

PCR用于病毒学领域的研究现状

曾凡济

(武汉大学病毒学及分子生物学系, 430072)

Advances of Polymerase Chain Reaction Applied in Virology

Zeng Fan-ji

(Department of Virology and Molecular Biology,
Wuhan University, Wuhan 430072)

关键词: 聚合酶链锁反应 病毒检测 核酸序列扩增 Q-beta复制酶反应

Key words: Polymerase chain reaction Viral detection Nucleic acid
sequence Amplification Q-beta replicase reaction

最近3年兴起的一项新技术称为聚合酶链锁反应(Polymerase Chain Reaction, 简称PCR)^[1,2], 又称无细胞分子克隆系统或特异性DNA序列体外引物定向酶促扩增法, 是基因扩增技术的一次重大革新。可将极微量的靶DNA特异地扩增上百万倍, 从而大大提高对DNA分子的分析 and 检测能力, 能检测到单分子DNA或对每10万个细胞中仅含1个靶DNA分子的样品, 因而此方法立即在分子生物学、微生物学、医学及遗传学等各领域广泛应用和迅速发展。目前国内外都相继将PCR用于病毒学检验和研究, 文献逐年增多, 据Medline CD-Rom文献光盘检索: 1987年至1989年分别为75、280和860篇, 1990年已增至1697篇, 美国已出版了PCR专著。由于PCR具有敏感、特异、快速、简便等优点, 已在病毒学领域中显示出巨大的应用价值和广阔的发展前景。

一、PCR的原理和基本程序

PCR扩增DNA的原理是: 先将含有所需扩增分析序列的靶DNA双链经热变性处理解开为两个寡聚核苷酸单链, 然后加入一对根据已知DNA序列由人工合成的与所扩增DNA两端邻近序列互补的寡聚核苷酸片段作为引物, 即左、右端引物。此引物范围须包括所欲扩增的DNA片段, 一般需20~30个碱基对, 过少则难保持与DNA单链结合。引物与互补DNA结合后, 以靶DNA单链为模板, 经反链杂交复性(退火), 用Taq DNA聚合酶和4种三磷酸脱氧核苷(dNTP)按5'到3'方向将引物延伸, 自动合成新的DNA链, 使DNA重新复制成双链, 然后又开始第二次循环扩增。引物在反应中不仅起引导作用,

而且起着特异地限制扩增DNA片段范围大小的作用。新合成的DNA链含有引物的互补序列，并可作为下一轮聚合反应的模板。如此重复上述模板DNA加热变性——模板DNA-引物的复性——在DNA聚合酶作用下的引物延伸的循环过程，使每次循环后延伸的模板又增加一倍，亦即扩增DNA产物一倍。经反复循环，使靶DNA得到大量扩增。扩增数量(Y)，每PCR循环扩增效率(E)与循环次数(n)之间的关系如下式：

$$Y = (1 + E)^n$$

设PCR扩增效率E为100%，循环25次，靶DNA将扩增到33554432个拷贝，即扩增3355万多倍，若E为80%，n=25，扩增数量则降至2408865个拷贝，即扩增产物约丢失93%。若E=100%，n=20，则扩增数量减为1048576个拷贝，扩增产物约减少97%。可见PCR

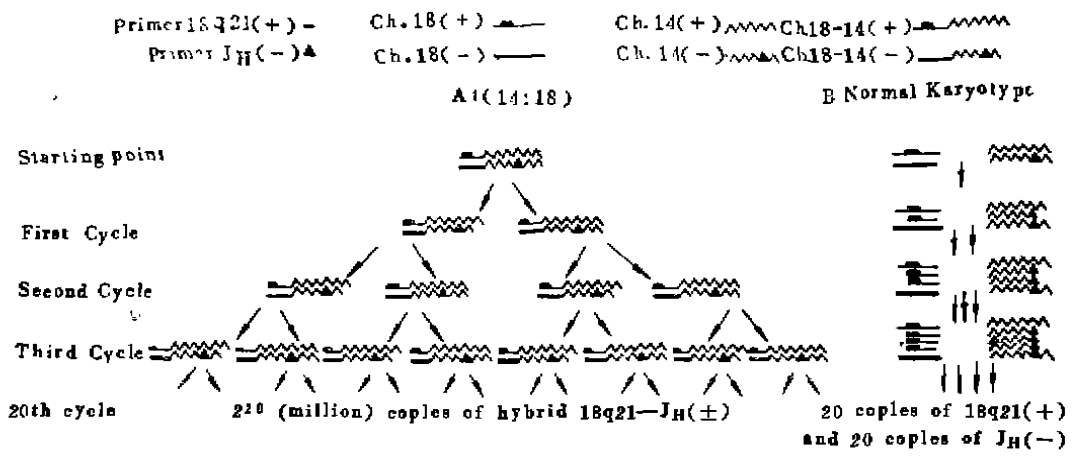


图1 用PCR优扩杂交18q21-J_H DNA序列但对正常DNA序列不扩增的机理图解

A. 由引物18q21(+)和引物J_H(-)合成的杂交18q21-J_H(+)及18q21-J_H(-) DNA序列，引物与新合成的杂交18q21-J_H(±) DNA序列互补，并可反复成为引物的模板。靶DNA按公式： $r = (1 + E)^N$ 成指数扩增。其中r=扩增数量，E=PCR每一次循环扩增效率，N=循环次数。若E=100%，N=20，则最终扩增数量为2²⁰个拷贝。

