

# PCR 在突变基因检测时的应用

分子生物学在医学领域中的应用越来越广泛，基因突变在肿瘤和遗传病的发生过程中的作用也日益受到重视，因此检测与遗传病及恶性肿瘤发生有关的突变基因(mutant gene)也成为了分子生物学，医学遗传学以及肿瘤学研究中的热点。

基因突变((gene mutation)是癌基因激活，抗癌基因失活以及遗传病发生的原因，从广义上讲，基因突变包括点突变，染色体突变和基因组突变等三种形式，后两种基因突变涉及的基因较多，可以通过光学显微镜分析细胞有丝分裂中期的染色体来检出.也可以在细胞的有丝分裂间期用标记探针检出，而点突变涉及的范围较少，是肿瘤和遗传病发生的主要分子机制，是基因分析的主要研究内容.一般来说，基因突变的检测方法包括：应用基因探针直接检测；应用 PCR 技术检测；利用探针技术进行分析。

利用核酸探针及 Southern 印迹杂交技术进行基因突变分析时由于诸多限制难以满足这际工作的需要，自从 PCR 技术问世以来，建立于 PCR 技术基础上的突变基因检测技术发展迅速，它不仅能在短时间内检出发生突变的基因，而且即使获得极微量的组织亦可经 PCR 扩增而进行中种检测，加上 PCR 技术与探针杂交技术，RFLP 技术及 PCR 直接测序的结合，改换方法得以迅速发展和推广，大大的促进了遗传病及肿瘤有关的基因的研究进展。

## 一、点突变的 PCR 直接检出

### (一)用 PCR 直接检测缺失：

当基因内缺失时，可用已知的该基因 DNA 序列在缺失片段的两侧设计一对引物， 然后进行 PCR，对其产物行琼糖凝胶电泳，溴乙锭染色，紫外检测仪下检测有无特异性的扩增产物，即可非常容易的判断待检称本中是否有 DNA 片段的缺失。

1. 一对引物 PCR 检测缺失如果一个基因的 DNA 序列已经清楚，其缺失部位亦较为固定，即可根据缺失发生区域的 DNA 序列在缺失片段的两侧合成一对合适的引物进行 PCR，然后琼脂糖凝胶电泳及溴乙锭染色，短波紫外灯下观察有无特异性的扩增片段，该方法是检测基因片段缺失最为快速的方法，在实际应用中，为了避光因某些原因引起的扩增失败而导致假阴性结果的出现，常在反应体系中加入一对与缺失片段无关的基因引物，同时加以扩增，以确定无特异性扩增带并非因反应体系的原因引起.如在应用 PCR 技术进行 X 地贫 Bart  $\alpha$  基因胎儿水肿综合征基因缺失检测时，常用一对引物扩增缺失区域，同时同一对  $\beta$  基因引物扩增  $\beta$  基因的一个

片段，然后电泳检测。若同时 即有  $\alpha$  和  $\beta$  基因的特异性扩增产物，则说明  $\alpha$  基因的扩增产物则说明模板 DNA 中有  $\alpha$  基因的缺失，为 Bart 胎儿水肿综合征。

2. 多对引物的多重 PCR 检测缺失：对于某些遗传病的致病基因来说，其缺失具有明显的异质性，即在不同患者其缺失片段有所不同，因而难以用一对缺失部位的引物将所有的缺失检出，在这种情况下，我们可设计多对引物检测该基因的不同外显子区域，即用同一 PCR 体系扩增多个外显子然后用琼糖凝胶电泳检测有无缺失的片段，若某一特异性的扩增产物带缺如，则可判定为该片段的缺失，该检测方法是对已知结构基因有无缺失片段的最快速可行的检测途径，目前已用于多种遗传病基因缺失的检测。如在 DMD/BMD 缺失型突变的检测中，用 23 对引物分为三组进行多重 PCR 可改 98% 的缺失得以检出，另外还有人用 9 对物进行两组多重 PCR，大约可检出 DMD/BMD 92% 的缺失型突变。

3. 用 PCR 技术进行杂合性丢失的检测：有报道，PCR 技术尚可用于检测杂合性丢失可采用 PCR-SSCP 及 PCR 定量技术进行检测。

## (二) 单个碱基置换的 PCR 直接检出

### 1. 直接检测限制性内切酶切点的变化-PCR 产物酶解分析

PCR 产物的酶解分析，主要用于检测可引起酶切位点改变--包括所增加的酶切位点及原有的酶切点消失的单碱基置换性点突变。当某一点突变引起 DNA 片段中酶切位点发生改变时，则可用酶切位点两侧的引物扩增一含该切点的 DNA 片段，然后用相应的内切酶进行处理，电泳检测，与正常的无改变的段进行对片分析即可确定有无酶切位点的改变。比如状细胞贫血的发生即是由一酶切位点的改变所致，正常情况下靶 DNA 的扩增产物为 294bp，经 *OxaNI* 消化后产生 191bp 和 103bp 二个片段，但镰状细胞贫血的突变使该切点消失，*OxaNI* 消化后仍为 294bp 的片段，而杂合子则是有 294、191 和 103 三个片段。用引方法检测突变快速可简便，但必须在突变点涉及到限制性内切酶切关并引起进次复时不能因此方法检测，因此其应用受到限制，反能检出点突变的极少一部分。

