

非同位素 PCR-单链构象多态性技术的建立和应用*

陈 军 汪慧民 李满枝 吴荫棠

(中山医科大学肿瘤研究所, 广州 510060)

摘要 PCR-单链构象多态性技术 (SSCP) 问世以来, 成为研究基因突变的工具. 特别是在分子肿瘤学研究中, 广泛应用于癌基因、抑癌基因突变的研究. 常规 PCR-SSCP 采用同位素标记 PCR 产物, 测序板电泳分离突变, 在操作和费用上有种种局限. 文章建立了一种非同位素 PCR-SSCP 技术: 通过不对称 PCR 获得单链, 普通 PAGE 分离, 经银染检出突变. 用这种方法, 还研究了四株鼻咽癌细胞株 CNE1, CNE2, HK1 和 SUNE1 中肿瘤抑制基因 p53 基因突变. 证实 CNE1, CNE2 在 exon 8, HK1 在 exon 5 有突变, 并发现新建立的细胞株 SUNE1 在 exon 8 有突变.

关键词 不对称 PCR, 单链构象多态性, 基因突变, p53, 鼻咽癌

1989 年 Orita^[1,2] 提出单链构象多态性技术, 其原理是: 双链 DNA 变性后, 单链 DNA 通过分子内碱基配对重新折叠; 单链分子核苷酸序列的微小改变, 包括点突变、缺失和插入都会影响单链分子的最终构象, 在非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 时引起电泳迁移率的改变. 常规的 PCR-单链构象多态性技术 (SSCP) 包括: PCR (同位素渗入或标记引物) — 产物变性 — 非变性 PAGE (测序板) — 放射自显影. 这种方法有如下缺陷: 需用同位素, 造成污染或危害; 时间延长; 需用测序板电泳, 不利于常规操作. 此外, 在实际操作中有时发现, 从放射自显影图像上并不能准确判断结果. 这是由于双链 DNA 不能完全变性, 部分变性的 ds DNA 可能被误当成单链多态性. 不对称 PCR (a PCR) 广泛用于扩增单链 DNA^[3], 本文利用不对称 PCR 和银染建立了非同位素不对称 PCR-SSCP (a PCR-SSCP), 克服了常规 PCR-SSCP 的缺陷.

肿瘤抑制基因 p53 是分子肿瘤学研究的热点, 在多种肿瘤中证实 p53 基因突变的存

在^[4]. 国外报道鼻咽癌细胞株 CNE1, CNE2 和 HK1 都有 p53 基因突变^[5], 其中 CNE1, CNE2 在 exon8, HK1 在 exon5. 最近本实验室建立了一株新的鼻咽癌细胞株 SUNE1. 本文采用非同位素不对称 PCR-SSCP 研究了以上细胞株中 p53 基因突变, 证明该方法是研究基因突变的有力工具.

1 材料和方法

1.1 实验材料

鼻咽癌细胞株 CNE1, CNE2, HK1, SUNE1 和一例正常鼻咽癌组织.

1.2 PCR 引物

分别扩增 p53 基因第 5, 6, 7, 8 外显子, 这四个外显子包含 p53 基因的最保守区和突变热点^[4]. 根据已发表序列设计引物^[6], 如表 1 所示.

*CMB 和国家自然科学基金资助.

收稿日期: 1993-12-02, 修回日期: 1994-03-22

表 1 p53 各外显子引物和扩增片段

外显子	引 物									扩增片段 (bp)
exon5	P1	GGA	ATT	CCT	CTT	CCT	GCA	GTA	C	224
	P2	AGG	GCC	CCA	GCT	GCT	CAC	CAT	C	
exon6	P3	CAC	TGA	TTG	CTC	TTA	GGT			143
	P4	AGT	TGC	AAA	CCA	GAC	CTC			
exon7	P5	GGA	ATT	CTC	CTA	GGT	TGG	CTC	T	142
	P6	ACT	TAA	GTG	GCT	CCT	GAC	CTG	G	
exon8	P7	GGA	ATT	CCT	GAG	TAG	TGG	TAA		158
	P8	GTC	GAC	CTC	GCT	TAG	TGC	TCC		

1.3 PCR 和不对称 PCR (a PCR)

1.3.1 PCR 扩增各外显子 50 μ l 反应液中含 50mmol/L Tris HCl, pH 9.0 (25 $^{\circ}$ C), 50mmol/L KCl, 7mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dNTPs, 0.2mg/ml BSA, 16mmol/L (NH₄)₂SO₄, 引物各 100 μ mol/L. Super Taq 1.5 单位 (HT Biotechnology) 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 总共 35 循环后, 链延长 72 $^{\circ}$ C, 10min.