B. 在正常染色体组型中，新合成的18q21(+)和J_H(-) DNA序列不能作为引物的模板，其最终合成量按公式： $y = 2n \times e$ 计算，只有两个引物各20拷贝。式中y=扩增(延伸)数量，n=循环次数，e=循环扩增效率。

Fig. 1 Schematic illustration of the mechanism by which PCR preferentially amplifies the hybrid 18q21-J_H DNA sequences, but not the normal DNA sequences. (A) In case of the t(14, 18), the hybrid 18q21-J_H(+) and 18q21-J_H(-) DNA sequences were synthesized from primer 18p21(+) and primer J_H(-), respectively. The primers are also complementary to the newly synthesized hybrid 18q21-J_H(±) DNA sequences, which, in turn, become templates for the primers. Therefore, exponential amplification of the hybrid 18q21-J_H(±) DNA sequences are generated, that is, $r = (1 + E)^N$, where r is the extent of yield, E is the mean efficiency per PCR cycle, and N is the number of PCR cycles carried out. If E=100% and N=20, the final yield is 2²⁰ copies of hybrid 18q21-J_H(±) DNA sequences. (B) In case of a normal karyotype, the newly synthesized 18p21(+) and J_H(-) DNA sequences cannot be templates for the primers. Therefore, the final yield is calculated as the following formula, $y = 2n \times e$. Where y is the extent of yield, n is the number of PCR cycles, and e is the mean efficiency per cycle.

循环扩增效率及循环次数都对扩增数量有很大影响。PCR 扩增数量呈指数累积不是无止境的, 当作为聚合酶底物的引物—DNA 模板累积得相当多而现有酶量在额定时间又不足以高效反应来进行全程延伸时, 反应扩增效率即开始下降, PCR 产物则呈线性而非呈指数累积。此外, 当引物的延伸产物不能作为另一个引物的模板时, 则靶 DNA 不能按 2^n 指数合成扩增, 而每一轮次循环引物只能各沿 DNA 的一条链合成一个拷贝, 以滤泡淋巴瘤病人中多见的含 t(14; 18) 异常染色体组型的研究为例 (见图 1), 其合成量则按如下公式^[3]:

$$Y = 2n \times E$$

A. 由引物 18q21(+) 和引物 $J_H(-)$ 合成的杂交 18q21— $J_H(+)$ 及 18q21— $J_H(-)$ DNA 序列, 引物与新合成的杂交 18q21— $J_H(\pm)$ DNA 序列互补, 并可反复成为引物的模板。靶 DNA 按公式: $r = (1 + E)^n$ 成指数扩增。其中 $r =$ 扩增数量, $E =$ PCR 每一次循环扩增效率, $N =$ 循环次数。若 $E = 100\%$, $N = 20$, 则最终扩增数量为 2^{20} 个拷贝。

B. 在正常染色体组型中, 新合成的 18q21(+) 和 $J_H(-)$ DNA 序列不能作为引物的模板, 其最终合成量按公式: $y = 2n \times e$ 计算, 只有两个引物各 20 个拷贝。式中 $y =$ 扩增 (延伸) 数量, $n =$ 循环次数, $e =$ 循环扩增效率。

PCR 方法根据引物不同, 在复性和延伸温度、时间等略有差异外, 其它操作大体相同。以扩增乙肝病毒 DNA 为例^[4], 其基本操作程序为: 1. 在微量离心管中顺次序加入:

双蒸馏水 50 μ l, 经处理病人血清 DNA 样品 10 μ l, 10 倍浓缩 PCR 缓冲液 10 μ l, DMSO 10 μ l, 引物 I S1 50 pM, 引物 II S2 50 pM, dATP、dTTP、dCTP、dGTP 各 1.5 mmol/L, 混匀。

2. 95°C 变性 7 分钟, 加 Taq DNA 聚合酶 2.5 units 和石蜡油 50 μ l。
 3. 72°C 延伸 3 分钟, ←
 4. 94°C 变性 1 分钟
 5. 55°C 复性 (退火) 1.5 分钟 (最后一次循环)
 6. 72°C 延伸 10 分钟。
- 重复 3—5 步骤 25 次循环
7. 扩增产物分析。可直接作电泳、核酸杂交、序列分析或分子克隆等。
- S1 = 5' - TCGTGTTACAGCGGGGTTT - 3', 对应于 HBVS 基因的 nt38—57
S2 = 5' - CGAACCACTGAACAAATGGC - 3', 相当于 nt531—550 互补链

二、PCR 的特点

1. 特异性高: 首次报导的 PCR 所用的 DNA 聚合酶是大肠杆菌的 DNA polymerase I 的 Klenow 大片段, 其酶活性在 90°C 会变性失活, 需每次 PCR 循环都要重新加入 Klenow 大片段; 同时引物是在 37°C 延伸 (聚合), 易产生模板与引物之间的碱基错配, 致特异性较差。1988 年 Saiki 等从温泉水中分离到的水生嗜热杆菌 (*Stearophilus aquaticus*) 中提取出遇热稳定的 Taq DNA 聚合酶, 在热变性处理时不被钝化, 不必在每次循

