

有与其相应正常单链完全分开。其实,能保证其中一条突变带与两条正常单链带互相获得良好分离,就已十分理想了。

如果正常样品中两条单链带强度差不多,则出现的两条突变带强度也大体相等;如只出现一条明显突变带,则其强度与其相应正常单链带强度之和必然等于另外一条单链带强度。如只有一条异常带,它与任何一条单链带之强度和都与另一条正常单链带强度相差过大,则十有八九不是所希望的突变带。

对遗传病来说,如系杂合子型,则突变带强度与其相应正常单链带大体相等;如系纯合子,则原正常单链带之一或全部消失,另出现一条或两条突变带。

如果曝光时间长,每个样品都有此带,曝光时间短就都没有或有的有,有的不明显,此类区带多为非特异性扩增带,不是突变带。

一般认为,如没有污染,PCR-SSCP 分析不存在假阳性结果,但可能出现假阴性结果。后者是由于点突变引起的空间构象变化甚微,迁移率相差无几所致,尤其是点突变发生在扩增片段的两端时。我们认为,有阳性和阴性对照,结果可以重复的,所确定的突变带是可信的;如果没有相应的阳性对照,应经测序来确定其是否为突变带。对阴性结果,适当改变电泳条件,

或试用变性剂梯度凝胶电泳,可以提高突变种类的检出率。

以上是我们的点滴体会,希望能对从事这方面工作的研究者有所帮助。不当之处,欢迎指正。

The Practice of PCR-SSCP Analysis. Cai Huiguo, Chen Peizhen, Zhang Lidong, Peng Qiong¹⁾, Ji Xinjun²⁾, Ma Shuang (*Institute of Hematology, Chinese Academy of Medical Sciences, Tianjin 300020, China*; ¹⁾General Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China; ²⁾ Guang anmen Hospital, Chinese Academy of Traditional Medical Sciences, Beijing 100053, China).

Abstract Lessons and experiences are summarized in the PCR-SSCP analysis, an improved electrophoretic PCR-SSCP analysis suitable to general laboratory is introduced. And how to design primers, to choose PCR conditions and analysis of the experimental results are discussed.

Key words polymerase chain reaction (PCR), single-strand conformation polymorphism (SSCP)

PCR-SSCP 检测肺癌细胞 p53 基因点突变*

毕向军¹⁾ 彭朝晖 李金翰²⁾ 杨光彩 徐湘民 王 红³⁾

(第一军医大学分子生物学研究所, 广州 510515)

摘要 应用溴化乙锭 (EB) 染色的 PCR-SSCP 技术对 10 例非小细胞性肺癌组织标本 p53 基因外显子 5~8 进行分析, 其中 1 例在外显子 5~6; 1 例在外显子 7; 2 例在外显子 8 发现异常电泳带。对 1 例经 SSCP 检测异常的 p53 基因进行核酸序列分析, 发现第 280 位密码子由 AGA 变成 ACA, 其编码的氨基酸由丝氨酸变成半胱氨酸。结果证实: 非小细胞性肺癌与 p53 基因突变有关; EB 法 PCR-SSCP 技术是一种简便、可靠的点突变检测法。

关键词 溴化乙锭, 聚合酶链反应-单链构象多态性, 基因点突变, p53 基因

* 广东省基金资助项目。 ¹⁾ 广东惠州 173 医院, 惠州 516001; ²⁾ 南方医院肿瘤科; ³⁾ 第一军医大学流行病教研室。

收稿日期: 1994-09-07, 修回日期: 1994-12-20

p53 基因是一种肿瘤抑制基因, 位于 17 号染色体短臂上^[1], 由 11 个外显子组成, 长约 20 kb, 其编码的蛋白分子量约 53 000. 野生型 p53 基因在肿瘤发生中往往发生点突变, 且绝大多数点突变发生在编码氨基酸残基 130~290 位的密码子上, 特别是 II、III、IV、V 四个进化保守区. 野生型 p53 基因突变后失去抗癌基因的功能, 而且能促使细胞向恶性方向发展^[2,3].

聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 是近年来发展起来的一种用以检测点突变的新技术, 它是利用扩增片段变性后在中性聚丙烯酰胺凝胶中单链 DNA 电泳行为的异常判断点突变是否产生^[4].

本文应用 EB 染色的 PCR-SSCP 技术和核酸序列分析技术对 10 例非小细胞性肺癌的 p53 基因进行检测, 旨在探讨我国华南地区非小细胞性肺癌与其 p53 基因突变的关系及其在临床的应用前景.

1 材料与方法

1.1 标本

所用组织标本来源于南方医院肺癌手术病人 (均来自广东和湖南), 经病理科诊断证实. 每例均取了正常肺组织和癌组织.

1.2 引物

P₁ TTCCTCTTCCTACAGAACTC, P₂ AGTTGCAAACCAGACCTCAG, P₃ CTTGC-CACAGGTCTCCCCAA, P₄ ATCTGAGGCA-TAACTGCACC, P₅ TTCCTTACTGCCTCT-TGCTT, P₆ AGGCATAACTGCACCCTTGG, 其中 P₁ 和 P₂ 扩增外显子 5~6, 片段长为 407 bp; P₃ 和 P₄ 扩增外显子 7~8, 片段长度为 706 bp; P₅ 和 P₆ 扩增外显子 8, 片段长度为 236 bp.

1.3 DNA 提取

参照吴小兵^[5]的方法快速提取组织 DNA.

1.4 PCR 扩增

反应总体积为 50 μ l, 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 循环 30~35 个周期. 将扩增产物经中性聚丙烯酰胺凝胶电泳检

测其特异性.

1.5 SSCP 分析^[6]

配制 6% 的中性聚丙烯酰胺凝胶交联度为 49:1, 含 5% 甘油, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE (三羟甲基氨基甲烷-硼酸-乙二胺四乙酸二钠), 制好胶后加 10 $\times$ 碱变性液 (NaOH 0.5 mol/L, EDTA 10 mmol/L), 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴, 迅速加样, 300 V 电压电泳, 室温 3~5 h 后取下凝胶放入 0.5 mg/L 的 EB 溶液中浸泡 15 min, 紫外灯下观察.

1.6 核酸序列分析

将所测片段克隆到 pUc19 中, 然后采用双脱氧末端终止法测序^[7].

2 结 果

2.1 PCR-SSCP

10 例肺癌标本经 SSCP 分析, 4 例发现点突变, 结果见图 1~3.

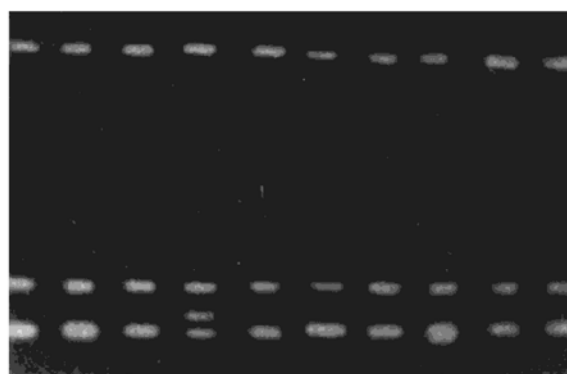


图 1 p53 基因外显子 5~6 SSCP 分析图谱
片段长 407 bp, 第四道出现电泳异常带.



图 2 p53 基因外显子 7 SSCP 分析图谱
片段长 288 bp (将外显子 7~8 扩增片段用 Hinf I 酶切后), 第二道出现电泳异常条带.

