

DNA 指纹技术新进展

高欢欢 杨 军* 郭光沁 郑国铝

(兰州大学细胞生物学研究所 兰州 730000) (*重庆大学生物工程学院 重庆 400044)

DNA 指纹技术从原理上可以分为两大类:即传统的以 Southern 杂交为基础的 RFLP 技术和以聚合酶链式反应(PCR)为基础的一系列分子标记技术。RFLP 需要样品 DNA 的量较大,对微量被测样品无能为力。至于与 PCR 相结合的 RAPD、AP-PCR 和 DAF 等技术则由于引物相对较短,对实验条件非常敏感,每一轮实验都需要筛选最合适的反应体系,增加了实验周期和复杂度。近几年新出现的 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)、LP-RAPD(Long Primer RAPD)和 DALP(Direct Amplification of Length Polymorphism)技术弥补了上述不足。其中 AFLP 技术有针对性地在扩增模板两端连接一段序列,使得 PCR 引物和模板最稳定地结合,增强了多态性的检出率;LP-RAPD 和 DALP 所使用的引物为长序列的通用测序引物,这样不仅增加了实验的可重复性和可靠性,而且所得产物可以直接进一步的序列分析。此外,DNA 指纹技术的应用领域也有着快速的发展,本文将就其在单细胞指纹方面加以论述。

一、扩增片段长度多态性(AFLP)技术

Zabeau 和 Vos 于 1993 年建立的 AFLP 技术^[1]结合了 RFLP 和 RAPD 的优点,其操作可分三步:基因组 DNA 的酶切和寡核苷酸接头的连接、限制性片段的的选择性扩增以及扩增片段的凝胶电泳分析。对基因组 DNA 酶切时,可根据需要组合不同的低频剪切酶(如 EcoRI 识别位点 6 个碱基)和高频剪切酶(如 Mse I 或 Taq I,识别位点 4 个碱基),以达到控制酶

切片段的目的;本方法的另一独创之处是在酶切片段的两端附加了人工合成的寡核苷酸接头(双链),它包括两个部分:核心序列和限制性内切酶特异性序列,后者与基因组 DNA 的酶切片段端序列互补,在连接酶的作用下可以使接头和酶切片段连接。由于酶切时使用了两种酶,因而接头也就相应为两种(如 EcoR I-接头和 Mse I-接头)。PCR 引物对应于上述两种接头序列(相应地称之为 EcoR I-引物和 Mse I-引物),均含 20 个左右寡核苷酸,从 5'端到 3'端依次为:核心序列-酶特异性序列(接头序列)-延长序列,其中延长序列由 1-3 个选择性碱基组成,可根据实验要求变换碱基的种类和数量。反应中只将其中一个引物进行标记,便于变性凝胶电泳后的谱带分析。

与 RAPD 相比,AFLP 技术由于使用了长的扩增引物,结果更加稳定可靠,重复性好;不同剪切酶的组合以及引物中选择性碱基种类和数目的改变,可以更加灵活地调控扩增片段的数量^[2];由于引物具有针对性(和接头序列完全互补),减少了错配的机遇,因而对基因组 DNA 的多态性检出率强,更真实地反映了不同基因组间可能存在的差异。因此,近几年应用这一技术的研究报道明显增加。Simons 等^[3]将 AFLP 技术用于大麦抗白粉病 Mlo 基因的定位,他们从 250,000 个位点中筛选该基因,最后将 Mlo 位点限定在 30kb 大小的 DNA 片段中。1997 年 Qi 和 Lindhout^[4]用大麦为材料调查了 AFLP 标记的应用水平,证明 AFLP 技术中引物对的使用与种系的关系不大,最有效的引物对可被用来对任何一类大麦进行 AFLP 分析。1998 年,Alonso-Blanco 等^[5]将 395 个

AFLP 标记推广到原有的拟南芥菜 RFLP 图谱上,进行了不同品系的多态性比较,并且建立了拟南芥菜 AFLP 标记连锁图。目前 AFLP 的应用研究十分活跃,尤其是在对原有遗传图谱的补充分析中,更是发挥着其它指纹方法不可替代的作用。但是, AFLP 技术较 RFLP 及 RAPD 操作步骤繁琐,接头、引物需要人工合成,并且,由于基因组 DNA 的不完全剪切或不恰当连接,可能同时产生多态性假象^[6]。