环扩增中再加入新酶,可在较高温度下连续反应,显著提高PCR产物的特异性,序列分析证明其扩增的DNA序列与原模板DNA一致^[6]。扩增过程中,单核苷酸的错误掺入(Misincorporation)程度很低,其错配率一般只有约万分之一,足可供作特异性分析^[9]。选用各型病毒相对的特异寡核苷酸引物,PCR能一次确定病毒的多重感染。如用HPV11和HPV16型病毒引物检测病妇宫颈刮片细胞,可发现部分病人存在HPV11和HPV16两型的双重感染^[7]。

2. 高度敏感:理论上PCR可按 2^n 倍指数扩增DNA十亿倍以上,实际应用已能将被认为是不可检出的极微量的靶DNA成百万倍以上地扩增到足够检测分析量的DNA^[8]。能从100万个细胞中检出一个靶细胞,或对诸如病人嗽口液等只含一个感染细胞的标本或仅含0.01pg的感染细胞的特异片段样品中均可检测^[9]。

3. 快速及无放射性:一般在4小时内约可成完30次以上的循环扩增,加上用电泳分析、杂交或序列分析等,只需1~3天便可完成。对检品纯度要求低,不用分离提纯病毒;DNA粗制品及总RNA均可作为反应起始物;可直接用临床标本如体液、血液、嗽洗液、脱落毛发、细胞、活体组织等粗制的DNA提取液来扩增检测,省去费时繁杂的提纯程序^[8,10]。扩增产物用一般电泳分析即可,不一定要用同位素,无放射性,易于推广应用。

4. 简便:扩增产物可直接供作序列分析和分子克隆,摆脱繁琐的基因库法;可直接从总RNA或染色体DNA中或部分DNA已降解的样品中分离目的基因,省去常法中须先行克隆后再作序列分析的冗繁程序。已固定和包埋的组织或切片亦可检测。如在PCR引物5'端事先构建一个内切酶位点,扩增的靶DNA可直接克隆到M13mp19等有相应酶切位点的载体中^[10,11]。

5. 可扩增RNA或cDNA,先按通常方法用寡脱氧胸苷引物和逆转录酶将mRNA转变成主链cDNA,再将得到的单链cDNA进行PCR扩增。即使mRNA转录片段只有100ng cDNA中的0.01%,也能经PCR扩增1μg有242碱基对长度的特异片段^[6]。有些外显子分散在一段很长的DNA中,难以将整段DNA大分子扩增和作序列分析,若以mRNA作为模板,则可将外显子集中,用PCR一次便能完成对外显子的扩增并进行序列分析。

三、PCR在病毒学领域的应用

1. 用于病原诊断和病毒基础研究:迄今病毒性疾病的诊断主要依赖免疫学方法、病毒培养和核酸分子杂交等,前两种方法敏感性较差、费时、(感染病毒后要经一段时间才产生抗体,培养及动物接种需时3周以上)、假阴性较多,而用同位素标记核酸探针作分子杂交则有放射性,操作繁杂;如用非同位素标记探针则一般敏感性较差。由于PCR具有高度敏感、特异、快速和简便等优越性,立即在病毒学及各方面迅速推广应用和引起激烈竞争,被认为是病毒检测技术的一次革命,其最大市场是用在病毒性疾病的诊断上。据美国Cetus和杜帮公司称:仅传染病的体外诊断1988年世界市场即达12亿美元^[12]。而Cetus公司1988年将PCR用于AIDS诊断约达4万次,每次费用约145美元,1989年约为1150万次,每次费用降至10美元,可见PCR有巨大的潜在市场。目前国内也都相继用PCR来检测各种病毒(见表1)。

