

# PCR 及其衍生技术在基因突变检测中的应用

颜志强, 杨胜利, 龚毅

(中国科学院上海生命科学研究院生物工程研究中心, 上海市漕宝路 500 号 200233)

**摘要:**许多人类遗传性疾病及某些抗艾滋病药物的抗性乃至细菌对某些抗生素的抗药性通常源于基因突变。本文对近年来在基因突变检测中应用日益广泛的各种 PCR 衍生技术作一综述;重点介绍了错配 PCR 技术,以及我们实验室近期报道的一种快速检测喹诺酮类药物耐药大肠杆菌的错配 PCR 方案。

**关键词:**遗传性疾病;抗药性;基因突变;错配 PCR

中图分类号:R37

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2003)02-0198-03

## Use of PCR Related Methods in Detection of Gene Mutation

YAN Zhi-Qiang, YANG Sheng-Li, GONG Yi

(Shanghai Research Center of Biotechnology, Institute of Biological Sciences, CAS, Shanghai 200233, China)

**Abstract:** Many inherited diseases and drug resistance have been attributed to mutations in corresponding genes. In this paper, several techniques based on PCR used in diagnosis were concluded. The development and research progress of Mismatch PCR were discussed in details. Some information about an assay that we developed for detection of antimicrobial resistance to quinolones was also described.

**Key words:** inherited diseases; drug resistance; gene mutation; mismatch PCR

许多人类遗传性疾病通常源于染色体基因的突变,如:镰状细胞贫血症就是人 $\beta$ -球蛋白序列中第六位密码子的 A 到 T 颠换的结果<sup>[1]</sup>;而对诸如叠氮胸苷、ddI、ddC 和吡啶类反转录酶抑制剂等抗艾滋病药物的抗性,也是由多个单碱基对点突变引起<sup>[2,3]</sup>;甚至细菌对一些抗生素的抗性也主要归因于基因突变<sup>[4,5]</sup>。自从上世纪 80 年代 PCR 技术诞生以来,伴随着分子生物学各领域的飞速发展,PCR 及其衍生技术以其快速准确在基因突变的检测中得到了广泛的应用。针对各种以 PCR 为核心的诊断技术都有各自不同的特点和适应范围,本文对它们作一简单综述。

### 1 基于 PCR 技术的常用基因突变检测方法

#### 1.1 PCR 直接分析法(direct analysis, DA)

通过软件对 PCR 引物进行优化设计,应用 PCR 可直接对基因组中缺失(或插入)突变进行检测,由琼脂糖凝胶上显示的片段大小或有无即可做出判断。 $\alpha$ -地中海贫血症是最

早应用此法检测的基因突变遗传病。目前,它的应用已扩展到诸如 Barts 胎儿水肿综合征、肌营养不良症(DMD)等疾病的快速诊断中。不能应用于基因改变较小的疾病检测是 PCR 直接分析法的不足之处。

#### 1.2 单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, SSCP)

##### 1.2.1 原理及应用

PCR-SSCP 最早由 Orita 等<sup>[6]</sup>报道,之后 Jacquemier 等<sup>[7]</sup>将其用于癌细胞中的体细胞突变的检测。单链 DNA 构象的变化将引起其在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中的迁移率的改变,而单链 DNA 的构象与一级序列密切相关。因此, DNA 一级序列的轻微改变都能在 PAGE 电泳中表现出来,这正是 SSCP 法检测基因突变的原理。通常,将待检测 DNA 片段通过 PCR 扩增及产物变性后进行 SSCP 分析,引入适当的对照对电泳结果进行比较就可以确定发生突变的样本。

收稿日期:2002-03-29;修回日期:2002-08-20

基金项目:上海市科委发展基金资助项目(00JC14007)

作者简介:颜志强(1978-),男,江西人,博士研究生,专业方向:生物化学与分子生物学。E-mail:zhiqiangyan7@hotmail.com

通讯作者:龚毅(1963-),男,研究员,博士生导师,研究方向:分子生物学及基因工程。Tel:021-64369607, E-mail:yigong@srcb.ac.cn