二、长引物 RAPD(LP-RAPD)和直接扩增长度多态性(DALP)技术

Gillings 等人^[7]发展的 LP-RAPD 技术采用成对长引物(18-24nt)对基因组进行扩增,使引物与模板退火时产生的复合物更加稳定,增加了实验的可重复性。他们在实验中使用了不同的引物对,如 ERIC2 和 ERIC1R、pehA3h 和 pehA # 6、pUC/M13F 和 pUC/M13R、BCF 和 BCR 等,都产生了清晰的指纹谱带。其中 pUC/M13F 和 pUC/M13R 为通用测序引物,这样从琼脂糖凝胶上提取纯化的 DNA 片段就可直接用相应引物进行多态性位点的分子克隆和序列分析。ERIC(Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus)序列属于短散布重复元件(short interspersed repetitive elements)家族,广泛存在于革兰氏阴性肠杆菌中。Gillings^[7]用 ERIC-PCR(ERIC2/ERIC1R 引物)扩增不同真核生物基因组 DNA,产生复杂的 DNA 指纹(5-30 条可分辨的谱带),表明 LP-RAPD 与 RAPD 具有同样的机制,即引物与作为模板的基因组 DNA 间的复性是低严谨的,存在碱基错配,这一点被随后的产物序列分析所证实。

Desmarais 等发展了另一个长度多态性序列分析的 DNA 指纹技术 DALP^[6],它使用稍加改良的通用 M13 测序引物:一种为“选择性”引物(5'端为核心序列 M13-40USP,3'末端碱基可以替换),另一种为固定不变的 M13 反向引物(DALPR),长度均为 18-24nt。他们在反应

中将一份 DNA 样品平行扩增两次,每个扩增反应前标记不同的引物,产物分别在两块变性凝胶上电泳,从放射自显影图中比较选出带有不同末端标记的产物;再将此条带提取后进行二次扩增,也就是产物的纯化。结果表明,带有两种不同标记的一次扩增产物均能被很好地纯化,可直接用于序列分析。反应中升高退火温度和改变 DNA 模板浓度对结果只有轻微影响,但当选择性引物 3'端只有一个碱基的差异时,反应结果却有较大不同。此外,他们还证明当反向引物与选择性引物间的浓度比为 5:1 时,不同末端的产物占有率最大,这可能是由于反向引物较选择性引物更长,从而与模板 DNA 间的亲和力更弱所致。在随后的序列分析中发现 G-T 和 G-A 错配对引物-模板复合物的稳定性只产生很轻微的影响,从而认为在 G-T、G-A 碱基间有可能形成了氢键,稳定了引物与模板的结合^[6]。

LP-RAPD 和 DALP 技术从实验设计上看仍属于随机引物扩增的范畴,其最大的优点是采用了测序引物来作为 PCR 扩增的引物,极大地简化了进一步的序列分析工作,有助于对基因组的多态性做更深入细致的分子生物学分析,在未来必将展示出广阔的发展和前景。

三、单细胞 DNA 指纹

微卫星 DNA 或简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)是指具有一至几个碱基对连续多次重复的 DNA 片段。针对 SSR 两端较保守的序列合成引物并用 PCR 进行扩增,由于重复数不同造成的长度变异就可以表现为不同指纹的多态性^[8]。早在 1988 年,Jeffreys 等^[9]就已经运用 PCR 技术进行单细胞微卫星区域的指纹扩增。他们首先将体细胞(淋巴细胞和口腔细胞)制成细胞悬浮液,然后在倒置显微镜下观察,并将其中的单个细胞转移至 Eppendorf 管中,加热法或酶解法裂解细胞,进行微卫星序列的 PCR 扩增。他们针对 5 个微卫星位点设计引物进行扩增,结果显示,在 14 例口腔单细

胞 PCR 中,有 10 例在每个细胞至少检测出 2 个微卫星位点,部分细胞检测出全部 5 个位点。将 10 个单细胞间的指纹进行比较,则可以明显看出它们分别来自两个不同的生物个体。

