

# 基因探针及其在医学上的应用

石 成 华

(军事医学科学院基础医学研究所, 北京)

基因探针在基因工程研究中是一项不可缺少的手段。它已被用在鉴定重组质粒或带有真核DNA序列的 $\lambda$ 噬菌体, 通过菌落原位杂交或噬菌斑原位杂交能从大量的菌落或菌斑中挑选出含有特殊DNA序列的重组体克隆。因此有人将基因探针检测比拟为“在柴草堆中去找一根针”。近几年来, 由于在制备探针方法上的突破, 提高了基因探针检测的敏感性及特异性, 已逐渐被应用于传染病快速诊断、流行病学调查、食品检验、动植物病的诊断和人类遗传病的诊断中。可能在不远的将来基因探针在诊断和治疗肿瘤、组织分型及检测由诱变剂引起的DNA损伤上将发挥其威力。一位华尔街分析家预言“在生物技术市场中, 下一个突破和具吸引力的是基因探针”。

## 基因探针检测的基本技术

### (一) 特异目的基因的获得

制备基因探针的第一步是必须得到特异的目的基因, 可通过下述三种途径:

(1) 直接分离基因: 即从基因组上直接用内切酶切下所需基因。(2) 化学合成基因: 即以单核苷酸为原料, 以固相磷酸三酯等方法合成某一结构完全清楚, 分子量较小的基因。(3) 酶促合成基因: 在真核细胞中获得特异的结构基因常用方法是以mRNA为模板, 利用反转录酶合成

cDNA, 再以DNA聚合酶I合成双链的结构基因。在获得特异的的目的基因后, 采用体外重组技术与载体DNA相连, 转化至大肠杆菌中进行无性繁殖。以氯化铯超离心纯化重组质粒DNA并以合适限制性内切酶消化, 经凝胶电泳制备回收特异的的目的基因片段。

### (二) 基因的标记

目前采用的标记方法有同位素标记、生物素标记和化学修饰核酸标记。

1. 同位素标记: 可用 $^{125}\text{I}$ 或 $^{32}\text{P}$ 进行标记。碘标记为 $^{125}\text{I}$ 分子以共价键结合至胞嘧啶的5位上<sup>[1]</sup> $^{32}\text{P}$ 标记的原理是利用DNase I在DNA分子上打缺刻, 在大肠杆菌多聚酶I的作用下, 使缺刻的3'OH端加上核苷酸, 由于此酶同时具有5'→3'外切酶活性, 可不断去除核苷酸, 从而造成缺刻移动, 如果加入 $^{32}\text{P}$ 标记的核苷酸以代替原有的核苷酸, 就可以制备比活性在 $10^3\text{cpm}/\mu\text{gDNA}$ 以上的基因探针<sup>[2]</sup>。

2. 生物素标记: 美国耶鲁大学David ward实验室<sup>[3,4]</sup>以生物素代替了同位素进行标记, 他们发现生物素可共价连接至嘧啶环的C5位上, 合成TTP或UTP的类似物。在离体条件下, 这种带有生物素标记的核苷酸类似物可作为大肠杆菌多聚酶I的底物参入带有缺刻的DNA或RNA,

本文于1985年10月22日收到。

黄翠芬教授审阅此稿, 特此致谢。

从而合成带生物素标记的基因探针。

3. 化学修饰标记: 法国的Tchen<sup>[6]</sup>等应用N-乙酰氧基-N-2乙酰氨基苄(AAF)或它的7-碘化衍生物(AAIF)化学修饰标记RNA或DNA的鸟嘌呤残基。这样修饰的核酸制备成探针可用免疫化学技术检出。

### (三) 基因探针的杂交与检测

1. 菌落原位杂交: 将待检菌影印或点种至铺在琼脂表面的硝酸纤维素滤膜上, 37°C培养过夜, 保存原有平皿上菌落作为参照。取出长有菌落的硝酸纤维素滤膜, 以碱液处理使菌落中DNA双链变性, 变性后的单链DNA与膜牢固地结合形成“DNA印迹”, 在与标记的基因探针杂交后即可检测出与探针互补的核苷酸序列。若使用同位素标记的探针<sup>[6]</sup>, 在杂交后的滤膜上放一张X光胶片, 经放射自显影后在杂交部位出现黑色杂交点。如果使用生物素标记的探针<sup>[7,8]</sup>, 在杂交后可与抗生物素蛋白或抗生物素抗体培育后, 应用免疫学及酶标显色反应技术确定杂交位置。也可将一些信号分子如荧光抗体、酶标抗体和化学发光催化剂等预先偶合到探针上又不损害它与互补序列杂交的能力。这样, 通过检测信号分子来检测生物素标记的探针。