表1 PCR检测病毒应用概况
Tab 1 Applications of PCR in detection of viruses

病毒种类	检验标本	扩增基因位置及长度	参考文献
人类免疫缺陷病毒(HIV-1, 2)	AIDS 及血友病患者血液、精液、HIV感染的细胞培养物、经固定、石蜡包埋的标本及血液制品等	gag, env区, orf B区 88—107bp	13
人嗜T淋巴细胞病毒(HTLV-1, 2)	慢性进行性脊髓病和淋巴瘤白血病患者血液	px(tax)、pol区88—288 bp	14
人嗜B淋巴细胞病毒(HBVLV)	AIDS患者血液, B淋巴瘤	pol, pZVH14区138—188bp	15, 16
乙型肝炎病毒	乙肝患者血液	S, preS及CX区120—620, 38—550 bp	4, 17
腮腺炎病毒	脑脊液、咽分泌物	F区, 111 bp	18
脊髓灰质炎病毒	临床病毒分离株	41, 71, 97, 115bp	19
人巨细胞病毒(HCMV)	AIDS 及肾移植患者等的血液、尿及临床病毒分离株	B区、糖蛋白基因区、MIE及LA抗原基因130—152, 118-435, 400—435, 157—2877bp	9, 20
单纯疱疹病毒	皮肤红斑组织及石蜡包埋皮肤标本	复制酶基因区, 92 bp	21
E-B病毒	肺移植患者肺组织Sjogren综合征腮腺	BamW, M区, 207-262bp	22
人乳头状瘤病毒(HPV-1, 2, 5, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33)	宫颈癌、宫颈非典型增生组织及石蜡包埋组织	E1基因、L1, orf区, 79bp 全长140—150bp(HPV-1, 6420—6539, 5: 6940—7074 11: 6749—6868, 16: 6824—6746等)	23
鼻病毒	患者鼻洗液	5'端非编码区, 179—568bp	24
肠道病毒	患者粪便		25
风疹病毒	感染细胞培养物	E1区、糖蛋白基因, 124bp	26
B19细小病毒	胚胎、胎盘及血清	Pst I片段, 3187—3290	27
非甲非乙型肝炎病毒	患者粪便		28
B-K和J-C病毒	器官移植患者脑组织及尿		29
猿猴免疫缺陷病毒(SIV)	血液		30
蓝舌病病毒	分离病毒株		31
Plebejus核型多角体病毒(NPV)	对虾组织	多角体蛋白基因区	32

PCR是病毒性疾病早期诊断的极有力的工具, 尤其是对难以进行病毒培养和血清学检验的病毒感染的诊断有巨大作用。如用PCR检测AIDS病人外周血单核细胞(PBMCs)的HIV-1基因序列, 在血清抗体阳性而细胞培养阴性的同性恋者中有64%检出HIV-1, 在血清和细胞培养均阳性的同性恋患者中100%检出HIV-1, 而在血清和培养均阴性的对照者中PCR检测亦为阴性。整个检测在3天内完成, 而病毒分离需3~4周^[23]。有报告用PCR检测HIV DNA可比血清检验提前35个月作出诊断。

Larzul 等对PCR程序作了改进, 采用相差16℃的二步法检测乙肝病毒, 选择对HBV基因组特异的16对引物, GC含量为31%~73%, 引物长度为15~31个核苷酸, 使扩增

片段与HBV全基因组一致；同时从病毒颗粒或慢性活动性肝炎病人肝脏提取DNA进行扩增，观察PCR扩增的特异性和效率，结果在HBV基因序列的X区、C区和前S区即MD24/MD26、MD27/MD31及MD19/MD18的3对引物获得满意的扩增效率。用X区特异的引物对，有1个分子的HBV DNA都可检出。这种自动PCR程序在105分钟内可进行40次扩增循环，操作简便，效果与常法PCR相同^[34]。

PCR能迅速查明传染源，在接种疫苗后发生脑膜炎及腮腺炎患者的脑脊液及咽分泌物等分离的16株腮腺炎病毒，经PCR扩增病毒F区基因片段后作序列分析，在111个核苷酸的全区域中，检测出8个可变区；在任意两株病毒之间最多的有6处发生变化，占核苷酸总数的5.4%。在Jeryl Lynn疫苗株和Urabe疫苗株之间、及疫苗株与分离自非疫苗相关性腮腺炎患者的野毒株之间有明显区别。对照比较证实，Urabe疫苗株是那些病例感染的病毒源^[18]。

PCR分析不需要所放大的DNA为完整的大分子，对部分DNA已降解的或已包埋的标本都可检测，极有利于临床诊断。Shibata等对经福马林固定和石蜡包埋的5~10 μ m薄切片，用PCR检测人乳头状瘤病毒HPV-16和HPV-18，全检验过程只需1天，在只含约20个病毒拷贝的标本中都能检出HPV DNA，并与HPV-6和HPV-11无交叉反应^[23]。如同时用多对适合多种病毒的寡核苷酸引物作PCR，能一次测出多重病毒感染。Young等采用对应于HPV-11和HPV-16的寡核苷酸引物检测宫颈刮片细胞的HPV DNA，可同时检出部分患者存在HPV-11和-16型的双重感染^[7]。

Salimans等用3种方法检测B19细小病毒作了敏感性比较^[27]，结果用缺口翻译DNA探针作点杂交能检测出相当于血清中含10⁵个病毒颗粒的2pg的病毒DNA，放射标记RNA探针点杂交可测出相当于10⁴个病毒颗粒的0.3pg病毒DNA，而PCR可检出少至1fg(=10⁻¹⁵g)的病毒DNA，相当于10~50个细小病毒颗粒。

以人巨细胞病毒AD169株的EcoRI D片段末端的130bp和152bp DNA作PCR扩增，在5m mol/L的Mg⁺⁺条件下用Taq聚合酶扩增，152bp DNA片段始终高于130bp片段，只需1个AD169感染细胞或0.01pg的AD169 DNA即可检出。同时用PCR和病毒培养检验37份尿标本，35份结果一致，有2份仅PCR阳性。说明PCR扩增152bp DNA片段能敏感、特异地检测HCMV感染，可用于临床病毒分离鉴定和外周血液等标本检验，省去分离目的基因需反复酶切和构建亚克隆的繁琐程序。

