复性、延伸周期性的循环组成,而控制这三步之间的变换则由温度所决定。

最初,当模板DNA、引物在95℃加热变性,在反应液移至40℃与相应的靶序列两侧复性后,加入大肠杆菌的DNA聚合酶I的Klenow片段催化引物的延伸,反复进行这种周期性的循环即可得到扩增产物。但由于Klenow酶促反应的最适温度是37℃,且此酶又不具有耐热性,因此,每经一次热变性周期后都需重新加酶以便进行下一周期的酶促反应。受反应温度限制,造成引物配对的非特异性影响,又存在模板序列DNA的二级结构干扰酶促反应时造成聚合的不完全。这样使非特异性产物就不可避免地出现。使用T₇DNA聚合酶除了能提高酶促反应时碱基掺入的忠实性(错误率小于10⁻⁷),却不能解决上述问题。也有使用T₇DNA聚合酶进行扩增的。但因为存在所需要靶序列之外的非特异性产物,这种特异性的偏差和酶本身的限制,无疑将减少真正的产物。况且要得到一定量的DNA,PCR扩增的周期性循环一般要达到二三十次,故使用上述DNA聚合酶进行反应既繁琐费时又不经济。

在对嗜热菌中DNA合成机制的研究时,人们相继从*Thermus aquaticus* VT-1; *Thermus thermophilus* HBS; *Bacillus stearothermophilus* 三菌株中分离提纯到了DNA聚合酶,其中第1第3种菌的DNA聚合酶在90—95℃之间具有良好的热稳定性。鉴于最初建立PCR方法时所用的酶有诸多不便和缺点,为了克服这些缺陷,现在已都采用具有耐热性的Taq DNA聚合酶(上述第1菌种中提取的)^[11]。因其具有对高温(95℃)的耐热稳定性,及其聚合时酶的最适反应温度是75℃这些优越性,在DNA变性时,此酶能耐受高温的影响,每一反应周期就无须对其更新,从而大大简化了操作。如在复性提高温度加强引物配对的特异性,也不会造成酶的失活。这样又进一步提高了产物的特异性。此酶的使用使PCR方法迈入了自动化系统的控制,而且使此方法进入了实用化阶段。

选择什么样的DNA聚合酶是进行PCR扩增的关键。当扩增片段大于250bp时使用Klenow片段和T₇DNA聚合酶,便从扩增率中可明显地发现这两种酶的延伸能力较弱,而Taq DNA聚合酶的延伸能力要强得多,已报道能从不同基因组中扩增了2kb,3.2kb和10kb长短不等的靶DNA^[12]。值得注意的是,Taq DNA聚合酶的复制过程中错误掺入核苷酸比率是1:7,500,显然同T₇DNA聚合酶的错误掺入频率小于10⁻⁷不能相比,但却同Klenow片段的错误掺入频率1:10,000大致相同^[13]。

随着近年对Taq DNA聚合酶的不断研究和更进一步的了解,应用此酶在对DNA体外扩增和序列分析上均已取得可喜的成绩,因此人们进行PCR的

有关实验研究中多采用 Taq DNA 聚合酶,这已成为一种“入时”的方法手段。特别是 1988 年 6 月我国华美生物工程公司继美国 Cetus 公司之后,生产出此酶并推向市场,近两年国内各研究单位在 PCR 方法选择 DNA 聚合酶时,常规使用的已是 Taq DNA 聚合酶。

操作中注意下述几点就能避免使用 Taq DNA 聚合酶时 PCR 产物中所出现的非特异性物质。这几个因素是:

1. 基因组作为模板的 DNA 应没有蛋白酶、核酸酶及 DNA 结合蛋白。

2. 引物本身的设计中应避免 3' 端有互补的重叠,使引物自身的二聚物不易出现。

3. 引物与模板 DNA 复性温度提高到 55°C 时可大大增加两者配对的特异性,进而增加产物的特异性,延伸的时间过长也是造成非特异性产物出现的原因。

4. 引物与模板量的配比是重要的,尤其 Taq DNA 酶量不宜过多。少加引物不仅是为了节约,因引物浓度高可能产生二聚体或是非特异性扩增产物(当模板靶 DNA 浓度低时),而在靶 DNA 浓度高和进行多次循环后就要确保引物有足够的浓度。

5. 后期反应中扩增率降低可从是否引物-模板与酶的比值过大;引物或 dNTP 消耗所剩无几或耗尽;或是产物过多造成自身的缠绕及自相结合,而与引物结合不利。如果上述条件均适宜时,PCR 产物不可以指数形式扩增出现平缓的所谓平台现象,就可终止反应或是根据情况调整反应系统。