1.3.2 a PCR 第一次 PCR 产物 PAGE 电泳后, 切下 5mg 产物带, 作为不对称 PCR 底物. 凝胶捣碎、浸泡在第二次不对称 PCR 反应液 45 μ l (引物浓度比为 100:1, 其它同第一次 PCR), 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡 2h. 加 Taq 酶后开始循环, 扩增程序同前, 在链延长后, 94 $^{\circ}$ C 变性 5min, 迅速插入冰浴.

1.3.3 单链构象多态性分析 普通垂直板电泳 (14cm $\times$ 14cm $\times$ 2mm), 非变性 9% 聚丙烯酰胺凝胶, 含 5% 甘油. 15 μ l 不对称 PCR 产物与等体积测序上样缓冲液混合上样, 50mA 室温电泳 5h, 经风扇冷却降温.

1.3.4 溴乙啶染色和银染 银染采用 Sigma 公司 Silver Stain Kit, AG-25.

2 结 果

我们研究了四株鼻咽癌细胞株 CNE1, CNE2, HK1, SUNE1 和一例正常鼻咽癌组织中 p53 基因突变, 主要分析了第 5, 6, 7, 8 外

显子; 据报道 98% 以上的 p53 基因突变发生在这四个外显子上.

图 1 是 p53 基因第 8 外显子的 a PCR-SSCP 分析. 不对称 PCR 的产物同时存在双链 DNA 和单链 DNA. 双链 DNA 分子量与所设计相符. 以正常鼻咽组织和 HK1 为对照, CNE1, CNE2, SUNE1 都有迁移变位的单链存在, 说明 CNE1, CNE2, SUNE1 存在第 8 外显子的突变. 此外, CNE1, CNE2 中同时存在第 8 外显子的突变型和野生型. 突变型序列分析正在进行之中.

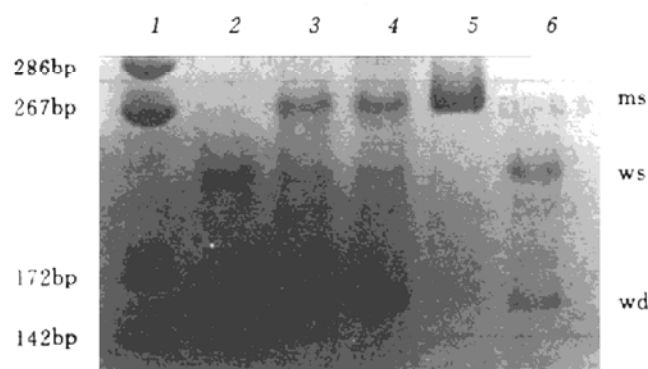


图 1 p53 第 8 外显子的 a PCR-SSCP 分析

1 为分子标准, 2, 3, 4, 5, 6 依次为正常鼻咽组织, CNE1, CNE2, SUNE1 和 HK1. 图中 Wd, Ws, ms 分别为双链 DNA, 野生型单链 DNA 和突变型单链 DNA. 引物浓度之比 P7:P8=100:1.

图 2 是 p53 第 5 外显子的 a PCR-SSCP 分析. 正常鼻咽组织, CNE1, CNE2, SUNE1 第

5 外显子均为野生型, HK1 有第 5 外显子突变.

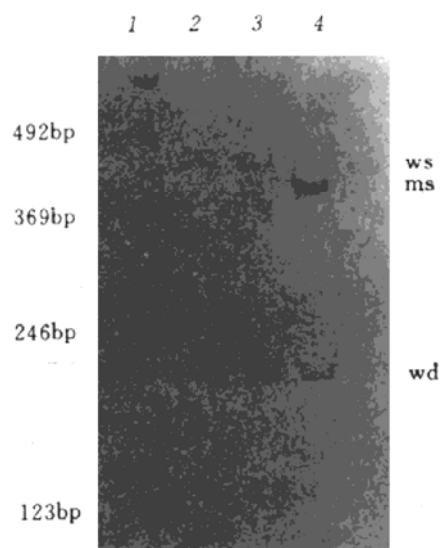


图 2 p53 基因第 5 外显子 a PCR-SSCP 分析

1 为分子标准, 2, 3, 4, 5, 分别为正常鼻咽组织, CNE1, HK1 和 SUNE1. 引物浓度之比

P2 : P1 = 100 : 1.

四个细胞株及正常鼻咽组织第 6, 7 外显子也进行了分析, 没有检出突变 (表 2).

表 2 鼻咽癌细胞株 p53 基因突变

	exon 5	exon 6	exon 7	exon 8
正常鼻咽组织	wt	wt	wt	wt
CNE1	wt	wt	wt	mut
CNE2	wt	wt	wt	mut
HK1	mut	wt	wt	wt
SUNE1	wt	wt	wt	mut

注: wt, 野生型, mut, 突变型.

