

应用非同位素 aPCR-SSCP 法 检测 P⁵³ 基因突变^①

陈 军^② 汪慧民 李满枝 吴荫棠

(中山医科大学肿瘤研究所病因室;广州,510060)

提 要 建立一种非同位素的不对称聚合酶链反应-单链构象多态性技术(aPCR-SSCP);通过不对称 PCR(aPCR)获得单链,普通 PAGE 电泳分离,经银染快速准确检出突变;应用这种方法,研究了 4 株鼻咽癌细胞株 CNE1, CNE2, HK 1 和 SUNE1 中肿瘤抑制基因 P⁵³ 基因突变,证实 CNE1, CNE2 在第 8 外显子, HK1 在第 5 外显子有突变,并发现新建立的细胞株 SUNE1 存在第 8 外显子的突变。

关键词 聚合酶链反应;单链构象多态性;肿瘤抑制基因;突变;鼻咽肿瘤

中图分类号 R730.231

1989 年 Orita 提出单链构象多态性技术^[1,2],原理是:双链 DNA 变性后,经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳;在这种条件下,单链 DNA 通过分子内碱基配对重新折叠,单链核苷酸序列的微小改变,包括点突变、缺失或插入都会影响单链分子的最终构象,从而引起电泳迁移率的改变。常规的 PCR-SSCP 包括:PCR(同位素渗入或标记引物)——产物变性——非变性 PAGE(测序板)——放射自显影。这种方法有如下局限:需用同位素,造成污染或危害,时间延长;需采用测序板电泳,不利于实验室常规操作。此外,实际操作中有时从放射自显影图像并不能准确判断结果,这是由于双链 DNA 不能完全变性,部分变性的双链 DNA 可能被误当成单链多态性。作者建立的非同位素不对称聚合酶链反应-单链构象多态性技术(aPCR-SSCP)克服了以上缺陷。

肿瘤抑制基因 P⁵³ 是当前分子肿瘤学研究的热点,在多种肿瘤中证实 P⁵³ 基因突变的存在^[3]。国外报道鼻咽癌细胞株 CNE1,

CNE2 和 HK1 都有 P⁵³ 基因突变^[4],其中 CNE1、CNE2 在 exon8, HK1 在 exon5。最近本实验室建立了一株新的鼻咽癌细胞株 SUNE1。本文采用非同位素 aPCR-SSCP 研究了以上细胞株中 P⁵³ 基因突变,证明该方法是研究基因突变的有力工具。

1 材料与方 法

1.1 检测对象

鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2 由本研究所区宝祥教授赠送, HK1 由香港中文大学病理系 Dolly 赠送, SUNE1 是本室新建立的细胞株。

1.2 PCR 引物

分别扩增 P⁵³ 基因 5, 6, 7, 8 外显子, 这 4 个外显子包含 P⁵³ 基因的最保守区和突变热点^[3]。根据已发表序列设计引物^[5], 如表 1 所示。引物由美国 Dartmouth Medical School 合成。

① 国家自然科学基金资助课题;

② 第一作者, 26 岁, 男, 博士研究生

表1 P⁵³各外显子引物与扩增片段

外显子	引物								扩增、片段(bp)
exon5	P1	GGA	ATT	CCT	CTT	CCT	GCA	GTAC	224
	P2	AGG	GCC	CCA	GCT	GCT	CAC	CATC	
exon6	P3	CAC	TGA	TTG	CTC	TTA	AGT		143
	P4	AGT	TGC	AAA	CCA	GAC	CTC		
exon7	P5	GGA	ATT	CTC	CTA	GGT	TGG	CTCT	142
	P6	ACT	TAA	GTG	GCA	CCT	GAC	CTGG	
exon8	P7	GGA	ATT	CCT	GAG	TAG	TGG	TAA	158
	P8	GTC	GAC	CTC	GCT	TAG	TGC	TCC	

1.3 PCR 和不对称 PCR(aPCR)

1.3.1 PCR 扩增各外显子 50 μ l 反应液中含 50mmol/L Tris Cl, pH 9.0 (25 $^{\circ}$ C); 50mmol/L KCl; 7mmol/L MgCl₂; 0.2mmol/L dNTPs; 0.2mg/ml BSA; 16mmol/L (NH₄)₂SO₄; 引物各 100 μ mol/L; Super Taq 1.5 U (HT Biotechnology Limited). 94 $^{\circ}$ C, 1 min; 55 $^{\circ}$ C, 1 min; 72 $^{\circ}$ C, 1.5 min, 总共 35 个循环后。最后, 72 $^{\circ}$ C 10 min。

