

不使用其它试剂,简单、快速、灵敏的优点.但也存在非特异性吸附和电位漂移的缺点.国内外已研制的几种免疫传感器^[2-6],在电极的制作上都采用液膜电极,用 Ag/AgCl 或甘汞电极做对照电极,用终点电位法进行测定,但不易克服上述缺点.我们用电化聚合和戊二醛交联的方法,将羊抗人 IgG 抗体固定在石墨电极表面,研制成固态活性膜直接 IgG 免疫传感器,并成功地应用该传感器对人血清 IgG 含量进行测定.同时还对传感器的测定、再生、保存条件、精密度、测定范围和选择性及与扩散法的相关性进行观察.在解决非特异性吸附和电位漂移的问题上,我们用速率测定法和使用与指示电极有相同膜的对照电极进行测定,使其达到了测定精密度和准确度的要求.实验结果表明,石墨活性膜 IgG 免疫传感器具有操作简单、快速、测定准确度和灵敏度高的特点,为

今后免疫传感器的研制提供了一种新的方法.

参 考 文 献

- 1 张先恩. 生物传感技术原理与应用. 长春: 吉林科学技术出版社, 1991: 2-3
- 2 Solsky R L, Rechnitz G A. Antibody-selective membrane electrode. *Science*, 1979; **204**: 1309
- 3 Aizawa M, Morioka A, Suzuki S *et al.* Amperometric determination of human chorionic gonadotropin by membrane-bound antibody. *Anal Biochem*, 1979; **94**: 22
- 4 Aizawa M, Morioka A, Suzuki S *et al.* An enzyme immunosensor for the electrochemical determination of the tumor antigen α -fetoprotein. *Anal chim Acta*, 1980; **115**: 61
- 5 Dian L B, Garry A, Rechnitz. Monoclonal antibody biosensor for antigen monitoring. *Anal Letters*, 1987; **20** (11): 1781
- 6 苏殿杰, 张黎亚, 王志玲. 聚苯乙烯活性膜免疫电极的研究. 生物化学与生物物理进展, 1985; (6): 33

PCR-特异探针杂交检测肿瘤组织 Ki-ras 基因点突变

范慕贞 许开明 曹淑兰 吴 翠

(中日友好临床医学所生化室, 北京 100029)

提 要

用福尔马林固定-石蜡包埋的人肿瘤组织切片, 经脱蜡处理直接用 PCR (polymerase chain reaction) 技术扩增 Ki-ras 癌基因序列中包括 12, 13 位密码子的 DNA 片段, 并分别以 5 种含特异突变点的寡核苷酸探针代替 3' 端引物, 经 PCR 扩增的产物作为点突变的阳性对照. 用上述五种探针进行选择性地杂交, 检测了人肺癌及结直肠癌组织的 Ki-ras 基因 12 及 13 位点突变. 为了封闭杂交时的非特异结合, 采用野生型冷探针与标记的含突变点的探针同时进行杂交的方法, 有效地消除了杂交过程中可能产生的假阳性, 而不影响真阳性反应的出现. 因而增加了检测的可靠性.

关键词 PCR, DNA 杂交, Ki-ras, 点突变

人类肿瘤中最常见的与转化活性有关的基因有 ras 家族癌基因 (c-Ha-ras, c-Ki-ras 及 c-N-ras 基因). 其蛋白产物定位于细胞膜内表

面, 能与 GTP 结合, 具有 GTP 酶活性, 有生

长信息传递的功能。ras 基因的激活在肿瘤发生中起着重要的作用。在多种人类肿瘤中 ras 基因的激活是由于 ras 基因发生点突变。基因转染技术的应用发现 ras 基因点突变多数发生在 12, 13 及 61 位密码的碱基替代, 从而使 ras 蛋白 (P21) 具有转化活性^[1,2]。随着特异 DNA 扩增技术——PCR 的发展和应用, 结合其他有关基因检测技术使点突变的检测更加灵敏和简便, 分析微量组织或细胞的非纯化 DNA 成为可能, 为基因分析的临床应用提供了有用手段。已有研究资料报道人肺癌^[3]、结肠癌^[4]及胰腺癌^[5]中发现有 Ki-ras 点突变。这种点突变可能与致癌物的作用有关。本文用福尔马林固定-石蜡包埋或新鲜冰冻的人肺癌组织切片的 DNA, 经 PCR 后与合成的含特异突变点的寡聚核苷酸探针选择性杂交检测了 Ki-ras 基因 12 及 13 位密码子点突变。用封闭野生型等位基因的方法及以含不同突变点的 PCR 扩增产物作为阳性对照, 提高了点突变检测的可靠性。并用此

