

·技术交流·

## PCR 循环测序法检测 *K-ras* 和 HCV 5' 非编码区基因变异

任秀容 欧文晖 李全贞 周新宇 何蕴韶

(中山医科大学生物技术研究所; 广州, 510089)

**摘要** 目的: 建立一种简单、快速、可靠的 DNA 序列分析方法, 并利用此方法分析 *K-ras* 基因和 HCV 5' 非编码区基因的变异情况。方法: PCR 循环测序法是将 PCR 扩增与核酸序列分析相结合的一种研究方法。根据此技术原理, 建立了以 PCR 扩增引物为测序引物, 利用 *Taq* DNA 聚合酶、荧光标记的 2', 3'-双脱氧核苷三磷酸(ddNTP) 直接进行 PCR 扩增产物序列分析的方法。应用该方法对人肺癌组织中的 *K-ras* 癌基因和丙型肝炎病毒 5' 非编码区(HCV 5'-NTR) 进行了序列测定。结果: 肺癌组织中的 *K-ras* 基因第 1 外显子第 35 位碱基发生点突变(GGT→GAT); 属于高度保守区的 HCV 5'-NTR 存在基因变异。结论: PCR 循环测序法具有简单、快速、结果可靠等特点, 为基因突变的检测和病原体的核酸序列分析提供了一个快速实用的方法。

**关键词** 聚合酶链反应/方法; 序列分析, DNA/方法; 肝炎病毒组, 丙型/遗传学; 基因, *ras*/遗传学; 突变/遗传学

中图分类号 Q 523

## DETECTION OF NUCLEOTIDE VARIATIONS OF *K-ras* AND HCV 5' NTR GENES BY PCR-BASED CYCLE DNA SEQUENCING

Ren Xiurong Ou Wenhui Li Quanzhen Zhou Xinyu He Yunshao

(Institute of Biotechnology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

**Abstract Objective:** Establish a simple, rapid and accurate DNA sequence analysis method, utilize this method to detect the *K-ras* and HCV 5'-NTR genes variations. **Methods:** PCR-based cycle DNA sequencing is a method that combines PCR amplification with DNA sequencing. According to the principle, the PCR amplification fragment was subjected to direct sequencing using *Taq* DNA polymerase and dye-labeled ddNTP performed on an ABI 310 automated DNA sequencer. The nucleotide variations of *K-ras* gene in the tissue of lung cancer and HCV 5'-NTR gene were evaluated by means of the PCR-based cycle DNA sequencing. **Results:** The results showed that the point mutation, GGT→GAT transition, was found in exon 1 (base 35) of *K-ras* gene. The nucleotide variations were also identified in HCV 5'-NTR gene, which was a highly conserved region of HCV genome. **Conclusions:** The experiment demonstrated that the PCR-based cycle DNA sequencing possesses the characteristics of simplicity, rapidity and accuracy, which provides a rapidly practical method for the detection of nucleotide variations of specific gene and DNA sequence of pathogen.

**Subject headings** polymerase chain reaction/methods; sequence analysis, DNA/methods; hepatitis C viruses/genetics; gene, *ras*/genetics; mutation/genetics

PCR 技术自 1985 年建立以来, 已成为分子生物学研究中最广泛应用的方法之一。PCR 循环测序法是将 PCR 扩增和核酸序列分析技术相结

合, 从而形成的一种测定核苷酸序列的研究方法<sup>[1]</sup>。由于 PCR 循环测序法能够简单、快速地检测特定的基因改变, 迅速地诊断遗传性疾病。因

此, PCR 循环测序法在核酸序列分析研究中受到广泛的重视。本文旨在为基因突变检测在临床中的应用提供一个简单、快速的分析方法。

## 1 材料和方法

### 1.1 标本

经病理确诊的原发性肺癌病人癌组织及癌旁正常组织取自中山医科大学附属肿瘤医院。手术切除组织迅速置液氮中冷冻后,  $-70^{\circ}\text{C}$  保存备用。HCV 阳性血清由中山医科大学附属第三医院传染科提供。