由于PCR可扩增DNA、RNA或cDNA，能简易直接进行分子克隆和序列分析，对病毒感染的致病机理、潜伏性感染、遗传变异等病毒基础研究具有巨大作用。例如在HIV的多重感染患者中，有些人体细胞内有多达7种HIV遗传变异株。迄今通用的方法是用人细胞培养，经传代数次增殖病毒，然后挑选单株病毒扩大培养，才能进行HIV变异性检验，而PCR却可将单株病毒空斑无须经过进一步增殖便迅即扩增足量的特异DNA供作序列分析和遗传变异检验。结果表明，有的病毒基因组是不一样的，从人体分离到的一组病毒，有的可能是病毒混合体。其中一个有意义的发现是HIV也有缺陷型，这些病毒经突变产生一种嵌合在编码氨基酸序列位置上的称为“终止密码子”的短序列，有阻止病毒DNA在细胞内表达的功能。预期此重大发现有可能查明为什么HIV有的株系会比另一株系更具致病力的原因。

为了解脑脊液中HIV-1原病毒和神经系统疾病的关系,Shaunak等用PCR对31例HIV-1阳性病人的脑脊液中有核细胞检测HIV-1原病毒的gag和env序列,并与临床和放射学检验比较。结果21例查到原病毒,其中20人的神经系统有异常。在另外6例设查到原病毒的患者中,全部神经系统正常,跟踪随访8~12个月,有4例的神经系统一直很正常。表明PCR检测病人脑脊液中有核细胞的HIV-1原病毒序列,可早期、快速和直接提供神经系统受损的证据^[55]。

选择从AIDS病人中分离出的嗜B淋巴病毒中高度保守的pol片段的135 bp作引物进行PCR扩增,可鉴定与Mason-Pfizer猴病毒(MPMV)和猿反转录病毒1高度相似的非特征性的反转录病毒^[16]。

在无脊椎动物病毒方面,已报告选用昆虫杆状病毒属的首蓓银纹夜蛾多粒包埋核型多角体病毒(*Autographica californica multiple nuclear polyhedrosis virus*,简称AcMNPV)的多角体蛋白基因序列的高度保守区核苷酸作引物,进行PCR扩增,以检测主要侵害海水养殖对虾的Plebejus杆状病毒(PBV)^[38]。所选AcMNPV多角体蛋白基因片段与其它有关的昆虫杆状病毒相对应的基因序列只有5个以下的核苷酸不同,差异极少。

在病毒基础研究中,PCR可摆脱繁琐的基因库法,通过设计不同的引物可构建一系列点突变、插入突变、缺失突变及重组体等来进行基因表达调控研究、表达产物的结构功能研究等,亦可使PCR引物的5'端含有某些酶切位点、启动子或标记引物,扩增片段即可用于重组、转录或制成探针,供作快速、特异检测和病毒鉴定。国内也已合成了与意义链和反意义链核苷酸157—2877、1846—2877之间互补的两对HCMV DNA引物;从含HCMV B基因的重组质粒pBHI DNA中扩增和分离B基因编码区段(2.7kb)及其产物糖蛋白52kDa抗原决定簇编码区段(1kb),以研究HCMV B基因片段编码产物的功能^[30]。

2. 用于肿瘤的病毒病因研究:对于宫颈癌、肝癌和鼻咽癌等与病毒密切相关的肿瘤,可用PCR检测有关病毒在细胞基因中的整合状态和位点,研究病毒和肿瘤的关系。如取宫颈癌细胞以PCR检测HPV DNA,发现大部份病例的癌细胞中只存在HPV-16a,而不见HPV-16b,表明肿瘤除与某些型别病毒有关外,与病毒的亚型有重要关系。

肿瘤基因突变以点突变最多见,从基因水平上检测较困难,应用PCR分析则易解决。如肿瘤基因c-ki-ras的激活是因第12位氨基酸的密码子GGT突变为TGT,若以人结肠癌细胞DNA为模板,用PCR扩增c-ki-ras的第12位氨基酸密码子上游31bp至其下游76bp处的108bp DNA片段,进行序列分析,或利用等位基因特异性寡核苷酸探针ASO-Gly和ASO-Cys与PCR产物作分子杂交,即可检查基因是否发生点突变^[3]。

PCR亦可用于抗癌基因的作用机理研究。最近研究表明,病毒基因的某些产物可与能抑制肿瘤形成的抗癌基因(Anti-oncogene)—Rb基因产物P53结合,从而干扰抗癌基因的活性,导致细胞转化。如多瘤病毒的LT或MT基因、腺病毒的E1A基因、人乳头状瘤病毒(HPV-6、HPV-16)的E7基因产物都能和Rb基因产物结合,能抑制其抗癌活性,引起细胞转化。因此可用PCR来观察病毒基因对抗癌基因的作用、变化和影响。

3. 用于病毒免疫学研究:PCR是研究病毒核酸、抗原和抗体三者之间的关系、研究病毒与自身免疫性疾病的关系的有力工具。Farzadegan等对4例无症状同性恋患者,