1.3.2 aPCR 第一次 PCR 产物 PAGE 电泳后, 切下产物带, 作为 aPCR 底物。凝胶捣碎、浸泡在第二次的 aPCR 反应液 45 μ l (引物浓度分别为 100 μ mol/L 及 1 μ mol/L, 其它同第一次 PCR), 37 $^{\circ}$ C 水浴振荡 2h。加入酶后开始循环, 扩增程序同前。最后, 94 $^{\circ}$ C 5min, 迅速插入冷浴。

1.3.3 单链构象多态性分析 普通垂直板电泳 (14cm \times 14cm \times 1.2mm), 非变性 9% 聚丙烯酰胺凝胶, 含 5% 甘油。15 μ l aPCR 产物与等体积测序上样缓冲液混合上样, 50mA 室温电泳 5h, 以风扇冷却降温。

1.3.4 溴乙锭染色和银染 银染采用 Sigma 公司 silver stain kit AG-25。

2 结果

2.1 P⁵³基因第 8 外显子 aPCR-SSCP 分析

aPCR 的产物同时存在双链 DNA 和单链 DNA; 双链 DNA 片段大小与所设计相

符; 以正常鼻咽组织和 HK1 为对照^[4], CNE1, CNE2, SUNE1 都有迁移变位的单链 DNA 存在, 说明 CNE1, CNE2, SUNE1 存在第 8 外显子突变; CNE1, CNE2 中同时有第 8 外显子的突变型和野生型 (图 1)。突变型序列分析正在进行之中。

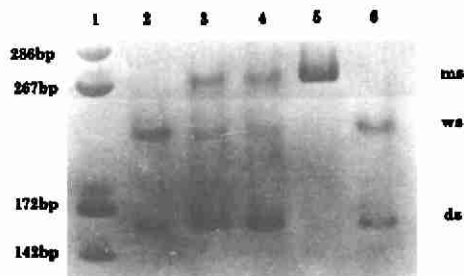


图1 P⁵³第 8 外显子的 aPCR-SSCP 分析 (P7, P8=100)

1 为 PGEM-3 zf(+)-Hae I, 2, 3, 4, 5, 6 依次为正常鼻咽组织 CNE1, CNE2, SUNE1 和 HK1。ds, ws, ms 分别为双链 DNA、野生型单链 DNA 和突变型单链 DNA

2.2 P⁵³第 5 外显子的 aPCR-SSCP 分析

正常鼻咽组织, CNE1, SUNE1 第 5 外显子均为野生型, HK1 有第 5 外显子突变 (图 2)。

2.3 第 6, 7 外显子突变分析

对 4 个细胞株及正常鼻咽组织第 6, 7 外显子也进行了分析, 没有检出突变。结果如表 2。

表2 鼻咽癌细胞株 P⁵³基因突变

	exon5	exon6	exon7	exon8
正常鼻咽组织	wt ¹⁾	wt	wt	wt
CNE1	wt	wt	wt	mut
CNE2	wt	wt	wt	mut
HK1	mut ²⁾	wt	wt	wt
SUNE1	wt	wt	wt	mut

1)wt 为野生型, 2)mut 为突变型

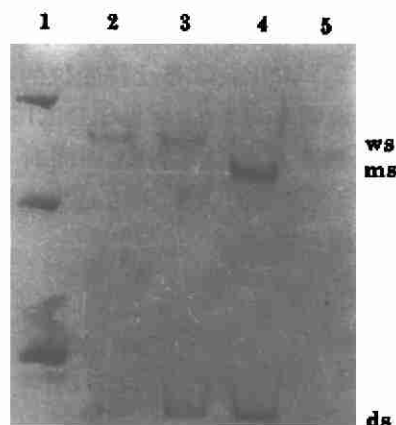


图2 P⁵³第5外显子的 aPCR-SSCP 分析
(P₂:P₁=100)

1 为 123 bp ladder, 2, 3, 4, 5 分别为正常鼻咽组织、CNE1、HK1 和 SUNE1。ds, ws, ms 分别为双链 DNA、野生型单链和突变型单链 DNA