### 1.2 试剂

*Taq* DNA 聚合酶、ddNTP 购自上海生工生物工程公司, 四色荧光测序试剂盒、测序用凝胶及测序缓冲液均购自美国 PERKIN ELMER 公司, PCR 试剂盒由本中心配制。

### 1.3 引物设计与合成

设计一对引物( $P_{31}$ ,  $P_{32}$ )扩增 HCV 5' NTP, 引物核苷酸序列为:  $P_{31}$  ( $-281 \sim -269$ ) 5' CTTCACGCAGAAAGCGTCTAG3',  $P_{32}$  ( $-32 \sim -11$ ) 5' GTGCCCGGGAGGTCTCGTAGA3'; 根据文献[2]设计一对引物扩增 *K-ras* 基因的第 1 外显子。两对引物均由本研究所合成。

### 1.4 RNA 模板和 DNA 模板的制备

HCV RNA 的提取采用异硫氰酸胍一步法<sup>[3]</sup>; *K-ras* DNA 的提取参照文献[4]进行。

### 1.5 逆转录反应和 PCR 反应

均参照文献[4]进行。

### 1.6 PCR 产物 SSCP 分析

取 PCR 产物  $8\ \mu\text{L}$ , 加入等体积变性液[ $\varphi$  (甲酰胺) = 0.95, 20 mmol/L EDTA] 混匀后煮沸 5 min, 置于冰上 2 min, 上样非变性聚丙烯酰胺凝胶, 80~90 V 室温电泳 18 h。电泳结束后凝胶进行银染分析。

### 1.7 PCR 产物的纯化

PCR 结束后, 加入 1/3 体积的 8 mol/L 醋酸铵、等体积的异丙醇, 室温放置 30 min, 离心回收扩增产物。

### 1.8 测序反应

在  $20\ \mu\text{L}$  反应体系中, 含 DNA 模板 30~90 ng, 单一引物 3.2 pmol, 测序混合液  $8\ \mu\text{L}$ 。按下列条件进行 PCR 反应:  $96^{\circ}\text{C}$ , 10 s;  $50^{\circ}\text{C}$ , 5 s;  $60^{\circ}\text{C}$ ,

4 min; 共 25 个循环。反应结束后, 分别加入  $2\ \mu\text{L}$  3 mol/L 醋酸钠 (pH 5.2)、 $50\ \mu\text{L}$  无水乙醇, 离心回收反应产物, 加入  $25\ \mu\text{L}$  甲酰胺,  $95^{\circ}\text{C}$  2 min, 冰浴 5 min。

### 1.9 测序电泳和数据分析

测序电泳参照 ABI 310 型核酸分析仪操作手册进行。利用 ABI 公司提供的分析软件 (Sequencing collection software, Sequencing analysis software) 进行数据收集和分析。

## 2 结果

### 2.1 PCR 产物电泳鉴定

结果可见, 从肺癌组织中可以扩增出大小为 171 bp 的 *K-ras* 基因片段; 从 HCV 阳性血清标本扩增出 271 bp 的 HCV 5'-NTR 区基因片段 (图 1)。

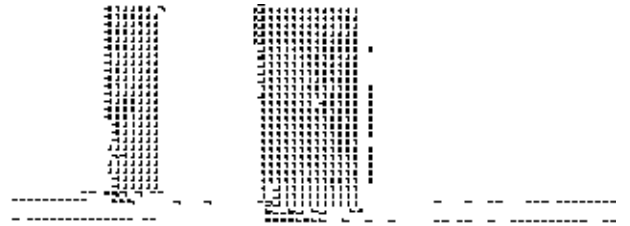


图 1 检测 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig 1 Identification of the PCR products by agarose gel electrophoresis

A, Characterization of *K-ras* gene fragment amplified by PCR. Lane 1, pBR322 *Hinf* I Marker; Lane 2, *K-ras* gene fragment; Lane 3, negative control. B, Characterization of HCV 5'-NTR gene fragment amplified by PCR. Lane 1, pBR322 *Hinf* I Marker; Lane 2, HCV 5'-NTR gene fragment; Lane 3, negative control