法检测了人结肠癌组织 Ki-ras 点突变以作验证。

1 材料及方法

1.1 肿瘤标本

人肺癌及结直肠癌标本的石蜡切片 (6—10 μ m) 经二甲苯、酒精常规脱蜡处理, 100℃煮 10min 后直接用于 PCR 扩增。冰冻肿瘤组织 DNA 提取按参考文献 [6] 方法。

1.2 引物及探针

引物及探针用 DNA 合成仪 (Model 380B, Applied Biosystems) 合成。并经高效液相层析法纯化。两个引物由 20 个核苷酸组成, 分别与 Ki-ras 非编码链及编码链一定序列互补。引物 A 序列为 5' GACTGAATATAAACTTGTG-G3'、引物 B 序列为 5' CTCTATTGTTG-GATCATATT3'。扩增序列含有 12、13 位密码子的 109bp 片段。所用探针序列见表 1。

表 1 检测 c-Ki-ras 12, 13 位点突变用探针

探 针	序 列	12 或 13 位密码
P ₁	5' CCTAGGCCACCAGCTCCAAC 3'	GGT ₁₂ /Gly
P ₂	5' CCTAGGCCACAAGCTCCAAC 3'	TGT ₁₂ /Cys
P ₃	5' CCTAGGCCATCAGCTCCAAC 3'	GAT ₁₂ /Asp
P ₄	5' CCTAGGCCAACAGCTCCAAC 3'	GTT ₁₂ /Val
P ₅	5' CCTAGGCAAACAGCTCCAAC 3'	TGC ₁₃ /Cys
P ₆	5' CCTAGGCTAACAGCTCCAAC 3'	AGC ₁₃ /Ser

1.3 PCR

参照 Smit 等人方法^[7]作了修改。PCR 反应混合物包括模板 DNA (1 μ g DNA 或 6—10 μ m 石蜡切片所含 DNA), 67mmol/L Tris-HCl (pH8.8), 6.7mmol/L MgCl₂, 16.7mmol/L (NH₄)₂SO₄, 10mmol/L 巯基乙醇, 0.017%牛血清白蛋白 (BSA), 6.7 μ mol/L EDTA, 40 μ l/ml 二甲基亚砜, 引物各 50pmol, dNTPs 各 200 μ mol/L, 3U Taq DNA 聚合酶 (华美公司)。最终反应体积 100 μ l。反应经变性 (94℃, 30s) 退火 (50℃, 1min)、延伸 (70℃,

1.5min) 35 次循环。当用 DNA 时, 第一次变性条件为 97℃, 7min。用石蜡切片时, 为 100℃, 10min。10 μ l PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检查扩增带。

以野生型或特异突变型探针代替 3' 端引物、用人胚肺 DNA 作模板进行 PCR 扩增的产物作为杂交分析的阳性对照。其开始 5 个循环中在 45℃退火, 以保证有一碱基不匹配的引物能进行退火。

1.4 探针标记

10pmol 探针 DNA 在 20 μ l 标记缓冲液

(50mmol/L Tris-HCl (pH7.6), 10mmol/L $MgCl_2$, 5mmol/L 二硫苏糖醇 (DTT), 0.1mmol/L 精脒, 0.1mmol/L EDTA (pH8.0), 10pmol γ - ^{32}P -ATP (50 μ Ci), 10UT4 激酶) 中于 37℃ 标记 2h, 70℃ 处理 10min 后备用。

1.5 点杂交分析

20 μ l DNA (PCR 扩增产物) 经 0.4 mmol/L NaOH/1.5mol/L NaCl 变性液处理 5min. 用点膜器 (Bio-dot, Apparatus, Bio-Rad. USA) 点膜. 100 μ l 2 $\times$ SSPE (20 $\times$ SSPE 含 3.6mol/L NaCl, 10mmol/L NaH_2PO_4 ,