### 2. 3' 特异 PCR，扩增阻滞突变系统及等位特异 PCR。

以上三种方法结构是基于以下机理，只是不同作者的采用的名河差别而异。

在 PCR 扩增时，引物的延伸是从其 3' 末端开始的，而这种延伸的进行要求引物 3' 端的碱基与模板需完全配对，只有这样引物才能延伸，扩增才得以进行下去而得到预期的扩增产物，若

引物 3' 端与模板不能配对，则引物的延伸即阻断，不能得到相对应的 扩增产物，基于以上事实，可利用 3' 端含突变碱基的引物来检测靶 DNA 中是否有相应的 突变位点，此即 3' 特异 PCR，扩增阻滞突变系统及等位特异 PCR。该反应系统包含两个 PCR 扩增反应，有两对引物但它们的 3' 端有差异，一为正常引物，另一为 3' 端编食突变的引物，正常引物只与正常模板互解，PCR 时扩增相应的产物，而食突变的引物只与突变的模板附扩增出相应的产物。扩增完成后可直接同琼脂糖电泳技术检测分析结果。利用该系统进行基因突变检测时不仅能检出突变的纯合子，而且能检出杂合子个体，在这种情况下，同一个体的 DNA 模板利用突变引物和正常引物均能引发扩增反应。尚可利用多对突变引物和正常引物进行多重 3' -特异 PCR，可攻 DNA 分子上的多位点变化的鉴定准确快速，简便。

### 3. PCR 直接测序

DNA 序列分析是检测基因突变最直接最可信的方法，它不仅可确定突变的部位，而且还可确定突变的性质。PCR 直接测序是指对 PCR 产物进行的直接序列分析，而不是家传的测序技术先将 DNA 待测片段克隆于测序载体上，这不仅大大的简化了操用步骤，节省大量的人力和物力，而且可实现自动化操用，加之新的荧光检测技术的应用，使测序的效率大大提高。

采用 PCR 循环直接测序时，应首先将扩增产物转化为单链测序模板，目前常用的转化方法为不对称 PCR，即在反应体系中引物浓度的差异来形成单链 DNA，通常侧引物的浓度为 100 : 1。当某一引物被耗尽后，另一引物扩增的片段即为单链然后即可用于测序，此外，获得单链 DNA 还有磁珠俘获法，外切酶消化法及 Genomic amplification with transcript sequeucing 法(简称 GAWTS 法)。PCR 直接测序的最新发展是将双脱氧 络子技术与 PCR 技术相结合进行循环测序，在 PCR 反应体系中同时将 ddNTP 加入，并利用同位素或荧光素标记的引物引导扩增后，得模板的扩增与测序同时进行，其特异在于使用的模板量小且不需分离单链。

应用 PCR 测序有以下优点：

- (1) 附模板的要求，模板需要量小。
- (2) 方法简便，操作易于标准化，自动化。
- (3) 测序效率高，准确，在短时间即可完成。

### 4. PCR-寡核苷酸探针斑点杂交 (PCR-ASb)

如果一个基因的突变部位，性质经测序分析已经阐明，即可用该方法直接检测突变。该方法的原理即利用人工合成的寡核苷酸片段(一般为 19n+)作为探针，与经 PCR 扩增获得的靶 DNA 进行杂交，在严格控制杂交条件的前提下，通过斑点杂交式其它类型的杂交来检测 PCR 产物中是否有丰应突变，即探针与靶 DNA 片段之间只要有一个碱基不相互配对或错记，就能检出。

(1) 探针，探针一般合成两个，一个为正常序列，另一含有突变位点，前者与正常靶 DNA 完全互解，后者只与突变 DNA 互补，一般长度为 19bp。该探针称之为等位特异寡核苷酸探针(allele specific oligo nucleotide probe, ASO 探针)。

(2) 杂交类型，PCR 技术的出现，从根本上解决了靶 DNA 的来源问题，使人们能在很短的时间内获足量量的靶 DNA，传统的 PCR-ASO 技术主要是将 PCR 产物固定于杂交膜上，然后用不同的标记探针检测，亦有将已标记好的探针预先固定于杂交膜上，再使之与 PCR 产物结合，检测有无完全互补的 DNA 产物。