### 2.2 PCR-SSCP 检测 *K-ras* 基因突变

SSCP 分析结果显示, 在 6 例肺癌级中发现 1 例 *K-ras* 基因第一外显子存在异常 (图 2)。

### 2.3 *K-ras* 基因扩增产物直接序列分析

应用本室建立的 PCR 循环测序法, 对 1 例 PCR-SSCP 电泳异常的 *K-ras* 基因进行了突变分析。结果可见, 该患者 *K-ras* 等位基因发生了杂合子型基因突变, 即在 *K-ras* 基因第一外显子的第 35 位碱基发生了置换点突变, 突变形式为 GGT → GAT (图 3)。



图2 *K-ras* 基因外显子1 PCR-SSCP电泳

Fig 2 Analysis of *K-ras* gene exon 1 by PCR-SSCP

Lane 1, normal tissue; Lane 2~7, lung cancer tissue (←, indicates abnormal electrophoresis band)

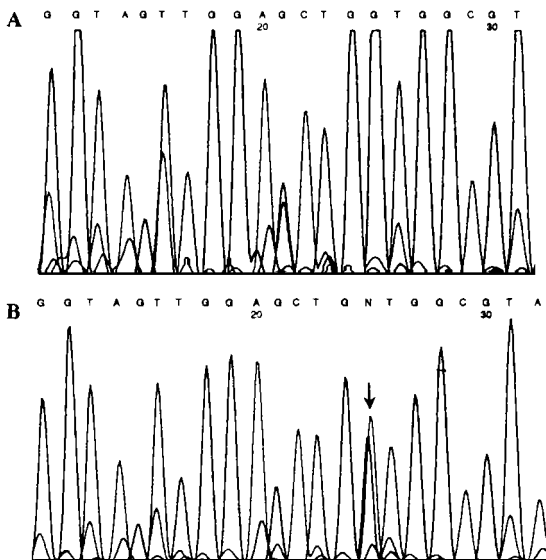


图3 *K-ras* 突变基因的序列分析

Fig 3 Sequence analysis of the mutant *K-ras* gene

A, sequence of the normal *K-ras* gene. B, sequence of the mutant *K-ras* gene (↓, indicates mutant base)

#### 2.4 HCV 5'-NTR 区扩增产物直接序列分析

用本法对9例病人的HCV 5'-NTR区扩增片段直接进行了序列分析并作了同源性比较,结果发现其同源性在98.7%以上(结果未列出)。并与已发表的该区域核苷酸序列进行了同源性分析,将我们测得的序列之一(HCV 1R),与GenBank中5株HCV(HPCHCV R, S38204R, HPCHCJ2R, HPCC-

GAAR, HPCHCJ5R)相应核苷酸序列进行比较,同源性介于94.5%~100%之间。结果说明,在HCV 5'-NTR高度保守区中存在着基因变异(图4)。

### 3 讨论

1988年Innis等<sup>[1]</sup>首先应用 *Taq* DNA聚合酶进行了核苷酸序列分析。由于 *Taq* DNA聚合酶具有耐高温的特性,因此可以有效地消除DNA二级结构对测序结果的影响。美国PERKIN ELMER公司推出了基因工程 *Taq* DNA聚合酶,具有更强的模板延伸能力,一次可读的碱基数有大幅度的增加(可达450~500 bp)。我们利用四色荧光标记的ddNTP和 *Taq* DNA聚合酶建立了PCR循环测序法。由于该法可以对双链PCR产物进行直接测序,避免了传统克隆测序法耗时长、操作复杂等缺点,因而具有简单、快速等特点。

