

一种测定多个目的基因扩增的简易方法 ——差异 PCR 扩增法

王 会 邓国仁

(北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034)

提 要

一种建立在 PCR 的基础上, 不使用同位素能快速安全地检测基因组中某一目的基因扩增程度的简易方法。此法所需 DNA 样品量少、灵敏度高, 对于为观察细胞株而制备的小量样品或者石蜡包埋及福尔马林处理后的组织切片中某种基因的扩增尤为适宜。可做为一种辅助诊断手段推广应用到临床实验室。

关键词 癌基因扩增, 聚合酶链反应 (PCR)

在肿瘤分子生物学的研究中, 某些原癌基因的扩增常是导致瘤组织恶变的重要机制之一。例如在乳腺癌、胃癌、唾液腺癌中均有原癌基因 C-erbB-2/HER-2 的扩增。其中乳腺癌有 40% 的病人在癌组织基因组中有 C-erbB-2 的扩增^[1-3]。并且根据临床资料与实验室研究证明, 某些原癌基因的扩增程度常与病人术后的复发和转移具有正相关性^[4]。因此早期快速检测出癌组织基因组 DNA 中原癌基因的扩增情况将有助于临床诊断, 手术处理以及愈后监护。目前实验室检测 DNA 的扩增均采用 Southern blotting 或点杂交。此类方法周期长, 且均需使用同位素。本文报道一种简易方法, 可在两天内测出目的基因是否有扩增以及扩增的程度。此法是在同一反应体系内对两个以上不同目的基因进行 PCR 扩增。在一定的循环次数内可明显快速检测出多个目的基因在拷贝数量上的差异。

材 料 及 方 法

一、材料

含 C-erbB-2/HER-2 癌基因的质粒 pCER 204 由美国休斯顿 Anderson 医院洪明奇教授

赠送。含人类 γ 珠蛋白 γ -IVS-II 基因的质粒 pUC-2 γ - β 由中国医学科学院基础医学研究所刘敬忠教授赠送^[5]。

两对引物 PC₁₁-PC₁₂、PC₁₃-PC₁₄ 均为人工合成的 20 聚脱氧核糖核苷酸。

PC₁₁: 5'TTCTTCTGTCCAGACCTGC3'

PC₁₂: 5'GCTCCAGCCCTAGTGTTCAGG3'

PC₁₃: 5'GAGAACTTCAAGGTGAGTCC3'

PC₁₄: 5'TCTGCAGTTTCTTCACTCCC3'

引物 PC₁₁-PC₁₂ 是原癌基因 C-erbB-2/HER-2 的引物。其 PCR 扩增区域位于 C-erbB-2/HER-2 原癌基因 cDNA 的 3261—3366 碱基区间^[6], 扩增片段为 105 碱基对。引物 PC₁₃-PC₁₄ 为人类珠蛋白 γ -IVS-II 基因片段的引物, 其 PCR 扩增区域位于 γ -珠蛋白基因的 478—620 碱基区间^[7], 扩增片段为 142 碱基对。

耐热 Taq DNA 多聚酶购自美国 Cetus 公司。

二、多聚酶 DNA 链延伸反应

按 Saiki 法^[8]加以改进。分别按梯度比取两种含目的基因的质粒。每个反应体系中质粒 DNA 总量为 100ng。体系为 60 μ l 缓冲液。缓

冲液含 10mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 50mmol/L KCl; 1.5mmol/L MgCl₂; 0.3mmol/L dATP; 0.3mmol/L dCTP; 0.3mmol/L dGTP; 0.3mmol/L dTTP; 0.4μmol/L PC₁₁-PC₁₂; 0.4μmol/L PC₁₃-PC₁₄; 1U Taq 多聚酶。溶液上层加 50μl 液体石蜡后将试管先后置于 95℃ 水浴 1min, 56℃ 水浴 2min, 72℃ 水浴 3min, 重复以上循环 20 次。移去液体石蜡, 水相用酚/氯仿抽提一次。抽提后加醋酸铵, 终浓度为 0.3mol/L。用无水乙醇沉淀 DNA。将 DNA 溶解后用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。经 EB 染色在光密度仪下分析, 可获得两种目的基因扩增后的拷贝数量之比。