随着嵌套 PCR(nested PCR)^[10]、半嵌套 PCR(heminested PCR)^[10]和荧光 PCR(fluorescent PCR)^[11,12]的加入,单细胞扩增的灵敏度显著增加。十几年来,其在临床及刑侦领域中的应用有了长足的发展。Findlay 小组^[13]在单细胞水平检测性别和囊性纤维化时用 DNA 指纹来评估污染程度。扩增反应所用引物为四碱基重复的微卫星序列,其在个体中是高度专一的,不同个体指纹相同的可能性仅为亿分之一。所以,当单细胞指纹与母体指纹相吻合时,就可以认为实验反应未受到其它细胞污染。扩增反应中,荧光标记的引物与单细胞直接混合(95℃ 变性可以使细胞裂解释放出 DNA 模板),反应结束进行 ABI(基因扫描软件)分析。由于整个实验中性别鉴定所用的引物针对牙釉蛋白基因,特定存在于性染色体上,囊性纤维化鉴定的引物只针对 CFTR 区域,因此指纹结果基本不会受同一反应液中其他扩增的影响。1998 年, Tamas 等^[14]运用单细胞定量荧光 PCR 方法对产前胎儿进行了染色体三体的鉴定。他们针对 13 号染色体上的多态 STR(small tandem repeat)位点进行单细胞扩增,通过对等位基因数目及比率的检测来判别是否为三体,结果极为成功。这一方法检测一例样品只需 4 个小时,与常规细胞学检测相比节省了大量时间,而且,该方法同样适用于其它染色体上多态位点的单细胞扩增^[14]。

1997 年, Roland 等人^[15]用棉球擦拭试验人触摸过的钢笔、钥匙、门把手及电话手柄等物体,从中提取、定量了 DNA,以短随机重复序列(STR, short tandem repeat)为靶位点,进行 PCR 扩增。结果表明这些指纹均可提供不同密度的多等位基因图谱,但该方法需要 1 ng 以上的 DNA 量,且只能确定一个 DNA 指纹标记。同年, Findlay 等人^[16]发明的另一种单细

胞 DNA 指纹弥补了这一不足。他们用显微操作法从 4 个不同的个体中提取了 226 个口腔细胞,针对细胞染色体上的 6 个 STR 位点进行荧光 PCR 扩增。STR 指纹结果显示,206 个细胞得以扩增,成功率为 91%。其中有 4 种或 4 种以上标记的细胞是 144 个,占总细胞图谱的 64%,114 个图谱(50%)上获得全部标记。

单细胞的 DNA 指纹技术不仅在法医实践中有重要意义,在细胞分子遗传的理论研究中也同样有巨大的应用潜力。通常 DNA 指纹针对细胞群体,但在特定情况下,例如研究雄性生殖细胞发育过程中的遗传性变化,就必须以单细胞作为研究对象。因此,单细胞 DNA 指纹技术的进一步完善与成熟,包括其操作上的简易性、可靠性、及检测方面的灵敏性等就显得尤为重要。

结 束 语

指纹技术的发展是无量的,目前已朝着多引物、长引物、通用引物方向发展,扩增产物的变性凝胶电泳和放射性标记显色是提高指纹分辨率的关键所在。而近年来荧光 PCR 的使用则极大地提高了实验反应的灵敏度,并使得指纹技术由定性转向定量,使得单细胞指纹分析成为可能。当前和今后 DNA 指纹技术将不再仅仅是多态性检测的工具,“指纹”作为一种实用标记,其核苷酸序列的组成、在基因组 DNA 中的分布等同样可以被很好地分析。而单细胞 DNA 指纹的发展,使得人们可以用宏观的实验方法,从更微观、更精确的角度去了解、分析基因组的结构和变化。

参 考 文 献

- [1] Zabeau M. and Vos P., 1993, *European Patent Application*. publication no:EP 0534858.
- [2] Vos P., 1995, *Nucl. Acids Res.*, **23**(21): 4407 - 4414.
- [3] Simons G. et al., 1997, *Genomics*, **44**(1):61 - 70.
- [4] Qi X. et al., 1997, *Mol Gen Genet*, **254**(3): 330 - 336.
- [5] Alonso-Blanco C. et al., 1998, *Plant J*, **14**(2):259