Sarkar等在33%的肺腺癌患者病灶中发现有 *K-ras* 基因突变,在非小细胞型肺癌的突变率则为18%。突变主要发生在第1外显子第35位碱基上,其突变类型为GGT→GAT, TGT, GTT, GCT<sup>[2]</sup>。在胰腺癌患者中 *K-ras* 基因突变的检出率则高达65%~100%<sup>[5]</sup>。可见 *K-ras* 癌基因突变在某些恶性肿瘤的发生和进展中可能具有重要作用。因此利用 *K-ras* 基因作为肿瘤标志物,可以对某些恶性肿瘤(尤其是胰腺癌等)进行早期诊断和人群筛查。HCV是一种变异率极高的RNA病毒,其基因组的核苷酸序列中既有高变区也有保守区,其中5'非编码区(5'-NTR)是不同HCV分离株基因组序列中最为保守的区段<sup>[6]</sup>。通过对HCV阳性血清的PCR扩增产物进行直接序列分析,发现在高度保守的HCV 5'-NTR区中仍然存在基因变异。因此在研制HCV诊断试剂以及HCV疫苗时必须考虑HCV基因组的多变性。

在研究中发现,PCR产物的特异性直接影响测序结果。增加PCR产物的特异性将会大大提高测序结果的准确性。常规增加PCR反应特异性的方法主要有:降低反应中的引物和ddNTP浓度、提高复性温度、缩短延伸时间、减少循环次数等方法。另外,有研究组报道二甲基亚砜(DMSO)<sup>[1]</sup>、甲酰胺<sup>[7]</sup>能明显增加PCR扩增产物的特异性。我们的研究表明(结果未列出),DMSO与甲酰胺提高PCR扩增反应特异性的效果基本一致。但是,对于

HCV1R	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGC	50
HPCHCVR	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGC	50
S38204R	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGC	50
HPCHCJ2R	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGC	50
HPCCGAAR	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGC	50
HPCHCJ5R	CTTCACGCAGAAAGCGTCTAGCCATGGCGTTAGTATGAGTGTCTGTCAGC	50
	*****,***	
HCV1R	CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTG	100
HPCHCVR	CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTG	100
S38204R	CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTG	100
HPCHCJ2R	CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTG	100
HPCCGAAR	CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTG	100
HPCHCJ5R	CTCCAGGACCCCCCTCCCGGGAGAGCCATAGTGGTCTGCGGAACCGGTG	100
	***** *****	
HCV1R	AGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGC	150
HPCHCVR	AGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGC	150
S38204R	AGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGC	150
HPCHCJ2R	AGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATCAACCCGC	150
HPCCGAAR	AGTACACCGGAATTGCCAGGACGACCGGGTCTTTCTTGGATAAACCCGC	150
HPCHCJ5R	AGTACACCGGAATTGCCGGGAAGACTGGGTCTTTCTTGGATAAACCCAC	150
	*****,*** ** ***** *****,*	
HCV1R	TCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAG	200
HPCHCVR	TCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAG	200
S38204R	TCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAG	200
HPCHCJ2R	TCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCGAGACTGCTAGCCGAGTAG	200
HPCCGAAR	TCAATGCCTGGAGATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAG	200
HPCHCJ5R	TCATGCCCCGGCCATTTGGGCGTGCCCCGCAAGACTGCTAGCCGAGTAG	200
	*,***** ** ***** *****	
HCV1R	TGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCAG	250
HPCHCVR	TGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCAG	250
S38204R	TGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCAG	250
HPCHCJ2R	TGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCAG	250
HPCCGAAR	TGTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCAG	250
HPCHCJ5R	CCTTGGGTGCGGAAAGGCCTTGTGGTACTGCCTGATAGGGTGTTCGCAG	250
	***** *****	
HCV1R	TGCCCCGGGAGGTCTCGTAGA	271
HPCHCVR	TGCCCCGGGAGGTCTCGTAGA	271
S38204R	TGCCCCGGGAGGTCTCGTAGA	271
HPCHCJ2R	TGCCCCGGGAGGTCTCGTAGA	271
HPCCGAAR	TGCCCCGGGAGGTCTCGTAGA	271
HPCHCJ5R	TGCCCCGGGAGGTCTCGTAGA	271
	*****	

图4 HCV 5' NTR 区基因序列的同源性分析

Fig 4 Alignment of nucleotide sequences of HCV 5'-NTR gene

(\* , indicates the identical nucleotides)