3 讨 论

在基因突变, 尤其是点突变研究中, PCR-SSCP 是一种高效灵敏的方法. 在此以前, 一般通过序列分析或温度梯度凝胶电泳才能确认点突变的存在^[7], 而温度梯度凝胶电泳需要特殊仪器. 因此在分析大量样品时, PCR-SSCP 避免了大量、繁琐的工作. 这种方法要求 PCR

特异, 双链 DNA 变性, 非特异扩增和 ds DNA 不完全变性都会造成多态性解读困难, 甚至产生错误判断. 特别是在同时有野生型和突变型的样品中, SSCP 分析因有双链 DNA 和四种单链构象, 使解读更加困难. 而采用 a PCR-SSCP 只有 ds DNA 和二种单链构象, 经银染后与双链 DNA 分子量标准对照, 容易解读. 另外, 不对称 PCR 的引入, 消除了双链 DNA 不完全变性而造成的误读. 不同构象的单链可以用普通垂直板电泳分离, 避免了使用测序板.

DNA 的银染是一种灵敏度很高的方法, 聚丙烯酰胺凝胶银染后可达 ng 水平, 而且对双链和单链 DNA 都有较高的灵敏度. PCR 和不对称 PCR 的产物远远超过银染的检测水平. 因此不对称 PCR 结合银染可以舍弃同位素标记, 从而避免了使用同位素的种种缺陷. 时间上也可缩短. 此外, 在本实验室经银染的凝胶, 至少能保存半年以上, 便于回顾性分析. 综上所述, 本文建立的不对称 PCR-SSCP 不使用同位素, 解决了 DNA 不完全变性问题, 操作简便, 结果重复性高, 是一种有应用前景的技术.

不对称 PCR 是在扩增过程中采用不同的引物浓度, 从而获得单链的方法. 我们在实验中采用了不同的引物浓度比 1 : 25, 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200; 发现浓度比为 1 : 100 效果最佳, 此时有较高的单链产物同时又有足够的双链产物. 不对称 PCR 的引入, 解决了单链构象多态性分析中的 DNA 变性问题, 又简化了变性过程.

本文研究的四株鼻咽癌细胞株 CNE1, CNE2, HK1, SUNE1 都有 p53 基因突变, 而 20 例鼻咽癌组织中没有 p53 突变(待发表), 提示 p53 基因突变可能在鼻咽癌细胞株建立过程中起作用.

参 考 文 献

- 1 Orita M, Suzuki Y, Sekya T *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1989; 86: 2766

- 2 Orita M, Iwaha H, Kanazawa H *et al.* Genomics, 1989; 5: 874
- 3 Gyllenstein U B, Erlich H A. Proc Natl Acad Sci USA, 1988; 85: 7652
- 4 Hollstein M, Sidransky O, Vogelstein *et al.* Science, 1991; 253: 49
- 5 Charles H S, Yvone C T, Dolly P H *et al.* Cancer Res, 1992; 52: 4787
- 6 Buchman V L, Chumakov P M, Ninkina N N *et al.* Gene, 1988; 70: 245
- 7 Norio T, Keiko H, Miesko K *et al.* Mutation Res, 1990; 234: 61

用 PCR 检测细胞培养中支原体污染

王正森 吴建新 赵小元 孙宝岭 郭章滢* 李 敏*

(首都儿科研究所生化免疫室, 北京 100020)

摘要 细胞培养中支原体污染已经成为严重的问题. 为了扩增 6 种支原体 (精氨酸支原体, 口腔支原体, 人型支原体, 猪鼻支原体, 发酵支原体及莱氏支原体) 核糖体 RNA 操纵子的 16s 和 23s DNA 间区, 设计了三个通用 PCR 引物 (F1, F2 及 R1). 当以 6 种支原体 DNA 为模板时, 引物 F1 和 R1 产生 340 到 468bp 的片段, 引物 F2 和 R1 产生 145 到 211bp 的片段. 当用 Hela 细胞或 *E. coli* DNA 作为模板, 用引物 F1 和 R1 时, 在电泳中未观察到特定区带. 此法最小能检出 8.5fg 精氨酸支原体 DNA, 相当于 13 个精氨酸支原体. 这说明, 当这些支原体污染细胞培养时, 能用 PCR 法检测出来.