20mmol/L Na_2 EDTA, pH7.4) 抽洗一次. 将膜置 80℃ 真空烤箱烤 2h 后, 在 63℃ 于预杂交液 [50mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 2 μ mol/L EDTA, 100 μ g/ml 变性鲑精 DNA, 0.1% SDS, 5 $\times$ Denharat's] 中预杂交 1h, 加入 10—15pmol 的标记探针杂交 3h, 用 2 $\times$ SSPE/0.1%SDS 在室温漂洗二次, 再以 5 $\times$ SSPE/0.1%SDS 64℃ 洗 40min, 置 X 光片于 -80℃ 曝光过夜. 为了消除杂交时的非特异结合, 加标记特异突变探针的同时加入非标记的野生型探针 (3 $\times$ 标记探针量)。

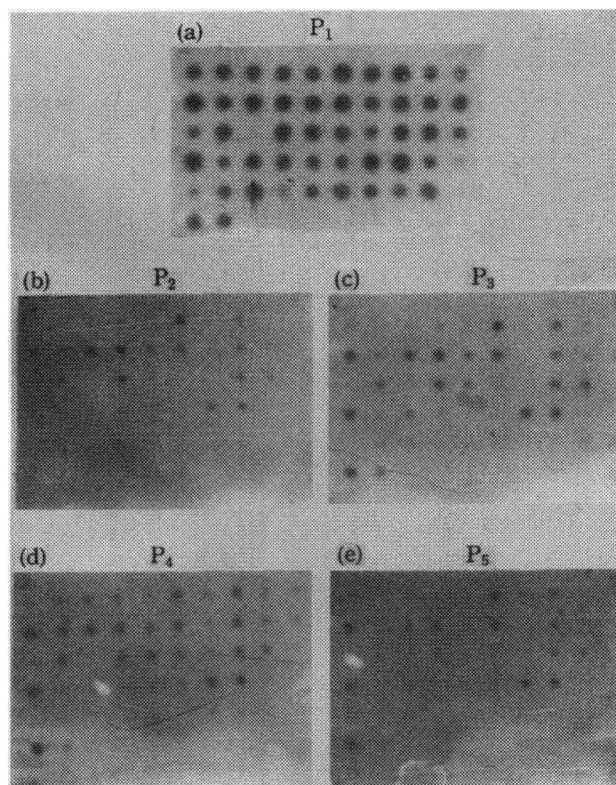


图 1 Ki-ras 基因 12 及 13 位密码子点突变检测

与 ^{32}P -标记的: (a)野生型序列(GGT₁₂); (b)点突变序列(TGT₁₂); (c)点突变序列(GAT₁₂); (d)点突变序列(GTT₁₂); (e)点突变序列(TGC₁₃)探针杂交

2 结 果

2.1 从 50 例肺癌 Ki-ras 点突变检测中发现的问题

50 例人肺癌标本经 PCR 方法扩增含 Ki-ras12, 13 位密码子序列片段. 用野生型探针及 5 种不同特异突变探针 (表 1) 进行斑点杂交. 图 1a 显示 50 例标本中几乎均有正常等位基因

的检出。图 1b, c, d, e 分别为与 P_2-P_5 探针杂交图。(P_6 杂交图未列出)。各斑点图谱基本相似。另外 16 例肺癌组织提取的 DNA 经 PCR 扩增后用不同特异探针杂交亦得到上述同样现象 (结果未显示)。

2. 2 野生型探针对非特异结合的封闭作用

上述结果提出一个问题: 不同特异突变探针的杂交图谱为什么不特异? 为了弄清非特异杂交是否由于特异突变探针与野生型序列的非特异结合, 用 70 例人肺癌 PCR 扩增 DNA 点膜, 并以 PCR 扩增的含突变序列作为阳性对照 (图 2a, P_1-P_6)。当用 $1\times P_1$ 加标记的 P_4 杂交时除了出现 P_4 杂交点外, 还有 P_1 杂交信号及许多标本斑点 (图 2b)。 $2\times P_1$ 加标记的 P_4 杂交时则只有 P_4 阳性对照出现信号。 P_1 信号被封闭 (图 2c)。如标记的 P_2, P_3, P_5 及 P_6 分别与膜杂交时用 $2\times P_1$ 封闭, 则分别出现 P_2, P_3, P_5 或 P_6 的信号 (结果未显示)。又如在用标记的 P_2 杂交时即使用 $5\times P_1$ (图 3a) 或 $5\times P_1$ 加 $5\times P_3$ (图 3b) 或 $20\times P_1$ 封闭, 亦不会影响 P_2 信号的出现 (结果未显示)。用上述野生型探针封闭非特异结合的方法在被检的 70 例人肺癌标本中未测出与 P_2, P_3, P_4, P_5 及 P_6 相应的点突变。