富含 GC 碱基对的 DNA 模板, DMSO 则更能有效地提高 PCR 反应的特异性和扩增效率。在进行 PCR 循环测序时, 在反应中加入  $\varphi$  (DMSO)=5%, 并且对富含 GC 碱基对的模板 DNA 进行高温预变性和“热启动”, 可使一次测出的可读碱基在 450 bp 以上, 准确率可达 98.5% 以上, 根据这一反应体系

建立的 PCR 循环测序法, 已对富含 GC 碱基对的  $\alpha$ -珠蛋白基因、结核杆菌特异重复顺序、人增殖细胞核抗原基因(PCNA)的 5'上游调控区进行了序列测定。另外还发现用于测序的引物长度和纯度明显影响 PCR 循环测序的结果, 测序引物长度应在 18~30 nt 之间、纯度 > 98% 为宜。

## 参 考 文 献

- 1 Elich H. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton, 1989. 45 ~ 60
- 2 Chsmczy P, Sacchi N. Single step method for RNA isolation by guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987. 162: 156
- 3 Sambrook J, Fritsh E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour, 1989
- 4 Sarker F, Valdivieso M, Borders J, *et al*. A universal method for the mutational analysis of *K-ras* and *p53* gene

- in non-small-cell lung cancer using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. Diagn Mol Pathol, 1995, 4(4): 266
- 5 Villanueva A, Reyes G, Cuatrecasas M, *et al*. Diagnostic utility of *K-ras* mutations in five needle aspirates of pancreatic masses. Gastroenterology, 1996, 110: 1587
- 6 Bukh J, Pucell R, Miller R. Sequence analysis of 5' non-coding region of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 4942
- 7 Sarkar G, Kapelner S, Soumer S, *et al*. Formamide can dramatically improve the specificity of PCR. Nucleic Acids Res, 1990, 18(24): 7465

(1997-07-15 收稿 1997-12-25 修回)

(上接第 114 页)

定及法医学的个体识别等案例。

文献报道中国华人主要分为南、北两大群体<sup>[7]</sup>,根据对 HLA 系统 II 类抗原的研究表明,南北两群体有共同特点亦有差别,北方群体 HLA II 类抗原系统较均一,而南方群体则差异较大,遗传背景较复杂。广东汉族人群的 HLA *DQA* 1 等位基因频率分析结果显示,中国南方汉族人群迁移演化的复杂性与文献报道一致,与广西壮族的某些 *DQA* 1 等位基因频率有较大的差别。家系调查及重复性实验显示,本研究用 SSP-PCR 法获得的广东汉族人群 HLA *DQA* 1 等位基因频率分布的数据是可靠的。本文结果为中华汉族人类学研究及某些疾病的关联研究提供了有意义的资料。

## 参 考 文 献

- 1 Olerup O, Aldener A, Fogdell A. HLA *DQA* 1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. Tissue Antigens, 1993, 41: 119

- 2 贺奇才,谭润初,伍新尧,等. 用计算机进行 Hardy-Weinberg 平衡吻合度测验的方法. 中国医学物理学杂志, 1997, 43(2): 91
- 3 潘星华,陆建荣,刘杰,等. 中国汉族两群体 HLA *DQA* 1 基因的遗传构成及有关 15 群体 *DQA* 1 基因频率的比较分析. 中华微生物和免疫学杂志, 1995, 15(4): 276
- 4 张修武,郭实士. 应用 PCR-SSO 方法分析湖南籍汉族人 HLA DQ 位点 DNA 的多态性. 中国免疫学杂志, 1993, 9(1): 18
- 5 龙桂芳,阿卜迪,李卫,等. 应用序列特异引物 PCR 法对广西壮族 HLA *DQA* 进行基因分型. 中华血液学杂志, 1995, 15(10): 532
- 6 徐星培,汪超英,曹剑峰,等. 中国布衣族 HLA II 类基因的 DNA 分型. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 12: 285
- 7 孙逸平,高小红,秋季南,等. 中国人南北群体的 HLA Class II 基因的变异性. 中国免疫学杂志, 1992, 8(5): 283

(1997-10-18 收稿 1997-12-09 修回)