3 讨论

在基因突变,尤其是点突变研究中,PCR-SSCP 是一种高效、灵敏的方法。在此以前,一般通过核苷酸序列分析或温度梯度凝胶电泳才能确认点突变的存在^[6],而温度梯度凝胶电泳需要特殊仪器装备。因此在分析大量样品时,PCR-SSCP 避免了大量、繁琐的工作。这种方法要求 PCR 扩增特异、双链 DNA 变性;非特异扩增、双链 DNA 不完全变性都会造成多态性解读困难,甚至产生错误判断。特别是在同时存在野生型和突变型

样品,SSCP 分析有 4 种单链构象,解读更加困难。而采用 aPCR 只有双链 DNA 和二种单链构象,经过银染后与双链 DNA 分子量标准对照,容易解读。另外,aPCR 的引入,消除了因为双链 DNA 不完全变性造成的误读,不同构象的单链还可以用普通垂直板电泳分离,避免了使用大的测序板。

DNA 的银染是一种灵敏度很高的方法,聚丙烯酰胺凝胶银染后可达 ng 水平,而且对双链和单链 DNA 都有较高的灵敏度,PCR 和 aPCR 的产物远远超过银染的检测水平。因此 aPCR 结合银染可以舍弃同位素标记,从而避免了使用同位素的种种缺陷,时间上也可缩短。此外,在本实验室经银染的凝胶,至少能保存半年以上,便于作回顾性分析。综上所述,本文建立的 aPCR-SSCP 法不使用同位素,解决了 DNA 不完全变性问题,操作简便,结果重复性高,是一种有应用前景的技术。

aPCR 在扩增过程中采用不同的引物浓度,从而获得单链。我们在实验中采用了不同的引物浓度比(1:25, 1:50, 1:100, 1:200),发现浓度比为 1:100 效果最佳。此时有较高的单链产物同时又有足够的双链产物。aPCR 的引入,解决了单链构象多态性分析中的 DNA 变性问题,又简化了变性过程。

本研究 4 株鼻咽癌细胞株 CNE1、CNE2、HK1 和 SUNE1 都有 P⁵³基因突变,我们在另外 18 例鼻咽组织中没有检测出 P⁵³突变(另文报道),提示 P⁵³基因突变可能在鼻咽癌细胞株建立过程中起作用。

参 考 文 献

- 1 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86 : 2766
 - 2 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5 : 874
 - 3 Hollestein M, Sidrasky O, Volgestein B, et al. P⁵³ Mutations in human cancers. *Science*, 1991, 253 : 49
 - 4 Charles HS, Yvone CT, Dolly PH, et al. Absence of P⁵³ gene mutations in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 1992, 52 : 4787
 - 5 Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, et al. A variation in the structure of the protein-coding region of the human P⁵³ gene. *Gene*, 1988, 70 : 245
 - 6 Norio T, Keiko H, Mieko K, et al. An improved method for the detection of genetic variations in DNA with denaturing gradient gel electrophoresis. *Mutation Res*, 1990, 234 : 61
- (1993-12-22 收稿 1994-09-22 修回)

A SIMPLIFIED METHOD FOR SCREENING P⁵³ MUTATION BY NONRADIOACTIVE SINGLE-STRAND CONFORMATION POLYMORPHISMS

Chen Jun Wang Huimin Li Manzhi Wu Yintang

(Cancer Institute, Sun Yat-Sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510060)

PCR-single strand conformation polymorphisms (PCR-SSCP) is a powerful method for screening mutations and widely used in studying mutations of oncogenes and tumor suppressor genes. Ordinary PCR-SSCP need the uses of radioactivity and sequencing apparatus, which compromise its application. In this study, we established a non-radioactive asymmetric PCR-SSCP(aPCR-SSCP). Single strand DNA was generated by asymmetric PCR, separated by mini PAGE and silver stained. We investigated the exon 5,6,7,8 of P⁵³ gene in four cell lines of nasopharyngeal carcinomas-CNE1, CNE2, HK1, SUNE1, and this method was proved to be very useful in screening mutations.

Key words polymerase chain reaction; single-strand conformation polymorphisms; tumor suppressor genes; mutation; nasopharyngeal neoplasms