用ELISA及免疫吸印法检测HIV-1抗体阳性后在6~12个月转阴,其后两年半抗体持续阴性,其血清HIV-1 P24及外周血单核细胞HIV-1培养亦均阴性,但用PCR进行HIV-1基因检测,在抗体转阴后6~18个月的患者外周血单核细胞中均检出HIV-1前病毒DNA^[36]。另有报告在1例经ELISA、免疫吸印法和放射免疫沉淀法检查HTLV-1抗体均阴性、用Southern吸印法检查瘤组织DNA的HTLV-1亦为阴性、而被误诊为何杰金氏病的HTLV-1相关淋巴瘤病人,以PCR从其淋巴瘤组织DNA中检出HTLV-1基因。此外,曾报告在Sjogren综合征患者腮腺及外周血淋巴细胞中用PCR检出EB病毒序列,认为EB病毒在其中隐性感染,可能使这些组织成为免疫攻击的对象^[32]。

PCR还可用于检测血液制品及疫苗,亦可利用已知特异抗原蛋白基因片段,经PCR扩增后表达出所需的抗原蛋白(融合蛋白),用于血清学检验,以解决由于抗原成份复杂而致血清学检验结果不规律的问题。

4. 用于抗病毒药物研究:近年抗病毒药物的筛选由过去带有一定盲目性的合成转为针对病毒复制周期的各个分子程序为攻击靶点的设计合成,其焦点是发展能阻断病毒感染或致病环节的新药物。其中抑制病毒基因组复制是重点研究之一。目前已知病毒基因组复制的酶、三磷酸核苷的形成和利用、病毒RNA或DNA模板、基因组延伸等,均是可被抗病毒药物攻击的重要靶点。如人工合成的寡核苷酸可与病毒核酸模板结合或相互作用而阻止病毒基因组的复制;将核苷类似物掺入病毒基因组,使病毒DNA突变或断裂,干扰DNA合成等。因此可利用PCR检测和研究抗病毒药物的作用效果;用PCR分析用药后DNA的突变或扩增用药前、后受试标本的病毒DNA,以观察药物对病毒复制的变化;亦可将病毒RNA反转录成cDNA后再扩增,然后观察药物对病毒转录的影响。

四、影响PCR的有关因素及其处理

1. 相对特异性:PCR产物的特异性主要取决于引物链的特异性。由于存在同源序列,随意设计的引物链,其PCR产物在电泳分析时可能出现多条电泳带。因此在设计引物链要考虑其绝对特异性和相对特异性。前者指两条引物链的核苷酸序列只与靶DNA片段互补;后者是指两条引物链的核苷酸序列及两者之间的DNA长度对靶DNA片段是特异的,但亦可与其它区域的DNA片段互补,而其PCR产物的长度与靶DNA片段的扩增产物的长度明显不同。应根据引物1和引物2之间的DNA片段长度,预计PCR产物的大小,并与电泳分析的DNA片段大小比较,或用寡聚核苷酸限制性内切酶片段分析(Oligomer restriction analysis,又称OR分析),或用分子杂交、核苷酸序列分析来测定。

2. 复性温度与时间:引物与变性DNA的复性(退火)温度对PCR的特异性有影响。复性温度由引物的碱基成份决定,可由下式计算:

$$T_d = 4(G + C) + 2(A + T)$$

其中 T_d 为复性温度。在低温度(如37℃)下复性,可出现比扩增DNA序列长的非特异扩增带;而在55~60℃复性的扩增带一般是特异的。复性时间过长或过短(应≥30秒)都会增加非特异的扩增。

3. Taq DNA聚合酶扩增的特性性受PCR循环次数及延伸时间与温度的影响:循

环次数太多使延伸时间拖长和 Taq DNA 聚合酶单位用量增大, 可能导致非特异 DNA 扩增; 循环次数太少, 则不能得到充足的扩增产物。温度不适宜会影响扩增产物数量, 故延伸温度一般应高于复性温度。

4. 标本中存在某些杂质如细菌蛋白质和 Taq DNA 聚合酶抑制因子; 痕量污染物即足以抑制 Taq 酶活性, 须注意避免污染和去除标本中杂质, 如将标本加热煮沸使抑制因子与 DNA 分离, 并过 Sephadex G-50 柱以除去抑制因子。

5. 细胞和细胞器的崩解、核酸酶的激活等均可使待检的 DNA 降解, 降解的 DNA 是 Taq 酶作用的良好底物, 能与靶 DNA 竞争, 从而扩增大量非特异 DNA, 这种非特异性结合会使背景干扰 (back ground noise) 超过了前景信号 (fore ground signal) 影响 PCR 循环扩增效率, 减少特异性 DNA 扩增产量。

此外, 不适宜的反应条件如二价离子不适合、引物、酶及盐的浓度不当等也能降低 PCR 循环扩增效率。

6. 污染质粒 DNA 或在标本处理操作过程伴随污染阳性物质。由于 PCR 产物能作为底物并可反复成为复制的模板, 扩增的产物可能续传污染 (Carry over), 由一个反应带进另一反应。在操作中因骤开反应管时产生的空气溶胶可能导致 PCR 产物在实验室积聚, 典型的可由 PCR 扩增达百万至十亿倍。为避免续传污染影响结果或出现假阳性, 可考虑用套巢引物对 (nested primer pairs)^[37]。即先用外引物扩增 40 次循环后, 将一部分反应液加到含有同外引物相对应的内引物对的第二反应液中, 然后继续进行扩增反应。这样在实验室中由内引物积聚的物质就不能成为起始外引物对的模板, 所延伸的扩增产物便为内引物对所限定的区域片段。