2. DNA点杂交: 从待检标本中(血液, 粪便或呼吸道分泌物)抽提病毒RNA或DNA, 经变性后点种在硝酸纤维素滤膜上, 80°C烘干后与基因探针进行杂交。

3. 印迹杂交<sup>[9]</sup>: DNA经限制性内切酶消化, 凝胶电泳, 以碱处理凝胶使DNA变性, 再以吸印法将DNA从凝胶转移至硝酸纤维素滤膜上, 与基因探针杂交后检测。此法不仅可检测特异基因序列, 还可进行基因的定位。

同位素探针与生物素探针相比, 后者

显示明显的优越性, 它具有以下的特点

(1) 杂交时间短, 约1—2h, 同位素探针需18—24h; (2) 硝酸纤维素膜对生物素探针的非特异性结合少, 故本底清晰; (3) 检测的敏感性可与同位素探针相当, 约1—10pg, 甚至更为敏感; (4) 探针保存时间可长达1—2年, 同位素探针则受半衰期的影响; (5) 安全、操作中无需防护。

## 基因探针在医学上的应用

### (一) 传染病的诊断及流行病学调查

目前基因探针已用于对细菌、病毒、寄生虫引起的人和家畜传染病诊断及流行病学调查中。它具有高度的敏感性, 检测一个单基因仅需 $10^4$ 拷贝, 但进行单克隆测定至少需 $10^7$ 抗原分子。并且基因探针的检测建立在探针和待检基因序列同源性的基础上, 因此具有高度的特异性。应用肠毒素LT(热不稳定毒素)和ST(热稳定毒素)基因探针, 检测毒源性大肠杆菌引起的腹泻, 其敏感性比Y-1肾上腺细胞和乳鼠试验高10000倍。利用LT探针的特异性还可区别大肠杆菌和霍乱弧菌引起的腹泻。在大肠杆菌腹泻调查中, 利用人源和猪源的ST探针可加以区分<sup>[10]</sup>。

在病毒感染的检测上也显示其突出的优点。过去用培养法需数周, 血清学技术常给以含糊的结论。现在可用基因探针直接从取样标本中在数小时内检出病毒<sup>[11-14]</sup>。引起肝炎的肝炎病毒、幼儿腹泻的轮状病毒、与子宫颈癌有关的单纯疱疹病毒, 引起感染性单核细胞增多症和Burkitt's淋巴瘤有关的Epstein-Barr病毒, 引起新生儿和免疫缺陷个体损伤的巨细胞病毒均已制备成探针药盒用于临床试验。

用恶性疟原虫重复DNA制备成 $^{32}\text{P}$ 标记的探针已用于疟疾的诊断和血库血筛选检查,检出疟原虫血症的浓度为0.001%,出现阳性需要最小恶性疟原虫DNA量为25pg<sup>[16]</sup>。

### (二) 人类遗传病的诊断<sup>[16]</sup>

过去诊断遗传病是采取胎儿血液进行分析,危险性大,往往造成5—10%胎儿发生死亡。自从基因探针用于遗传病的诊断后,只需从羊水液分离胚胎纤维母细胞或取绒毛膜细胞的DNA,经酶切消化基因组,以吸印法将DNA转移至硝酸纤维素滤膜,与特异的基因探针杂交,从酶切图谱的变化就可对某些遗传病做出诊断,现已用基因探针对60种生化遗传病做出产前诊断。所用方法有下列三种:(1)用有关基因DNA探针直接分析遗传病的基因缺陷。例如用 $\beta$ -珠蛋白基因探针检测镰刀状细胞贫血症,用次黄嘌呤磷酸核糖转移酶基因探针对Lesch-Nyhan综合症作产前诊断。(2)用有关基因DNA探针间接分析与DNA多态紧密连锁的遗传病。例如用 $\beta$ -珠蛋白基因探针检测地中海贫血,用苯丙氨酸羟化酶基因检测苯丙酮尿症。

(3)用与遗传病基因有连锁关系的多态性DNA片段作为探针,间接分析检测遗传病。例如对Huntington舞蹈症与Duchenne肌营养不良症的早期诊断。

### (三) 食品卫生

通常在食品出售前要检验有否沙门氏菌,常规检查需一周时间,探针法检测只需2—3天。但目前唯一的困难是已知的沙门氏菌株达1600—1700种之多,没有足够量的混合探针来识别所有的菌株和亚株。Integrate公司宣称已找到一个探针可识别350个菌株以上<sup>[17]</sup>,但要找到提供检测所有菌株的混合探针将是个艰巨的任务。