### 1.2.2 应用范围和改进

PCR-SSCP 的主要优点是相对简单,可用于分析各种类型的基因突变。如:缺失、插入和点突变。该技术的不足之处是可能漏检一些突变,因为不同的 DNA 一级序列组成、PAGE 电泳条件及 PCR 产物大小对检测灵敏度都有一定影响。DNA 片段中 A、G 含量丰富的链比 C、T 含量丰富的链对碱基的改变更敏感<sup>[8]</sup>,改变凝胶浓度有时也可以提高检测单个碱基改变的灵敏度。随着 PCR 产物片段长度的增加,突变对它们在电泳中迁移率改变的影响逐渐减小。因此,根据经验 SSCP 方法仅适合于 300bp 以内的 PCR 产物,对于大片段 DNA 突变的检出率较低。值得一提的是,碱基变化对 RNA 迁移率的改变比对 DNA 的影响要大的多;通过在扩增引物的 5'端加上 RNA 聚合酶的启动子,由扩增的 DNA 制备 RNA 用于 SSCP 分析可大大改善检测灵敏度<sup>[9]</sup>。

### 1.3 异源双链分析 (heteroduplex analysis, HA)

与 SSCP 方法相似,该法利用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 做为 PCR 扩增后的分析手段。所谓异源双链是指 PCR 扩增中由突变和野生型 DNA 形成的杂合双链 DNA 分子。它与同源双链在 PAGE 电泳中呈现不同的电泳速率,因此可以将野生型与突变型双链 DNA 分开,从而达到检测基因突变的目的。同样是由于 PCR 产物片段长度的增加,突变对它们在电泳中迁移率改变的影响逐渐减小的原因,HA 法仅对 300bp 内 DNA 的突变检测效果较好。

### 1.4 限制性片段长度多态性分析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP)

RFLP 的原理是利用限制性核酸内切酶识别并剪切特定 DNA 序列的能力,检测基因片段上限制性核酸内切酶识别位点处是否存在核苷酸突变。限制性核酸内切酶识别位点处核苷酸的改变将导致原酶切位点的消失或产生新的酶切位点,使得酶切后片段大小发生变化,通过琼脂糖电泳即可判断有无突变发生。PCR(或 RT-PCR)反应与 RFLP 的结合,加快和简化了分析的过程,并且得到了广泛的应用。但是,PCR-RFLP 的应用也有一定的局限性。并不是基因片段中任一核苷酸的变化都能引起相应限制性核酸内切酶识别位点的改变,而且相隔很近并同时发生的点突变都导致此种方法无从入手。虽然可以在设计引物时人为在 3'端引入某个酶切位点,但此法的应用仅局限于几种疾病的检测。

### 1.5 化学错配裂解法 (chemical mismatch cleavage, CMC)

同位素标记的野生型和突变型 DNA 分子混合后经过变性复性,形成的异源双链在突变部位会产生凸起。对凸起处错配碱基进行化学修饰经氮杂环己烷 (piperidine) 裂解使 DNA 分子从此处断开,通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及放射自显影即可确定是否有突变发生。用于化学修饰的试剂主要有:羟胺 (hydroxylamine) 修饰错配中的胞嘧啶,四氧化锇 (osmium tetroxide) 修饰错配中的胸腺嘧啶。经过 Ganguly 等<sup>[10]</sup>改进,首先用碳化二亚胺 (carbodiimide) 修饰错配

碱基,再用同位素标记的引物进行 PCR 反应, *Taq* 酶将于被修饰碱基处终止延伸,之后经放射自显影可检测到缩短的 PCR 产物。该法已成功的应用于骨胶原基因突变的检测。