(3) 探针的标记，最先应用的标记物为放射性物质有  $^{32}\text{P}$ ， $^{34}\text{S}$ ，但由于其来源，半衰期及放射性危害不能普遍应用。PCR 技术的引进使可在短时间内获得足量量的靶 DNA 片段，因而对探针的要求亦有的降低，因非同位素标记的探针亦可获非常满意的结果，它不仅使 ASO 探针使用起来受加快是简便，而且无同位素半衰期的限制，操作亦受安全，适合于临床应用。目前已用 PKU， $\beta$  地贫杂的基因突变检测。

## 二、用 PCR 技术快速筛查突变基因

前边所述及的方法均可直接检出突变部位，而其前提则是突变的性质和部位必须清楚，但在许多情况下，基因突变的位点不固定，而且性质亦不是非常清楚，因此就需要用一些快速简便的筛查方法以确定检材中是否有基因突变，近年来，以 PCR 技术为基础建立起来的突变快速筛查技术已普遍应用于肿瘤及遗传病基因突变的检测。

### (一) PCR-单链构象多态性(PCR-single-strand conformation polymorphism, SSCP)

PCR-SSCP 是近年来发展起来的一种分析突变基因的方法，由于该方法对检测基因的单个碱量置换和某一片段 DNA 突变位点的筛查提供了有效而快速的手段，现已广泛应用于遗传及恶性肿瘤基因突变的分析。

#### 1. PCR-SSCP 的原理

PCR-SSCP 于 1989 年首先报道，该方法的原理是基于序列不同的 DNA 单链片段，其空间构象亦有所不同，当其在非变性聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳时，其泳的位置亦发生变化而表现出不同序列单链其电泳迁移率的差异，从而据引判断有无突变存在。对于一段 DNA 来说，其单链具有特定的空间构象，这种空间构象的形成与该段 DNA 的碱基序列有关，当这段 DNA 发生突变，碱基序列亦发生相应的变化，空间相象亦随之改变，研究发现，不同空间构象的 DNA 单链在中性聚丙烯酰胺凝胶电泳时的迁移率有所不同，这样对于同一段单链 DNA 来说，这种空间构象的变化及电泳迁移的改变即能说明其有突变的发生因此，可用经 PCR 扩增的 DNA 片段经变性成单链然后在中性胶中电泳，即可检出有无突变。

2. PCR-SSCP 是检测基因中点突变的一种快速而简便的方法，可用于多个标本的筛查，应用时应注意以下问题。

(1) 敏感性 CR-SSCP 对小于 300bp 的 DNA 片段敏感性达 90-99%，一般认为随着 DNA 片段的增大，其敏感性亦相应的降低，多数报道认为的检测的扩增片段以 100-200nt 最为敏感，但近来的报道发现，175-345nt 范围内进行 PCR-SSCP 灵敏度无明显变化，亦有人用多重 SSCP(multiple SSCP) 500nt 的单链 DNA 点突变亦可检出。

(2) 胶的浓度与厚度，一般浓度为 5-6%，需要强调的是丙烯酰胺与双酰胺间的比例一般为 40:1 或 70:1。胶的厚度应小于 1mm。

(3) 甘油浓度: 在室温条件下，在凝胶中加入少量甘油(5%-10%)可获满意效果，在突变应用时应根据实验来确定，在其它条件都固定时，对比 1%、5%、10%的甘油浓度时的检测效果，以找出最适应甘油浓度。

(4) 电泳的浓度一般通过实验来摸索最佳温度，一般以 10-15℃ 效果较好。

3. PCR-SSCP 结果的显示: 传统的 PCR-SSCP 电泳结果的显示需要借助同位素标记，方法复杂，限帽了其推广。近年来非同位素方法的发展得 SSCP 技术得以广泛应用，避免了同位素法清多不便，适合于临床检测的要求，非同位法有以下几种：

(1) 非同位素标记物掺入法: 可同生物素或地高亲标记的三磷酸化脱氧核苷酸掺入，然后因相应的方法显色，但该方法操作复杂，所需试剂故为昂贵是其缺点。

(2) SSCP 银染法，是一种简便实用的方法经济，快速，可在 1-2 小时完成，尽管其灵敏度故同位素方法低，但可完全满足检测要求，该法开始逐渐取代同位素显方法。

(3) EB 染色法，方法，但安全性差(EB 为致癌剂)，灵敏度低是其缺点。

(4) 其它，尚有荧光法标记 SSCP 高，虽然其高效，灵敏，自动化高，但因期需要特殊设备，难以推广。PCR-SSCP 的出现及应用，使人们对突变基因的检测和筛查途径大为改观，该方法胶的检测出率碱置换点突变，而且标本适用范围广，多种类型的突变(如短核苷酸片段的插入与缺失，等均可检出，而且还能应 RT-PCR-SSCP 及 mRNA-SSCP 进行分析，加上操作及技术条件易于掌握，还可适用大量标本的筛查，因而有广阔的应用前景，其缺点在于不能确定突变的部位和性质。