### (四) 肿瘤的诊断

病毒或细胞致癌基因的诊断也是重要领域。病毒致癌基因存在正常细胞内,它可被特异的点突变,启动子的诱导、基因的扩增和染色体的重排等所激活。应用病毒癌基因的探针可检出细胞癌基因序列,一旦致癌机理被了解后,探针即可用于肿瘤诊断。有一些癌基因已可直接用于诊断肿瘤,如从白血病细胞中分离出来的癌基因bcl-1和bcl-2,它们在正常情况下分别位于11和18号染色体上,它们与14号染色体Jh区的易位常常导致多发性骨髓瘤和淋巴瘤,因此可用这两个癌基因作为诊断这些白血病的探针。一些肿瘤如小细胞肺癌和神经母细胞瘤的病程发展往往伴随着癌基因的扩增,所以这种癌基因的测定就可成为这些肿瘤分期、指导治疗和观察疗效的重要指标<sup>[18]</sup>。此外,探针能识别和结合至特异DNA序列上,从而发挥治疗的效果。

## 基因探针的近况

基因探针不仅在医学上,在农业以至工业上都有着很大的潜力。目前对基因探针研究的动向主要在以下三方面<sup>[17]</sup>:

(1)提高探针敏感性,为增加敏感性,可在探针上加上生物素化的核苷酸“长尾”,可达几千个碱基对长,甚至可比探针本身大300倍。Engelhart认为加尾法将提高生物素探针系统的敏感性达10倍之多,能检测低至 $10^{-13}\text{g}$  DNA 或一个基因的10万个拷贝。此外也可将许多酶分子制备成多聚物连至生物素或抗体分子上,这样就可检测 $10^{-14}\text{g}$  DNA 或一个基因的1万个拷贝。(2)提高特异性和简化测定步骤;Dr. Heller's 建立化学发光探针系统。此系统由两个不同的探针组成,两个探针都标记一端,第一个探针用催化剂标

(下转第15页)

(上接p.18)记,第二个探针用化学发光复合物标记,当两个探针与相应的一个连续的DNA片段杂交时,两个标记末端必须十分靠近,这样催化剂就可激发化学发光复合物发光。他认为这一系统的特异性强、可靠,DNA不需要固定,杂交后不需清洗的步骤,便于自动化操作和大量测定

标本。(3)在同一标本中同时检测几种DNA序列。Ward等设计将不同的配体(包括半抗原决定簇,2,4二硝基酚、磷酸盐衍生物和肌醇)连接到探针核苷酸上,每一种配体又结合一个不同的检测系统,使每种被检基因产生一种不同的信号,这样在同一标本中可同时检测几种基因。

### 参 考 文 献

- [1] Andrews, A.T. et al., *Electrophoresis*, p.286, 1981.
- [2] Rigby, P.W.J. et al., *J.Mol.Biol.*, 113: 237, 1977.
- [3] Langer, P.R. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 6633, 1979.
- [4] Brigati, R.J. et al., *Virology*, 126: 32, 1983.
- [5] Tchen, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 3466, 1984.
- [6] Grunstein, M. & Hogness, D.: *Ibid.* 72: 3961, 1975.
- [7] Leary, J.J. et al., *Ibid.* 80:40, 1983
- [8] Molcolin, A.S., *Nature*, 300: 108, 1982.
- [9] Southern, E., *J.Mol. Biol.*, 98: 503, 1975.
- [10] Moseley, S.L. et al., *J. Inf. Dis.*, 145: 863, 1982.
- [11] Berninger, M. et al., *J.Med. Virol.*, 9: 57, 1982.
- [12] Weller, I.V.D. et al., *Ibid.*, 9: 273, 1982.
- [13] Flores, J. et al., *Lancet*, 1: 555, 1983.
- [14] Lin, M. et al., *In press.*
- [15] Franzen, L. et al., *Lancet*, p.525, 1984.
- [16] David, N.C. & Jorg Schmidtke., *Hum Genet*, 66:1-16, 1984.
- [17] Klausner, A. & Wilson, T., *Biotechnology*, August, p.471, 1983,
- [18] 邓国仁, 国外医学分子生物学分册, 1985年 第7期, p.194.