### 1.6 测序法 (direct sequencing, DS)

PCR 产物经克隆后测序或直接对 PCR 产物进行测序是所有检测方法中最灵敏、检测最全面的。但是,测序法所需的仪器和高昂的费用使得它并没有在临床诊断中得到普及。

## 2 错配 PCR 技术 (mismatch PCR)

### 2.1 原理和主要步骤

错配 PCR,又名扩增耐受突变系统 (amplification refractory mutation system, ARMS)、错配扩增突变分析 (mismatch amplification mutation assay, MAMA)、等位基因特异 PCR (allele specific PCR, ASPCR),最早由 Newton 等于 1989 年建立并用于人抗胰岛素基因缺陷的检测<sup>[11]</sup>。它的基本原理是, *Taq* DNA 聚合酶缺少 3'→5'外切酶活性;在一定条件下 PCR 引物 3'末端的错配导致产物的急剧减少,针对不同的已知突变,设计适当的引物可以通过 PCR 方法直接达到区分突变型与野生型基因的目的。错配 PCR 方法最首要的一步是根据已知的突变设计合适的引物,其次就是 PCR 循环条件的优化,最后通过电泳观察即可判读结果。

### 2.2 错配引物的设计和内部参照的选择

将引物的 3'末端设计在恰好可能发生突变的位置,引物可以是与野生型基因片段完全互补 (3'末端与突变型不匹配),也可以是与突变型基因片段完全互补 (3'末端与野生型不匹配)。注意错配的位置必须在引物 3'的极末端,否则将导致不能很好的判断突变是否发生。偶尔,引物 3'末端的错配不足以达到预期的分辨水平,特别是当突变型对野生型的比率较低时更是如此。此时,在 3'末端的倒数第二或第三个碱基处人为地引入错配,可以很明显的提高分辨率<sup>[4,11]</sup>。通常,在错配 PCR 中仅使用一对引物是很容易产生假阴性结果的;将多重 PCR 方法引入,即:在所需扩增的 PCR 产物的外围再设计一对引物,可做为内部的阳性对照,避免的假阴性结果的产生。在改进的方法中<sup>[4]</sup>,我们仅在 PCR 产物外围非突变方向的下游位置设计了另一条引物,这样既达到了引入阳性对照的效果,又节约了费用;还可简化后来的条件优化过程。

### 2.3 错配 PCR 条件的优化

根据我们的经验,为了达到较好的区分突变型与野生型基因的目的,错配 PCR 反应比正常 PCR 反应所需的 *Taq* 酶量和引物浓度要低很多。实验初始可以通过几次不同的实验来确定最适合所设计引物对应的 *Taq* 酶量和引物浓度。如果发现 PCR 产物中出现非特异性条带,可采用热启动方法和提高复性温度来解决。有时,由于引物之间的相互干扰会造成阳性对照产物或用来区分突变与否的产物比例相差悬殊,影响了结果的判断。这时可以适当改变某一条或两条

引物的浓度,直至达到判断结果的要求。此外,为了加快突变的检测,可以通过两步法进行 PCR 循环(前提是引物扩增出较短的 PCR 产物,一般不超过 350bp)。

### 3 错配 PCR 应用举例——喹诺酮类药物耐药大肠杆菌的快速检测<sup>[4]</sup>

随着喹诺酮类抗生素(环丙沙星、诺氟沙星等)在临床上的大量使用,许多病原菌对此类药物都产生了耐药性。大肠杆菌对喹诺酮类药物的抗性主要是由于其染色体上 *gyrA* 基因和 *parC* 基因发生了数处点突变。其中最重要的是 *gyrA* 第 248、259 位和 *parC* 第 238、250 位的点突变。国外曾报道用 PCR-RFLP、PCR-SSCP 检测其中的一至两个位点,效果不是很理想。我们利用错配 PCR 技术,建立了一套快速检测以上 4 种点突变的方案。最近,结合两步 PCR 法,我们使整个检测的时间缩短至 3.5 小时。