判断 PCR 阳性结果是否由于质粒 DNA 污染所致, 可选用跨越病毒 DNA 克隆进载体的位点的引物对。如果一引物与病毒序列互补, 另一引物与载体序列互补, 其扩增的唯一底物就是重组质粒。所以若出现 PCR 阳性结果, 表明标本是受质粒 DNA 污染。另一方法是选用抗污染引物对 (anti-contamination primers), 更适用于环状分子的靶 DNA 序列 (如 papovavirus 基因组)。此引物所扩增的是跨越病毒克隆进载体的位点。其区段只存在于完整的病毒粒子 DNA 中, 而重组质粒在克隆位点连接处被分成两区段。因此, 如果重组质粒污染了反应混合物, 也不能扩增, 或即使出现扩增, 其产物也不会是预期的大小。只有病毒粒子 DNA 才能生成正确大小的产物。一般在选择阳性对照时应慎重, 避免使用重组质粒 DNA 作 PCR 的反应指示。

7. 假阴性: Hart 等用 PCR 检测 21 例 HIV 阳性血清, 发现 1 例的 DNA 和 RNA 均阴性。Ou 等也发现 11 例阳性血清标本中有 6 例是 PCR 检测 HIV 阴性^[33]。作者建议使用多对引物对来避免假阴性。结果, 当用 3 对引物时, 有的标本对其中一对或两对引物出现阳性; 对阴性结果可用无病毒存在来解释。对用 PCR 检测 HIV, 亦可选择基因组的保守区序列如 SK38/SK39 及 SK68/SK69 作引物对, 来避免假阴性。

8. 注意实验室工作隔离, 将 PCR 前处理和后反应操作分开, 使待测 DNA 与产物 DNA 分开。最好将: (1) 标本处理、(2) 反应混合物制备和 PCR 酶扩增、(3) 产物分析及 (4) 其它分子生物实验操作如制备重组质粒等分开, 设专用超净工作台。同时加强实验管理, 小心操作, 处理 PCR 标本和试剂应像处理传染因子一样严格; 使用进样器

加样,避免用一般空气驱动的吸管操作,造成气溶胶污染。

五、PCR的应用前景

PCR 不仅用于病毒学领域,并已用于细菌、螺旋体、立克次氏体、衣原体、原虫等方面的临床检验。在医学上用 PCR 扩增病理标本中待测 DNA 片段,分析其酶切片段的长度多态性 (RFLP),或直接进行序列分析、或用等位基因杂交、或与稀有金属离子螯合物寡核苷酸探针结合,可以筛选与某些基因病相关的等位基因,进行移植物的配型,对自身免疫性疾病如对人类组织相容性抗原 (HLA) 作快速基因型多态性分析、DNA 分型和 T 细胞受体的基因分析,进行遗传病、传染病的诊断和鉴定分析肿瘤基因。检验标本范围不断扩大,用单个细胞、精液、粪便、尿液等均已直接扩增。亦可用于检测一些不易获得的微量标本如人体活检组织、或含病原极少的标本如食品、环境及饮水中的微生物。利用一根头发、微量血迹、精斑等微量检品均可作 DNA 体外扩增和分析,以作法医学中个人识别及亲子鉴定等,使法医物证学研究进入了一个新时期。在基因工程应用上更是潜力巨大,如用 PCR 进行基因克隆、确定 cDNA 基因整合状态、筛选高效稳定表达的细胞克隆株及对 cDNA 基因转化的细胞克隆进行鉴定等。

近年来对 PCR 的引物与应用方法不断有新的设计和改进,形成了一系列新技术,如反相 PCR、固相 PCR、应用混合引物的 PCR^[38]、SOE 技术、CCA 技术、GAWTS (Genomic Amplification with Transcript Sequencing)^[39]、DARTT、PATTA (PCR Aided Transcript Titration Assay)^[40]等。其中 Q β 复制酶反应 (Q-beta Replicase Reaction, 简称 QBRR) 被认为是 PCR 的镜像但比 PCR 更优越。此技术主要是利用 Q β 噬菌体感染大肠杆菌 Q13 获得的 Q β 复制酶来扩增特异性 RNA 探针,按指数高效合成 RNA 分子拷贝。其主要程序是先制备 222 个核苷酸长度的重组体 MDV-1 RNA 分子模板,将选自恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*) 的 21 个核苷酸长度的特异性单链 RNA 序列插入,构建一 RNA 探针;继而通过 RNA 杂交试验,将未结合的 MDV-1 RNA 洗脱,然后用具有病毒 RNA 聚合酶作用的 Q β 复制酶扩增此杂交序列。这种重组体 RNA 分子具有既作为特异性探针与靶 DNA 杂交、又可作为 Q β 复制酶模板进行扩增两种功能。在产物链延伸合成后,产物链和模板链又可作为下一次循环合成的模板,反复循环成指数扩增。QBRR 开始反应时只有 0.14fg (1.4×10^{-11} g) 重组体 RNA (1000 个分子),经 30 分钟扩增,可产生 129ng (1.29×10^{-7} g) 重组体 RNA 产物,相当于扩增 10 亿倍^[41],扩增大量 RNA 产物足供不用同位素的非放射性检测如测热法、电泳等分析。省去一系列的热变性循环处理和检查程序。