关键词 聚合酶链反应 (PCR), 支原体, 污染, 细胞培养

目前, 细胞培养技术已经成为生物学和医学研究的重要工具. 而细胞培养中支原体污染也是个极严重问题. 国外报道细胞培养中支原体污染率在 24%—29% 之间. 支原体是能独立生活的微生物, 它通过本身的特殊结构、酶和毒素, 以及消耗培养基和宿主细胞的细胞成分, 使培养的细胞和组织从功能到形态的各种参数发生改变, 直至死亡. 用这些已被支原体污染的培养细胞或组织进行研究, 可能产生错误的结果. 检测细胞培养中支原体污染的方法, 最常用的有支原体培养法^[1]及分子杂交法^[2,3]. 支原体培养法耗时长, 又可能被其它污染原污染. 有关探针诊断, 美国 Gen-Probe^[4]已推出支原体组织培养 I 型试剂盒及改进快速型 (TC I 型) 试剂盒, 采用 ³H 标记, 液相杂交, 虽然快速, 但敏感性较差, 且存在批间差异. 其它有 DNA 荧光染色法、特异性酶测定法、ELISA 及免疫印迹法, 或特异性差, 或灵敏度低, 或本底高, 均未能成为常规检测

手段. 聚合酶链反应 (PCR) 法已广泛应用于检测各种病毒与细菌, 我们建立了巢式 (nested) PCR 检测细胞培养中污染支原体的方法. 该法具有特异、灵敏、简便、可靠的特点.

1 材料与方法

1.1 支原体菌株

所用精氨酸支原体 (*M. arginini*)、口腔支原体 (*M. orale*)、人型支原体 (*M. hominis*)、猪鼻支原体 (*M. hyorhinitis*)、发酵支原体 (*M. fermentans*) 及莱氏支原体 (*A. laidlawii*) 均为我所细菌室提供.

1.2 支原体模板 DNA 制备

取支原体培养液 1—2ml, 15 000r/min 离心 15min, 弃上清, 沉淀用 400 μ l STE (100mmol/L NaCl, 10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA pH8.0) 悬浮, 加入 Triton X-

*首都儿科研究所细菌室.

收稿日期: 1993-12-27, 修回日期: 1994-03-15

[1, 2-d] thiazolin-2-ylidene)-2-methylpropenyl] naphtho [1, 2-d]-thiazolium bromide] is highly specific for single strand oligo-deoxynucleotidyl fragment; no other cell component produces influence. The method permits the estimation of TdT activity as low as 3U. It is a simple assay suitable for clinical analysis of TdT in human leukemias and providing information useful in classifying haematological neoplasms.

Key words terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT), stains-all, classifying haematological neoplasms

Research on Phosphorus Content in Living Rabbits by *in vivo* Neutron Activation Analysis. Luo Xianqing, Wu Jingping, Wang Haiying, Huang Hanqiao, Liu Xiaohua, Lu Xihai, Yu Aiping, Luo Qiandi. (*Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (6): 547—549

Research on the determination of phosphorus content in living rabbits by *in vivo* neutron activation analysis (IVNAA) was carried out, and the average value of the phosphorus percentage content which were measured for ten rabbits was $(1.26 \pm 0.01)\%$.

Key words *in vivo* neutron activation analysis, living rabbits, phosphorus content

A Non-radioactive Single-strand Conformation Polymorphisms of Asymmetric PCR and its Application. Chen Jun, Wang Huimin, Li Manzhi, Wu Yintang. (*Cancer institute, Sun Yat-Sen University of Medical Science, Guangzhou 510060*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (6): 550—553

PCR-single strand conformation polymorphisms is a powerful method for screening mu-

tations and widely used in studying mutations of oncogene and tumor suppressor gene. The ordinary PCR-SSCP needs the use of radioactivity and sequencing apparatus, thus compromises its application. Here, a non-radioactive asymmetric PCR-SSCP was established. Single-stranded DNA was generated by asymmetric PCR, separated by mini PAGE and silver stained. The exon 5, 6, 7, 8 of p53 gene in four cell lines of nasopharyngeal carcinoma-CNE1, CNE2, HK1 and SUNE1 were investigated. The method was proved to be successful in screening mutations.

Key words asymmetric PCR, single-strand conformation, polymorphisms, mutation, p53, nasopharyngeal carcinoma

PCR Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Culture. Wang Zhengsen, Wu Jianxin, Zhao Xiaoyuan, Sun Baoling, Guo Zhanggai, Li Min. (*Department of Biochemistry and Immunology of the Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; 21 (6): 553—556

Mycoplasma contamination of cell culture is a serious problem in biomedical research. Three common PCR primers (F1, F2 and R1) were designed to amplify the spacer region between 16S and 23S DNA in rRNA operons of 6 species of mycoplasmas (*M. arginini*, *M. orale*, *M. hominis*, *M. hyorhinis*, *M. fermentans* and *A. laidlawii*). When the DNA of 6 species was used as the template, primers F1 and R1 produced fragments of 340 to 468 bp, and primers F2 and R1 produced fragments of 145 to 211 bp. No discrete band was observed in electrophoretic gels when HeLa cell or *E. coli* DNA was served as the template with the use of primers F1 and R1. As little as 8.5 fg DNA of *M. arginini*, approximately 13 orga-