2. 3 对封闭非特异结合杂交法的进一步检验

为了验证封闭非特异结合杂交法不影响真正阳性信号的出现, 上述人肺癌组织未能检出已检测的几种突变序列不是因为封闭非特异信号所引起的假象, 本文又对 40 例人结直肠癌石蜡切片 DNA 的 PCR 产物进行了斑点杂交分析。在 $3\times P_1$ 封闭的条件下, 分别与标记的 P_2, P_3, P_4, P_5 及 P_6 杂交。除各自出现相应的阳性对照斑点外, 检测出 P_2 (3 例)、 P_3 (4 例) 及 P_4 (2 例) 点突变, 如图 4 所示。a. 与标记的 P_1 杂交。b. 与标记的 P_3 杂交, 未用 P_1 封闭, 出现 P_1 的阳性对照点及许多非特异杂交点。c. 与标记的 P_3 杂交的同时用 P_1 封闭, 未见 P_1 的阳性对照点, 除有 P_3 阳性对照点外, 还检出 4 例 P_3 点突变。d. 与标记 P_2 杂交同时用 $3\times P_1$

封闭, 除有 P_2 阳性对照点外, 检出了 3 例 P_2 点突变。e. 与标记的 P_4 及 $3\times P_1$ 杂交, 除 P_4 阳性对照点外, 有 2 例点突变被检出。f. 当用 $3\times P_4$ 及 $3\times P_1$ 同时封闭时与标记的 P_4 杂交就没有 P_1 及 P_4 信号出现, 说明 P_1 及 P_4 同时被封闭。

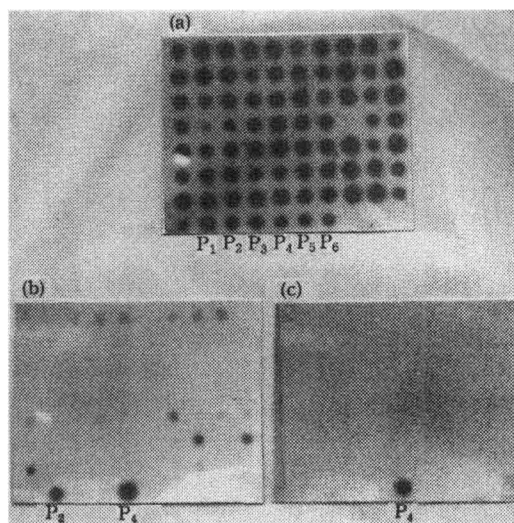


图 2 用非标记的野生型探针封闭条件下的点杂交
a) 探针 P_1^* (b) 探针 $P_4^* + 1\times$ 探针 P_1 (c) 探针 $P_4^* + 2\times$ 探针 P_1 (^{32}P 标记)

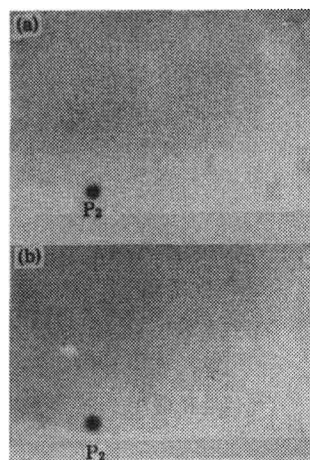


图 3 用非标记的野生型探针封闭条件下
与 ^{32}P 标记探针 P_2 (TGT_2) 杂交
(a) $P_2^* + 5\times P_1$ (b) $P_2^* + 5\times P_1 + 5\times P_3$
(^{32}P 标记)