Taq DNA 酶的使用促进了 PCR 反应自动化的不断改进,国外已有每小时可作 48 个标本扩增 DNA 的 PCR "Phast 系统" 仪器出售,Cetus 公司正在推出 96 孔的能连续 65 小时作 1 万次循环的 PCR 自动热循环控制装置^[42],看来在耐热 DNA 聚合酶的研究及改进非特异扩增以加多 PCR 循环扩增次数的应用研究可能又有新的进展。复旦大学遗传学研究所研制的耐热 DNA 聚合酶已小试成功,发酵单位达到 1000 单位/立升,纯化后比活性大于 4000 单位/ml,已获美国及西德两公司认可^[43],国内的 PCR 技术必将在各方面得到迅速推广。

参 考 文 献

- (1) Saiki, R.K. et al., 1985, *Science*, 230: 1350—1354.
- (2) Mullis, K.B. et al., 1987, *Methods Enzymol.* 155: 335—350.
- (3) Lee, M.S. et al., 1987, *Science*, 237: 175—178.
- (4) Yotsumoto, S. et al., 1990, *J. Virol. Methods*, 28: 107.
- (5) Saiki, R.K. et al., 1988, *Science*, 239: 487—491.
- (6) Erlich, H.A. et al., 1988, *Nature*, 331: 461—462.
- (7) Young, L.S. et al., 1989, *B.M.T.* 298: 14—18.
- (8) Higuchi, R. et al., 1988, *Nature*, 332: 543.
- (9) Hais, K. et al., 1989, *J. Clin. Microbiol.* 27: 1802.
- (10) Almoguera, C. et al., 1988, *Cell*, 53: 549—554.
- (11) Hirano, A. et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 3951—3954.
- (12) Perkin-Elmer Cetus., 1989, *Biotech. News*, 9: 3.
- (13) Clewley, J.P., 1989, *J. Virol. Methods*, 25: 179—188.
- (14) Kwok, S. et al., 1988, *J. Infect. Dis.* 159: 1193—1197.
- (15) Buehler, A. et al., 1988, *J. Virol. Methods*, 21: 191—197.
- (16) Donchower, L.A., et al. 1990, *ibid.* 28: 33.
- (17) Zignago, A.L. et al., 1990, *Molecular and Cellular Probes*, 4: 43.
- (18) Foraty, T. et al., 1990, *J. Gen. Virol.* 71: 987.
- (19) 马静雅等1990, 首届全国医学分子微生物学进展学术讨论会专题和论文摘要汇编, 第83页。
- (20) 吴均等1990, 同上, 第11页。
- (21) Cao, M. et al., 1989, *J. Invest. Dermatol.* 92: 391—392.
- (22) Saito, I. et al., 1989, *J. Exp. Med.* 169: 2191—2198.
- (23) Saijders, P.J.F. et al., 1990, *J. Gen. Virol.* 71: 173—181.
- (24) Cama, R.E. et al., 1988, *J. Med. Virol.* 28: 73—77.
- (25) Buntany, J.W. et al., 1990, *Circulation*, 82: 8.
- (26) William, F. et al., 1989, *J. Virol. Methods*, 26: 21—30.
- (27) Salimana, M.M. et al., 1989, *ibid.* 23: 19—28.
- (28) Burckhardt, J. et al., 1988, *Infect. Immun.* 16: 97—99.
- (29) Arthur, R.R. et al., 1989, *J. Chin. Microbiol.* 21: 1174—1179.
- (30) Aimond, N. et al., 1990, *J. Virol. Methods*, 28: 305.
- (31) Dangler, C.A. et al., 1990, *ibid.* 28: 273.
- (32) Vickers, J.E. et al., 1990, 5th, ICIP, The 23rd Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology, Proceed. and Abstract, P.407.
- (33) Ou, C.Y. et al., 1988, *Science*, 239: 295—297.
- (34) Larrick, D. et al., 1988, *J. Virol. Methods*, 20: 227—237.
- (35) Shaanak, S. et al., 1990, *The J. of Infect. Dis.* 161: 1069.
- (36) Farradegan, H. et al., 1988, *Ann. Intern. Med.* 108: 785—790.
- (37) Smit, V.T.H.B.M. et al., 1988, *Nucleic Acids Res.* 16: 7773.
- (38) Larrick, J.W., 1989, *Bio./Technol.* 7: 934—938.
- (39) Stofflet, E.S. et al., 1988, *Science*, 239: 491—494.
- (40) Becker-Andre, M. et al., 1989, *Nucleic Acids Res.* 17: 9437.
- (41) Lizardi, P.M. et al., 1988, *Bio./Technol.* 6: 1197.
- (42) Perkin-Elmer Cetus., 1990, *Biotech.* 8: 762.
- (43) 叶正祥, 1990, 生物工程信息快报, (7)1.