结果与讨论

为了能清楚地观察多个目的基因经 PCR 扩增后在拷贝数量上的差异, 我们选用两个分别带有不同目的基因的质粒 pCER204 (6.3kb) 和 pUC-2γ-β (5.9kb)。同时为了将来适于检测癌组织总 DNA 中癌基因扩增的需要, 所选用的目的基因 C-erbB-2/HER-2 原癌基因的扩增片段是一段与人表皮生长因子受体(EGFR)、大鼠表皮生长因子受体(neu)均不同源的区域^[6-9]。选用的另一目的基因 γ-IVS-II 是在邻近 γ 珠蛋白第二外显子的一段高度保守的插入序列, 以便作为将来单拷贝基因拷贝量扩增的标准, 同时也避免由于人珠蛋白多态现象所造成的干扰。采用一系列重量比滴度 PCR 扩增体系, 在同样的条件下做 20 次 PCR 循环。电泳后可检测到两个被测目的基因, 或同一目的基因因拷贝含量不同经 PCR 放大作用后的明显差异 (图 1 见图版 IV)。而且扩增前后两种

目的基因含量的比是正相关的。需要说明的是由于本文所选用的两个带有目的基因的质粒分子大小相近 (pCER204:pUC-2γ-β = 1.06:1), 所以本文以两种质粒的重量比代替了拷贝数量比。在实际应用中由于人细胞染色体总 DNA 中非扩增的单拷贝基因的拷贝量均是相同的, 经 PCR 扩增时只要所加各种引物量准确一致, 其实验结果是能够准确反映被测目的基因与单拷贝标准基因在拷贝数量上的差异。

实验表明, 在选择好相应引物的条件下, 可以对同一种组织总 DNA 中两个以上的目的基因同时扩增。在扩增体系中可选择任何一个在遗传结构上稳定的单拷贝基因作为参照基因, 以便检测其它被测目的基因在拷贝量上的变化^[10]。另外与其它检测基因扩增的方法相比, 此方法具有所需 DNA 样品量少、灵敏、不使用同位素、安全等优点。尤其对于为观察细胞株而制备的小量样品或石蜡包埋及福尔马林处理后的组织切片中某种基因的扩增更是一种行之有效的办法。它可做作为一种辅助诊断的手段推广到临床实验室使用。

参考文献

- 1 Zrene Garcia *et al.* *Cancer Research*, 1989, 49: 6675
- 2 Kentaro Semba *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 83: 6497
- 3 Joo-Bao Park *et al.* *Cancer Research*, 1989, 49: 6605
- 4 Gina Kolatl. *Science*, 1987, 235: 160
- 5 刘敬忠. 中国医学科学院报, 1988, 10: 411
- 6 Tadashi Yamamoto *et al.* *Nature*, 1986, 319: 230
- 7 Jerry L Slighon *et al.* *Cell*, 1980, 230: 1350
- 8 Saiki R K *et al.* *Science*, 1985, 230: 1350
- 9 Cornelia I Bargman *et al.* *Nature*, 1986, 319: 226
- 10 Roy A Frye *et al.* *Oncogene*, 1989, 4: 1153

[本文于 1990 年 2 月 13 日收到, 5 月 15 日修回]

(上接第 221 页)

所得到的几乎全部统计信息。特别适用于蓖麻毒蛋白这类中毒作用慢、毒性强的毒蛋白的急性毒性试验。

参考文献

- 1 徐叔云等. 药理实验方法学. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 400
- 2 Molinengo L. *J Pharm Pharmacol*, 1979, 31: 343
- 3 Beccari E. *Nature*, 1949; 163: 534

- 4 Meier J, Theakston RDC. *Toxicon*, 1986; 24: 395
- 5 Nicolson GL, Blaustein J. *BBA*, 1972; 266: 543
- 6 Lin JY *et al.* *Nature*, 1970; 227: 292
- 7 Olsnes S, Pihl A. *Biochemistry*, 1973; 12: 312
- 8 李士云, 王克夷. 生物化学与生物物理学报, 1981; 13: 545
- 9 喻梅辉等. 生物化学与生物物理进展, 1983; (4): 66
- 10 Lin JY, Lin SY. *Toxicon*, 1986; 24: 757
- 11 张振范等. 生物化学杂志, 1989; 5(6): 486
- 12 詹金彪. 实用肿瘤杂志, 1989; 4(1): 58