(二)，变性梯度胶(DGGE)，恒定变性胶(CGGE)及温度(TGGE)检测基因突变。

DGGE, CGGE 及 TGGE 三种方法是基于相同的原理而设计的突变检测方法，它们均是 根据 DNA 的解链特性而设计。对于同一定序列组成或的 DNA 片段来说，它具有恒定的解链温度( $T_m$ )，但若其序列发生改变时， $T_m$  值亦发生改变，在含有变性因素(变性剂，高温)的凝胶中进行电泳，当其比链解开形成分叉时，电泳迁移的速度就会改变。 $T_m$  值全要取决于 DNA 的碱基组成，序列中出现单碱基替换时， $T_m$  亦发生改变，电泳迁移率亦改变，此即 DGGE, CDGE 及 TGGE 鉴定突变的技术基础。

#### 1. 变性梯度凝胶电泳(denaturing gel gradient electrophoresis, DGGE)

DGGE 是检测基因突变较为精确的方法，它不仅可检测单一片段的单点突变，对多点突变的检测亦较容易，该方法与 PCR 技术相结合，使其能非常快速的对大量标本进行分析。

对于一 DNA 片段来说，其  $T_m$  值与碱基组成或有关，当其碱基组成发生变化时， $T_m$  值亦改变，因此，对于突变的片段来说，若其在一变物质线性梯度增加的凝胶上进行电泳时，随着变性剂浓度的增加，当这种浓度达一定值时突变的 DNA 片段发生解链而形成分叉，其电泳迁移速度变慢。因此突变的 DNA 片段与正常的 DNA 片段电泳的迁移位置有差别，研究证明 DGGE 可检出任何类型的单碱基取代，如果将突变型与正常的 DNA 片段形成异源双链时，其敏感性大大提高。

#### 2. 恒定变性胶电泳(Constant denaturing gel electrophoresis CDGE)

CDGE 是 DGGE 基础上发展起来的基因突变检测技术，亦是利用突变基因与正常基因片段间  $T_m$  值的差异来检测突变的方法，该方法与 DGGE 的区别在于聚丙烯酰胺中的含的变性剂浓度相当于含突变基因片段的  $T_m$  值，而且浓度恒定，而不是线性递增。为了提高 DGGE 和 CDGE 的检测敏感性，通常在一侧引物的 5' 端设计一含 GC 的区域(GC-ClampGC 钳)，避免了 DNA 的完全解链，从而提高了突变的检出率，可达 100%。

### 3. 温度梯度凝胶电泳 (Temperature gradient gel electrophoresis TGGE)

该方法是将 PCR 扩增的产物量一中性聚丙烯酰胺凝胶上，在一温度线性梯度上升 的电场中进行电泳，当 DNA 双链到达其  $T_m$  时，双链解开，形成分叉，而影响电泳迁移率，突变的扩增产物其  $T_m$  值与野生型有明显不同，因而有不同的解链区，从而造成电泳迁移效率的差别，据此可判断检材中 DNA 有无突变。

#### (六) 异源双链

在同一扩增体系中，若同时含有正常模板和突变型模板时，随着 PCR 的循环进行，野生型基因片段和突变型片段均可扩增，并形成了异源双链，由于异源双链中配区的出现，因而其它间构型亦发生改变，这机型上的差别即形成电泳图谱上的差异，这种方法适合于较小 DNA 片段的分析，一般在 300bp 以下，其敏感性与 SSCP 相似，该技术简便，适用于快速的突变检出，已用于多种遗传病基因突变的研究。

除上述的几种以 PCR 为基础的突变检出技术外，还有错配碱基化学裂解法，PCR 产物的 RNA 酶检出法及引物竞争法用于基因突变的检出，尤其是错配碱基化学裂解和 PCR-RNase 裂解对突变的检测仍是 10 前广泛应用的突变检出技术，化学裂解法以敏感性高，检测片段长而应用更为广泛。

总之，以 PCR 技术为基础建立的基因突变检测技术有多种，而且各有其优缺点，但目前较为广泛应用的为 PCR-SSCP, PCR-ASO 及 PCR 循环直接测序，随着新方法的不断出现，将会大大的促进基因突变的研究。



## 上海闪晶分子生物科技有限公司

地址：上海市宜山路 705 号 B 座 18 楼

邮编：200233

联系：市场部

电话：64858053 800-988-1995

E-mail: master@shinegene.org.cn

网址：www.shinegene.org.cn