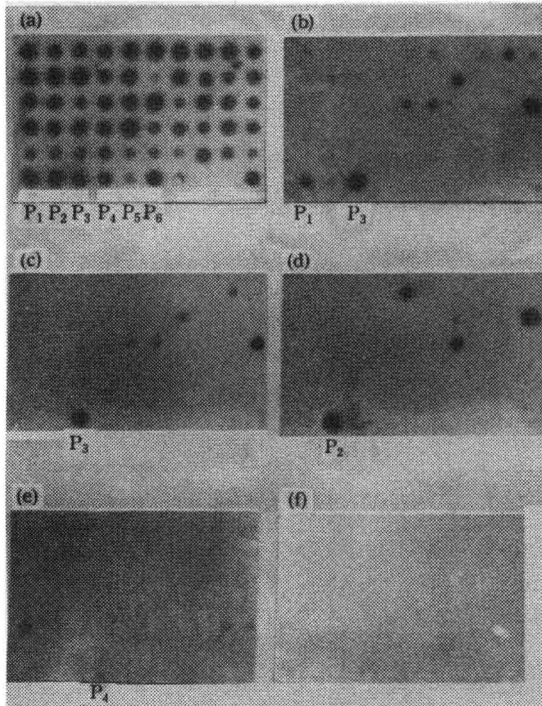


图 4 人结直肠癌组织标本 Ki-ras 基因 12 位密码子点突变检测

(a) P_1^* (b) P_2^* (c) $P_3^* + 3 \times P_1$ (d) $P_2^* + 3 \times P_1$
(e) $P_4^* + 3 \times P_1$ (f) $P_4^* + 3 \times P_1 + 3 \times P_4$ (* ^{32}P 标记)

3 讨 论

经 PCR 扩增靶 DNA 后用特异性寡核苷酸探针选择性杂交检测 Ki-ras 基因点突变是一种既灵敏又简便的方法。虽然已有人用于人肺癌^[3]、结直肠癌^[4]、及胰腺癌^[5] Ki-ras 点突变的检测,但没有对杂交中非特异反应加以考虑。因而背景不干净^[5]。本文用此法检测肺癌 Ki-ras 点突变过程中发现不同特异点突变探针对于被检标本 DNA 的杂交没有特异性。即使在严格控制杂交及洗膜条件仍然不能避免有非特异的结合,致使不同点突变探针进行杂交的图谱几乎没有差别(图 1b, c, d, e)。虽然也曾采用含 3mol/L 的四甲基氯化铵杂交液,以增加序列完全匹配的杂交及洗膜温度与有一碱基不匹配的杂交及洗膜温度间的差别^[8],但仍然不能解决上述问题(结果未显示)。在胰腺癌 Ki-ras 点突变的检测中有人报导 37 例癌组织中有 8 例检测出 2 个以上点突变^[7]。由于未考虑消

除非特异性结合,就不能排除同一标本中这种多个点突变的检出有假阳性出现的可能性。为此,我们在用特异探针杂交的同时加入野生型探针,以封闭非特异结合,并以 PCR 扩增含有相应点突变的序列作为阳性对照。我们的结果表明相当于标记的特异探针 2 倍量的野生型探针即可达到封闭的目的。而且 20 倍量的野生型探针仍然不会影响阳性信号的出现,说明这种封闭的方法是克服非特异结合有效的可靠方法。用这种方法检测 70 例人肺癌标本的 Ki-ras 12, 13 位密码子的 5 种点突变,未见一例有这几种点突变被检出。但文献报导人肺腺癌 Ki-ras 点突变检测结果 12 位密码子的三种点突变率(Cys, Asp 及 Val)为 25%左右,其突变率与肿瘤形态、分化程度、存活率均无明显相关^[9,10]。为了进一步检验封闭非特异结合方法不致引起假阴性,用此法对 40 例人结直肠癌标本的上述 5 种点突变进行了检测。进一步证明了封闭方法不影响点突变的检出。文献报导结直肠癌 Ki-ras 12 位密码子的三种点突变率为 25%^[4],比我们的结果(18%)稍高,其原因之一可能与文献^[4]的检测中未用阳性对照及封闭非特异结合的方法,其假阳性不能被排除有关。