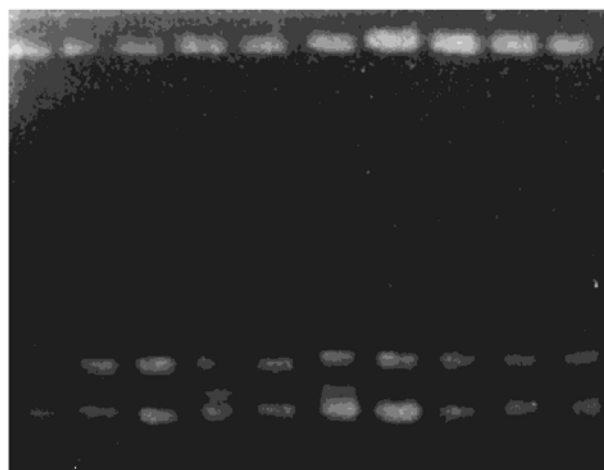


图3 p53基因外显子8 SSCP分析图谱
片段长238 bp, 第四、六泳道出现异常条带。

p53基因突变情况与肺癌组织学类型的分析: 10例肺癌中有7例鳞癌, 3例腺癌, 鳞癌3例发生突变, 突变率为42.8%, 腺癌1例发现突变, 突变率为33.3%。两者突变率无显著差异 ($P>0.05$)。按肿瘤细胞分化程度: 中分化癌7例, 3例发现点突变, 低分化癌3例, 1例发现点突变, 两者突变率无显著差异。患者吸烟指数在600以上(3例)的p53基因发现突变2例, 600以下(7例)p53基因突变2例。

2.2 核酸序列分析

取经SSCP检测的第四号标本进行核酸序

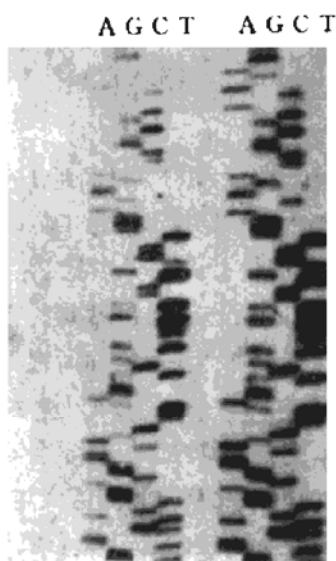


图4 p53基因外显子8序列分析
左为正常序列; 右为第280位发生
突变, 由AGA→ACA。

列分析, 发现第280位密码子由AGA突变成ACA, 其所编码的氨基酸残基也由丝氨酸变为半胱氨酸。

3 讨 论

野生型p53基因现已明确地被认为是一个抑癌基因, 能抑制细胞的生长和分化, 防止细胞向恶性转化。突变型p53基因不但丧失了抗癌功能, 而且还具有癌基因的功能, 促使细胞向恶性转化。p53基因突变与多种肿瘤有关, 但在不同类型的肿瘤^[8]或同种肿瘤因不同人种和地域其突变可能有差异^[9,10], 我们通过对p53基因的检测发现华南地区非小细胞性肺癌的发生与p53基因突变有密切关系, 但在不同组织学分类, 不同分化程度的非小细胞性肺癌p53基因突变率无显著差异。

单链构象多态性(SSCP)分析技术是一种广泛应用于检测点突变的新技术, 具有快速、简便、可靠的特点, 还可排除正常组织的污染的影响而较容易地发现点突变, 但PCR-SSCP技术存在一定的假阴性结果, 可能与其突变的位点、方式及目的片段的长度有关。

据报道SSCP技术大多采用同位素, 应用非同位素是其发展的一个方向。EB染色具有简便、省时、省费用, 但它对实验的要求较高, 变性及加样量要求高, Yap采用碱变性法, 本实验综合碱变性和热变性, 电泳缓冲液预冷, 可以防止DNA复性, 经这些步骤后双链条带很弱, 有的基本消失。SSCP技术能检出基因点突变, 但不能表明具体是何种突变, 可为序列分析做筛选工作, 在临床和实验室均有较广阔的应用前景。本实验的核酸序列分析证实了SSCP的可靠性。