#### 3.1 引物设计与优化

根据 *gyrA* 基因 248 位 C→T 的置换,设计突变检测引物 MAMA<sub>gyrA83</sub> 与野生型基因序列互补;同时为了更好的分辨效果,在引物 3' 末端倒数第三位人为引入 C→G 的变化,使得引物 3' 末端与突变型基因的错配扩大到两个位点(引物与野生型基因的错配仅发生在人为变化的碱基处,对结果判断无影响)。针对其他突变位点我们也采用了类似的设计方案。

#### 3.2 结果的判断

通过对反应体系和循环参数的优化(主要是降低总体引物浓度、改变各引物浓度的比例和提高复性温度),在 PCR 产物的电泳凝胶上我们直接得到了很好的结果。以检测 *gyrA* 基因 C248T 突变为例:以带突变型菌株为模板的 PCR 产物在凝胶上只呈现一条 540bp 的阳性参照条带;而以野生型菌株为模板的 PCR 产物则显示出两条带,其中 259bp 条带为野生型特有,540bp 条带为阳性参照(见图 1)。

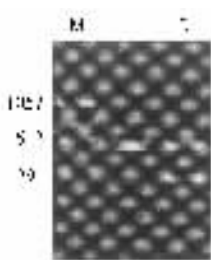


图 1 错配 PCR 检测 *gyrA* 基因 C248T 突变琼脂糖凝胶电泳

M:  $\phi$ X174 (*HincII* 限制性核酸内切酶切) 标准分子质量;  
1: 突变型菌株为模板; 2: 野生型菌株为模板。

Fig. 1 Electrophoresis of mismatch PCR products from *gyrA* gene

M:  $\phi$ X174/ (digested by *HincII*) marker;  
1: PCR products with mutated strain as template;  
2: PCR products with wild type strain as template.

### 3.3 展望

新型抗生素的开发速度远不及细菌对已有抗生素产生抗性的速度,快速诊断细菌的不同耐药性对于临床上正确用药及防止和监测耐药细菌大规模流行都至关重要。而遗传性疾病和肿瘤的发生也更加需要简单快速的方法进行早期诊断。我们期望错配 PCR 以其简单可靠、适用性广、花费低廉等优点,必然会在未来基因突变检测领域中发挥更大作用。

### 参考文献 (References):

- [1] Marotta C A, Wilson J T, Forget B J, *et al.* Human  $\beta$  globin messenger RNA [J]. *J Biol Chem*, 1977, 252: 5040~5053.
- [2] Larder B A, Kellan P, Kemp S D. Zidovudine resistance predicted by direct detection of mutations in DNA from HIV-infected lymphocytes [J]. *AIDS*, 1991, 5: 137~144.
- [3] Nunberg J H, Schleif W A, Boots E J, *et al.* Viral resistance to human immunodeficiency virus type 1-specific pyridinone reverse transcriptase inhibitors [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266: 4887~4892.
- [4] Yan Z Q, Tong Q, Wang F, *et al.* Use of a rapid mismatch PCR method to detect *gyrA* and *parC* mutations in ciprofloxacin-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49: 549~552.
- [5] Williams D, Waguespack C, Eisenach K, *et al.* Characterization of rifampin resistance in pathogenic mycobacteria [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38: 2380~2386.
- [6] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, *et al.* Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction [J]. *Genomics*, 1989, 5: 874~879.
- [7] Jacquemier J, Molès J, Penault-Llorca F, *et al.* p53 immunohistochemical analysis in breast cancer with four monoclonal antibodies: Comparison of staining and PCR-SSCP results [J]. *Br J Cancer*, 1994, 69: 846~852.
- [8] Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations [J]. *Hum Mutat*, 1993, 2: 404~414.
- [9] Sarkar G, Yoon H S, Sommer S S. Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): Comparison with DNA-SSCP [J]. *Nucleic Acids Res*, 1992, 20: 871~878.
- [10] Ganguly A, Prokop D J. Detection of single-base mutations by reaction of DNA heteroduplexes with a water-soluble carbodiimide followed by primer extension: application to products from the polymerase chain reaction [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 3933~3939.
- [11] Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, *et al.* Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS) [J]. *Nucleic Acids Res*, 1989, 17: 2503~2516.