

经验交流

PCR-SSCP 分析实践*

蔡辉国 陈佩贞 张立冬 彭琼¹⁾ 纪新军²⁾ 马双

(中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020)

摘要 介绍了一种在一般实验室都能使用的适用于 SSCP 分析电泳的改良方法, 并对如何设计引物、选择 PCR 条件和分析结果进行了讨论。

关键词 聚合酶链反应, 单链 DNA 构象多态性, 引物设计

在聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 中, 带电质点迁移率与其电荷、分子量和分子形状密切相关。单链 DNA 有一定的空间构象, 发生点突变时, DNA 长度 (相当于电荷和分子量) 不变, 但其空间构象发生了相应改变。因此, 在 PAGE 中, 迁移率就会出现差异而得到分离。聚合酶链反应 (PCR) 能在短时间内把目的基因片段扩增数百万倍。把两者结合起来, PCR-SSCP (单链 DNA 构象多态性) 分析具有需要样品量少, 操作简便, 费时较少, 具有相当高的灵敏度。它可以检测点突变, 也能检出插入或缺失突变, 适合于众多样品的筛选。在癌组织中混有大量正常组织情况下, 可以根据异常区带的出现而得以检出。把异常区带从凝胶中溶出后作为模板, 再次进行 PCR 扩增, 可进行直接测序或残留癌细胞的定量分析。目前, PCR-SSCP 分析已被广泛应用于癌基因、抑癌基因突变的鉴定, 遗传病致病基因分析和基因诊断等领域。

我们应用 PCR-SSCP 分析技术在检测 Ras、p53 基因点突变和 β -珠蛋白基因多态性方面作了一些工作, 把三年来的教训和经验小结于此, 对新从事这方面工作的人或许有所帮助。

1 引物设计

设计不良的引物会给 PCR-SSCP 分析增加许多麻烦, 造成人力、物力和时间上的浪费。

引物设计的主要要求是: a. 引物长度以 20~30 聚核苷酸为宜; b. 上、下游引物之间不能有互补序列; c. 每一引物本身不存在回文序列; d. 引物中 G+C 比例应达 50%~60%。

在设计引物时还要考虑下述两点。首先, 认真比较引物和待扩增片段序列, 务必使引物序列与扩增片段中间区域的互补率降到最低。在工作中, 我们曾有时发现扩增产物不止一个, 研究扩增片段序列后发现, 其中两段序列与引物互补率达 50%~70%, 这是形成多个扩增产物的主要原因。其次, 要注意所研究的目的基因在基因组 DNA 中是否有高度同源序列。比如, Ras 基因家族中, N-ras、K-ras、H-ras、V-K-ras 和 V-H-ras 基因间有相当高的同源序列, 有的区段, 其同源性可达 80% 以上。在我们看过的文献中, 有一篇报道白血病患者 N-ras 基因 12/13 位突变率达 56%。如再加上 61 位突变率, 总突变率可达 70% 以上。结果是否真实? 当然, 有可能确实这么高, 但更有可能是由于引物与 K-ras、H-ras 等基因的相应序列有相当高的同源性, 在 PCR 时, 后者也被不同程度地扩增。我们曾观察到, 在使用设计不良引物扩

* 国家自然科学基金和国家教委博士点基金共同资助。

¹⁾ 天津医科大学总医院。

²⁾ 中国中医研究院广安门医院。

收稿日期: 1994-09-26, 修回日期: 1994-11-09

增 N-ras 基因片段时,模板量多、曝光时间长,几乎全部样品在正常单链带附近都出现一条弱带;如减少模板量和曝光时间,此带就看不见了;如果样品间模板量相差过大,就可能有的出现此带,有的无此带,造成假象.因此在设计引物时,需要查阅同一家族中其它基因的相应序列,使选择的引物与后者相应序列的差异越大越好,互补性越低越好.

在实验中出现这两方面原因造成的问题时,只能采取提高退火温度,减少退火时间等措施,以提高扩增的特异性.而能采用的退火温度的上限与引物序列中 G+C 比例相关.这就要求在设计引物时,适当增加 G+C 比例,延长引物长度,以便能采用较高退火温度,减少非特异性扩增.

2 PCR 条件

没有一种能适合所有 PCR 的扩增条件.在反应体系中许多组分是相对固定的,需实验者自行确定的实验条件主要是 Mg^{2+} 浓度和退火温度.

Taq DNA 聚合酶需要一定的自由 Mg^{2+} 浓度,后者受模板 DNA、dNTP、引物量以及缓冲液中 EDTA 浓度的影响.因此,应在模板量及 EDTA 浓度相对恒定的条件下选择最适退火温度和 Mg^{2+} 浓度.

DNA 溶液粘滞度高,在溶解、稀释或冻融后,均需较长时间才能达到均一状态.这就要求我们提前做好准备工作.

3 SSCP 电泳条件

在有详细报道的文章中,SSCP 分析均用测序胶板,凝胶板长度在 40 cm 以上.我们使用国产夹心式电泳槽,制胶长度 20 cm,在检测 N-ras、p53 和 β -珠蛋白基因突变时获得成功,使用的凝胶浓度适当提高到 8%~12%.凝胶浓度很重要,我们在分析 β -珠蛋白基因突变时发现:有的样品在 12%凝胶中,未发现明显突变带;但在 10%凝胶中出现了明显突变带.凝胶浓度不同,突变带的相对位置也不相同.这

提示我们在进行未知突变种类的 SSCP 分析时,最好采用两种以上凝胶浓度,可以提高突变种类的检出率.

电泳在室温,还是在 4℃好;凝胶中加不加甘油,如加甘油,多大浓度好,没有什么规律可循,只能靠实践来确定.电泳采用高压短时间好,还是低压长时间好,尚无定论.我们的经验是:较低电压、较长时间没有坏处,在此基础上适当提高电压,缩短电泳时间.

我们的电泳条件是:扩增片段为 100 bp 左右时用 12%凝胶,300 bp 左右时用 8%凝胶;不加甘油,在 4℃进行电泳;130 V, 2 h, 160 V 2 h, 190 V 16~20h.

4 凝胶染色和放射自显影

电泳结束后,凝胶可直接用 EB 染色、银染或进行放射自显影,3 种方法各有利弊. EB 专染核酸,但灵敏度低,尤其是对单链 DNA;银染灵敏度稍高于 EB 染色,但特异性差,也能染蛋白质.放射自显影灵敏度高、操作简便,可用延长曝光时间来进一步提高灵敏度.不足之处是需要防护设备和专用实验室.根据我们的经验,限于灵敏度的关系,遗传病基因突变的检测可用 EB 或银染,但对肿瘤病人癌基因、抑癌基因等突变的检测只能选用放射自显影方法.

采用 α - ^{32}P -dATP 和 α - ^{32}P -dCTP 混合掺入与单掺入其中之一的的方法相比较,可以使扩增片段掺入的同位素量相对多一些,均匀一些,两条链的放射自显影强度大体相等,便于结果分析.

5 结果分析

PCR-SSCP 分析影响因素众多,不能在放射自显影图谱上一出现特殊区带,就认为它是突变带,应仔细分析后再确定.

正常人样品目的区带有 3 条:一条双链扩增产物带,两条单链带.两条单链带一般在双链带后边,强度大体相等.突变带一般在正常单链带附近,也是两条.不过有时分离不好,没

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