参 考 文 献

- 1 Lamb P, Cranford V. *Somatic Cell Mol Genet*, 1985; 11: 505
- 2 Peter L, Lionbl C. *Mol Cell Bio*, 1991; 351: 453
- 3 Arnold J, Jamil M, Cathy A *et al.* *Nature*, 1991; 351: 453
- 4 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T *et al.* *Genomics*, 1989; 5:

874

- 5 吴小兵, 彭朝晖, 徐 铃. 第一军医大学学报, 1992; 12: 289
- 6 Yap E P H, Megee J O. Trends in Genet, 1992; 8: 49
- 7 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* Molecular cloning, 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; 13. 3
- 8 Nigro J M, Baker S J, Hostetter R *et al.* Cancer Res, 1993; 52 (20): 4817
- 9 Kondo K, Umemoto A, Akimoto S *et al.* Biochem Biophys Res Commu, 1992; 183: 1139
- 10 Taylor J A, Watson M A, Deverux T R *et al.* Lancet, 1994; 343 (8889): 86

Detection of the Point Mutation of p53 Gene in Non Small Cell Lung Cancer by Polymerase Chain Reaction-Single Strain Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). Bi Xiangjun¹⁾, Peng Zhaohui, Li Jinhan²⁾, Yang Guangcai, Xu Xiangmin, Wang Hong³⁾ (*Institute of Molecular Biology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ¹⁾The Second Medical Department of 173 Hospital,*

Huizhou 516001, China; ²⁾Oncologic Department of Nanfang Hospital, Guangzhou 510515, China; ³⁾Department of Epidemiology, The First Military Medical University, Guangzhou 510515, China).

Abstract Exon 5~8 of p53 gene in 10 cases of non small cell lung cancer (NSCLC) tissues and normal lung tissues were examined by nonisotopic polymerase chain reaction-single strain conformation polymorphism (PCR-SSCP). It showed that there was point mutation in 4 cases of cancer tissues. The mutant points were 1 in exon 5~6, 1 in exon 7, 2 in exon 8 respectively. Otherwise, no point mutation was observed in normal lung tissues. Mutant p53 gene determined by PCR-SSCP was sequenced and found that codon ACA 280 instead of AGA 280, that is, cysteine instead of serine.

Key words PCR-SSCP, gene point mutation, p53 gene, ethidium bromide (EB)

会 讯

第六次全国离心机学术会议征文通知

我会计划 1996 年秋在华北地区召开第六次全国离心机学术会议。凡在生物学、医学、农林水产、化学化工等领域, 有关离心分离技术, 用离心力场的实验研究方法, 超高速旋转机械等方面的研究论文 (含工程学、标准化和管理科学等方面), 未公开发表或没有在学术会上交流过的, 均属征集范围。请把论文全文 (5000 字以内、计算机打印稿) 及录入论文的软盘, 于 1996 年 5 月 30 日前邮到本会, 请统一使用 Microsoft Word for Windows 中文版编辑, 纸张设为 18.0 cm × 25.7 cm (即 B5 纸), 页边距: 上 2.54 cm, 下 2.54 cm, 左 1.25 cm, 右 3.67 cm, 字体设为五号宋体, 以便于汇总 (若有困难, 可使用 WPS, 设为 B5 纸、标准 5 号

宋体字、左边界 9、右边界 81、行间距 16)。35 岁以下论文作者免收注册费和会务费, 此年龄段的作者请在论文末注明年龄。信封上请注明“征文”字样, 软盘上注明文件名。凡非论文作者愿出席此次会议者, 请于 1996 年 7 月 31 日前与我会联系, 届时根据情况酌情安排。

中国仪器仪表学会实验室仪器学会离心机专业委员会。地址: 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号 中国科学院生物物理所高技术部转离心机专业委员会。电话: (010) 2020077-561; 电报挂号: 北京 2028; 传真: 2027837。