- 271.
- [6] Desmarais E. et al., 1998, *Nucl. Acids Res.*, **26**(6): 1458-1465.
- [7] Gillings. Michael and Holley M., 1997, *Electrophoresis*, **18**(9):1512-1518.
- [8] Weising K. et al., 1995, *PCR Methods Appl*, **4**(5): 249-255.
- [9] Jeffreys A. J. et al., 1988, *Nucl. Acids Res.*, **16**(23):10953-10971.
- [10] Strom C. M. and Rechitsky S., 1998, *J Forensic Sci.* **43**(3):696-700.
- [11] Findlay I. and Quirke P., 1996, *Hum Reprod Update*, **2**(2):137-152.
- [12] Findlay I. et al., 1996, *J Assist Reprod Genet.* **2**(2):96-103.
- [13] Findlay I. et al., 1995, *Hum Reprod*, **10**(4): 1013.
- [14] Tamas T. et al., 1998, *Prenat. Diagn.*, **18**: 659-674.
- [15] Roland A. H. van Oorschot and Maxwell K. Jones., 1997, *Nature*, **387**:767.
- [16] Findlay, Taylor, P. Quirke., 1997, *Nature*, **389**: 555.

核因子 κ B 研究进展

高飞 易静 汤雪明

(上海第二医科大学细胞生物学教研室 上海 200025)

核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 于 1986 年由 Sen 和 Baltimore 发现,得名于它能够与 B 细胞免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κ B 序列(GGGACTTCC)特异结合,是近年发现的最重要的转录因子之一。NF- κ B 存在于多种类型的细胞,它调控的靶基因包括免疫相关受体、细胞因子、炎症因子、黏附分子、急性期蛋白等。NF- κ B 不仅可以调控免疫细胞的激活、T、B 淋巴细胞的发育,还广泛参与机体的应激反应、炎症反应。NF- κ B 与哺乳动物原癌基因表达产物 Rel 蛋白高度同源,从而形成了 NF- κ B/Rel 家族,该家族与细胞的增殖、分化和凋亡有密切关系,使得它在发育和肿瘤发生中扮演重要角色。另外近年来对 NF- κ B 的激活途径有了较为深入的了解,针对其激活的各个环节进行疾病治疗,特别是改善炎症治疗的疗效,提高抗肿瘤药物的敏感性,成为当今研究的热点^[1-3]。

一、NF- κ B/Rel 家族和 I- κ B 家族

目前已确认的 NF- κ B/Rel 家族成员有:来自哺乳动物的 RelA(p65)、RelB、c-Rel、p50(或其前体 p105)和 p52(或其前体 p105)及来自果蝇的 Dorsal、Dif、Relish。哺乳动物 NF- κ B/Rel 家族成员可形成同二聚体或异二聚体,正常情

况下细胞内存在着不同的二聚体,其分布可能与细胞类型或细胞所处的状态有关。通常所说的 NF- κ B 即指 p50/p65 异二聚体,是生理情况下最常见的功能形式^[2,3]。NF- κ B/Rel 家族成员肽链 N 末端均含一段由约 300 个氨基酸残基组成的高度保守的 Rel 同源域(Rel-homology domain, RHD),其中含 DNA 结合功能域、二聚体化功能域及核定位信号(nuclear localization signal, NLS)。NF- κ B/Rel 家族成员肽链 C 末端相异程度较显著,根据其特点可将哺乳动物 NF- κ B/Rel 成员分为两类:含反式激活功能域(transactivation domain, TAD)的 RelA(p65)、RelB、c-Rel,及不含 TAD 的 p50/p105(p50 之前体)、p52/p100(p52 之前体)^[1,2]。

I- κ B(inhibitor κ B)是一类 NF- κ B 的抑制蛋白,静息状态下与 NF- κ B 相结合形成复合体。I- κ B 家族成员 C 端均含锚蛋白重复域(ankyrin repeat domain, ARD),该结构可与 NF- κ B/Rel 家族成员 RHD 相互作用。目前发现的 I- κ B 家族成员有:来自哺乳动物的 I- κ B α 、I- κ B β 、I- κ B ϵ 、Bcl-3 及来自果蝇的 Cactus、Relish。p50 的前体 p105 及 p52 的前体 p100 因 C 端含有 ARD,亦可被看作 I- κ B 成员(分别被称作 I- κ B γ 、I- κ B δ)。哺乳动物 NF- κ B/Rel/I- κ B 家族的成员、基因及其结构、Knockout 表型总结于表 1^[1,2]。