(三) 应用及前景

尽管 PCR 的使用是近两年的事情,但已被广泛地应用到基础和应用的许多领域中。作为基因分析的手段已被应用于遗传性疾病的诊断上,如美国 Cetus 公司、乔治亚医学院 Huisman 教授及加州大学简悦威教授等及中国医学科学院基础研究所刘敬忠教授已用这一技术进行了镰刀状细胞贫血、 β -地中海贫血及 Bart's(一种最严重的 α -地中海贫血病)等的基因分析及产前基因诊断^[4-7]。基因转位活化癌基因的研究分析^[8], 感染性致病原的检测和致病基因的检测^[9-11],例如已成功地用于对人免疫缺陷有关的(AIDS)病毒 HIV-1 检测上^[9-11]。并已研制成对乙肝 HBV 和与宫颈癌有关的病毒 HPV 的分析检测试剂盒。这些都标志 PCR 技术可以在基因水平对病原体进行高灵敏度的检测,并证实是临床诊断的有效方法。

这种可以自动化扩增在体外进行无细胞克隆的方法还被运用于基因克隆和亚克隆中,并显示出其优势,只要查明所需基因作为靶 DNA 的两端序列,就能够短时间内从基因组 DNA 中,或是已克隆的载体上乃至 mRNA 序列中扩增到采用常规方法往往达不到的纯 DNA 样品。在从模板中“吊”靶 DNA 时,可在引物上人为地修饰,如在 5' 末端加入酶切位点,起始密

码,终止密码等的修改。经扩增使这些序列掺入复制到新合成的 PCR 产物中,以便进一步克隆或表达。如需要研究分析的 mRNA 量少,无疑反转录 cDNA 也困难,但在结合 PCR 方法扩增 mRNA \rightarrow cDNA 的产物,就很容易克隆和进行其它的分析了。另外此种方法在对基因表达调控的研究中也能起到十分重要的作用。因为对体内种类众多的各种特异性 mRNA 不管其含量多少均能做到灵敏地检测出来,因此就能达到鉴定其基因转录产物这一目的。值得注意的是,新近也有人创立了重组 RNA 的扩增(amplification of recombinant RNA)技术^[12],这也是获得大量 RNA 的另一有效途径。

PCR 除了定向地对各种基因组 DNA 中的靶序列进行扩增克隆外,在测序的应用上发展也很快。通常当要测定含量低的模板,经 PCR 扩增,适其所需量停止反应,去除引物及残余的 4 种 dNTP,即便扩增量少也能进行测序。此时加入第三种引物,用常规的末端中止法就能有效地进行测序。利用三个引物方法测序,第三种引物可以用扩增时一对引物的随意一种,但要引物 5' 端加以标记。也可用扩增靶序列中的某段互补序列,按 Sanger 的双脱氧法进行测序。另一种方法 GAWTS 法(genomic amplification with transcript sequencing),是将扩增引物之一 5' 端人为修饰入一段噬菌体 mRNA 聚合酶的启动子序列,得到的 PCR 产物在 RNA 聚合酶作用下,可转录成大量单链 RNA。用此产物就可作为反转录酶介导的双脱氧测序的模板(reverse transcriptase mediated dideoxy sequencing)^[13]。也可在扩增前分四管各加有不同的四种 α -硫代 dNTP,进行扩增后用 2-碘代乙醇或 2,3-环氧-1 丙醇在硫代位置上进行化学降解测序。值得一提的是高温下进行的酶促反应,可排除测序模板中二级结构产生假终止造成测序的不忠实性的干扰。

迄今,PCR 的优越性使它在科研、医学、法医学、考古等各领域都已获得了巨大成功。而在应用的同时不断改进深化^[14-17],其所具有的潜力将不断推动现代分子生物学的发展。

参 考 文 献

- [1] Saiki, R. K. et al.: *Science*, **239**: 487, 1988.
- [2] Le, Y. M. et al.: *Nucleic Acids Research*, **16**: 3719, 1988.
- [3] Saiki, et al.: *Science*, **239**: 487, 1988.
- [4] Saiki, R. K. et al.: *Science*, **230**: 1350, 1985.
- [5] Saiki, R. K. et al.: *Nature*, **324**: 163, 1986.
- [6] Kogan, S. C. et al.: *New Engl. J. Med.*, **317**: 985, 1987.
- [7] Embury, S. et al.: *ibid.*, **316**: 656, 1987.
- [8] Bos, J. et al.: *Nature*, **327**: 239, 1987.

(下转第 92 页)

(上接第113页)

- [9] Kwok, S. et al.: *J. Virol.*, 61: 1690, 1987.
- [10] Du, C-Y. et al.: *Science*, 239: 295, 1988.
- [11] Shibata, D. et al.: *J. Exp. Med.*, 167: 225, 1988.
- [12] Lizardi, P. M. et al.: *Biotechnol.*, 6: 1197, 1988.
- [13] Stoffel, E. S. et al.: *Science*, 239: 491, 1988.
- [14] Fahrlander P. D. and Klausner, A.: *Biotechnol.*, 6: 1165 1988.
- [15] Lawtence, A. Haff.: *Amplifications*, 1: 1, 1989.
- [16] Williams, J. F.: *Amplifications*, 2: 7, 1989.
- [17] Kawasaki, E.: *Amplifications*, 3: 4, 1989.