参 考 文 献

- 1 Barbacid M. ras Genes. *Ann Rev Biochem*, 1987; **56**: 779
- 2 Capon D J, Seeburg P H, McGrath J P *et al*. Activation of Ki-ras-2 gene in human colon and lung carcinomas by two different point mutations. *Nature*, 1983; **304**: 507
- 3 Rodenhuis S, Slebos R J C, Boot A J M *et al*. Incidence and possible clinical significance of Ki-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human lung. *Cancer Res*, 1988; **48**: 5738
- 4 Vogelstein B, Fearon E R, Hamilton S R *et al*. Genetic alterations during colorectal tumor development, *New Engl J Med*, 1988; **319**: 525
- 5 Grunewald K, Lyons J, Frohlich A *et al*. High frequency of Ki-ras codon 12 mutation in pancreatic adenocarcinomas, *Int J Cancer*, 1989; **43**: 1037
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular cloning*, Second edition, New York: Cold Spring Harbor laboratory

- Press, 1989; 9, 14
- 7 Smit V T H B M, Boot A J M, Smits A M M *et al.*, Ki-ras codon 12 mutation occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas *Nucl Acids Res*, 1988; **16**: 7773
 - 8 Melchior W B, Von Hippel P H. Alteration of the relative stability of dA, dT and dG, dC base pairs in DNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1973; **70**: 298
 - 9 Rodenhuis S, Slebos B J C, Boot A J M *et al.* Incidence and possible clinical significance of Ki-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the Human Lung, *Cancer Res*, 1988; **48**: 5738
 - 10 Rodenhuis S, Vande Wetering M L, Mooi W J *et al.* Mutational activation of the Ki-ras oncogene, a possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung, *New Engl J Med*, 1987; **317**: 929

固相时间分辨荧光免疫螯合剂 BCPDA 的 制备及其标记技术*

韩 玲 陈 杞

(第二军医大学基础同位素室, 上海 200433)

提 要

报道了固相时间分辨荧光免疫螯合剂 4, 7-二氯磺基苯-1, 10-菲罗啉-2, 9-二羧酸 (BCPDA) 的制备方法, BCPDA 标记蛋白质及螯合 Eu^{3+} 方法, BCPDA- Eu^{3+} 标记物荧光光谱研究以及固相时间分辨荧光免疫分析法检测甲胎蛋白异质体 (AFP-R-LCA) 方法的建立. 结果表明 BCPDA 能在温和条件下与蛋白质氨基结合并与 Eu^{3+} 螯合, BCPDA- Eu^{3+} 蛋白质标记物荧光特性、标记比度、生物结合活性与国外同类产品一致, 所建立的检测 AFP-R-LCA 免疫分析法最小检测值 0. 6ng/ml, 为提高我国非放射性同位素标记技术水平奠定了基础.

关键词 时间分辨荧光免疫分析, 辅, 亲和素, BCPDA, 固相

时间分辨荧光免疫分析技术 (TRFIA) 是 80 年代初发展起来的一项新型非放射性超微量免疫分析技术^[1,2], 它既具有 RIA 的高度灵敏性, 又具有酶免疫分析法 (EIA) 的操作简便、快速、易自动化等特点, 并克服了 RIA, EIA, 发光免疫分析等方法的固有缺点, 可用于免疫分析、核酸分析及受体分析等分子生物学领域. 固相 TRFIA 是最新一代的 TRFIA 方法^[3], 它以国外最新合成的 Eu^{3+} 螯合剂 4, 7-二氯磺基苯-1, 10-菲罗啉-2, 9-二羧酸 (BCPDA) 为螯合剂, 引入了生物素-亲和素系统, 克服了原来液相 TRFIA 需增强溶液、易受环境 Eu^{3+} 污染、

只能液相测量等缺点, 简化了测量步骤, 提高了测量灵敏度. 固相 TRFIA 的关键是选择合适的螯合剂, 制备高比度、高生物活性的蛋白质标记物. 有关这方面的工作国内尚未见报道. 我们参考 Evangelista 等方法^[4], 制备了 BCPDA, 并用 BCPDA 标记亲和素 (Avidin, Av) 及链霉亲和素 (Streptavidin, SA), 并探讨了 BCPDA 标记蛋白质及螯合 Eu^{3+} 的各种条件, 建立了固相 TRFIA 双位点夹心法检测甲胎蛋白异质体 (AFP-R-LCA) 方法.

* 本文为国家自然科学基金支持的课题.

收稿日期: 1992-02-09 修回日期: 1992-05-10