[本文于 1990 年 3 月 9 日收到, 5 月 31 日修回]

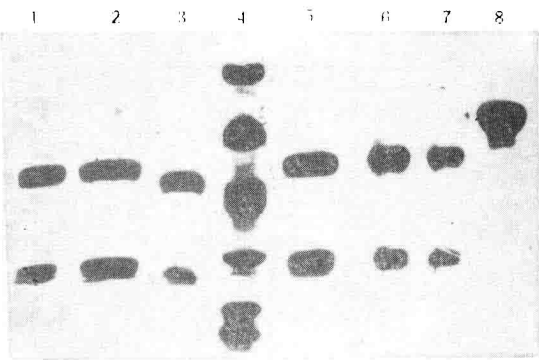


图 2 纯化 IgG 的 SDS-PAGE 图

1 羊抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取；2 羊抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，亲和层析法提取；3 兔抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取；4 标准蛋白，分子量由上至下依次按分子量大小的排列分别为 94000,67000,43000,30000,20000,14400；5 正常羊血清 IgG，辛酸法提取；6,7 驴抗兔抗血清 IgG，辛酸法提取；8 白蛋白

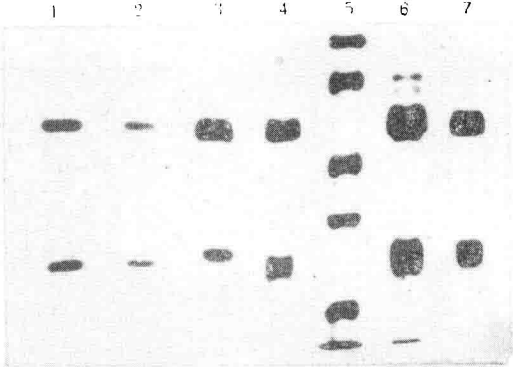


图 3 纯化 IgG 的 SDS-PAGE 图

1 正常小鼠血清 IgG，硫酸铵法提取；2 正常羊血清 IgG，硫酸铵法提取；3 正常羊血清 IgG，辛酸法提取；4 正常猪血清 IgG，辛酸法提取；5 标准蛋白(同图 2)；6 猪抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取(不纯)；7 猪抗人癌源铁蛋白抗血清 IgG，辛酸法提取(增加辛酸用量)

王 会等：“一种测定多个目的基因扩增的简易方法——差异 PCR 扩增法”一文的图 1

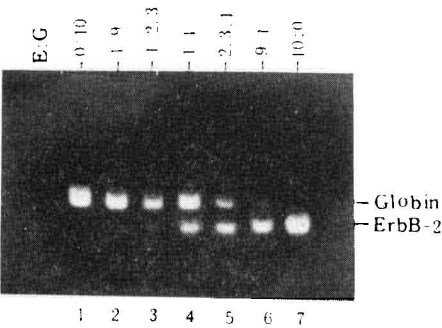


图 1 C-erbB-2/HER-2 和人类珠蛋白基因 γ -IVS-II 经 PCR 扩增后的聚丙烯酰胺凝胶电泳图上方所示为 PCR 扩增前两种带有目的基因质粒 pCER204 与 pUC-2 γ - β 的重量比(单位: ng)

李永兴等：“介绍一种新的半干式免疫转渍法”一文的图 1

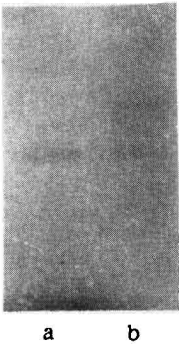


图 1 固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*) 粗提物的免疫转渍图

用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离粗提物,抗固氮酶铁蛋白为第一抗体
a. 加 NH_4^+ 前细胞粗提物
b. 加 NH_4^+ 后细胞粗提物