DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.051
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1358 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

技术方法

文章编号:1000-5404(2001)11-1358-02

银染单链构象多态性技术检测人 IL-3 基因突变

Detection of hIL-3 cDNA mutation with SS-SSCP technique

毛琼国,刘 昕,王 燕,梁 红 (第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 对人白细胞介素-3(hIL-3)基因突变体进行分析和进一步鉴定,建立一种灵敏、快捷的检测基因突变和DNA多态性的方法-即银染单链构象多态性技术(Single strand conformation polymorphism, SSCP)。方法 将野生型和突变型的人白介素-3(hIL-3)cDNA连接到PUC9和PUC19质粒载体上,转化入大肠杆菌,扩增质粒,用常规方法抽提,酶切,然后将酶切后的DNA片段进行PAGE胶电泳,银染检测野生型和突变型的异同。结果 以野生型hIL-3 cDNA作为对照,连接到PUC9和PUC19上的电泳结果均为一致,突变型hIL-3 cDNA的电泳带明显比野生型的电泳带靠后。结论 SSCP方法具有简便,快捷较灵敏的特点,对人白细胞介素-3(hIL-3)基因的点突变得到进一步的鉴定。

基因突变检测是遗传病病因分析与基因诊断的重要环节。基于微小未知基因突变筛选方法,包括变性与温度梯度凝胶电泳、RNA酶裂解、化学错配裂解、SSCP、直接测序等,适用于涉及少数碱基的基因突变检测。上述方法中,直接测序法是最灵敏、最准确的,但费资耗时[1]。SSCP法具有最简单、快捷的特点,并已证实在直接检出未知微小突变方面的效率较高。我们将PCR突变的人白细胞介素-3基因,经过测序已证实了其中的突变,与SSCP法筛查突变的情况作了初步比较分析,证明SSCP法是一种较为灵敏、快捷、价廉的方法,值得在临床诊断和实验室检测基因突变和DNA多态性的推广。

1 材料与方法

1.1 材料

PUC_9、PUC_{19}载体和DH_{52}菌株由本室提供,突变型IL-3和野生型IL-3cDNA均由王燕博士提供,质粒抽提试剂盒、酶(Roche公司),其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 质粒的转化和抽提按分子生物学的常规方法操作[2]。

1.2.2 酶切 将PUC_9-IL-$3_{野}$、PUC_{19}-IL-$3_{野}$和PUC_9-IL-$3_{突}$、PUC_{19}-IL-$3_{突}$用*EcoR* Ⅰ + *Hind* Ⅲ酶切37 ℃ 2 h,琼脂糖凝胶电泳检测是否酶切完全,冻存以备后用。

1.2.3 SSCP 将酶切片段20 μl与等体积的2× 上样Buffer(95%甲酰胺,20 mmol/L EDTA, 0.05%溴酚兰)混匀,100 ℃煮5 min,置冰上,上样5 μl与预先电泳30 min的8%和12%非变性聚丙烯酰胺凝胶中,电泳缓冲液1× TBE,电泳(5 V/cm电压)6 h,直到溴酚蓝至胶底部为止。电泳结束后,小心取下凝胶,固定在10%的HAC中过夜。银染:冲洗10%乙醇,5min→预处理$K_2Cr_2O_7$(1 g/L)、0.2 ml HNO_3/L, 5 min→冲洗ddH_2O, 2 min× 3→银染$AgNO_3$(2 g/L),30 min→冲洗ddH_2O, 20 s→显色Na_2CO_3(30 g/L),0.5 ml 37%乙醇/L,5~10 min→终止 10%HAC,5 min→用ddH_2O反复冲洗几次,于观片灯下观察结果。

2 结果

共分析了两组不同载体的hIL-3突变序列,结果都一致。即以野生型hIL-3 cDNA作为对照,连接到PUC_9和PUC_{19}上的电泳结果均为一致,突变型IL-3 cDNA的电泳带明显比野生型的电泳带靠后,见图1、2。且突变型hIL-3 cDNA序列经双脱氧测序法已被证实[3]。

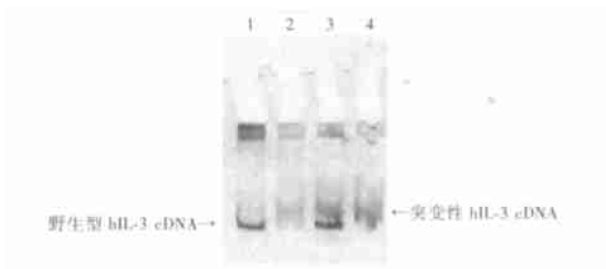


图1 不同载体连接的野生型和突变型**hIL-3 cDNA**,酶切后在聚丙烯酰胺凝胶上电泳图
1:PUC_9-$IL\text{-}3_{野}$;2:PUC_9-$IL\text{-}3_{突}$;3:PUC_{19}-$IL\text{-}3_{野}$;4:PUC_{19}-$IL\text{-}3_{突}$

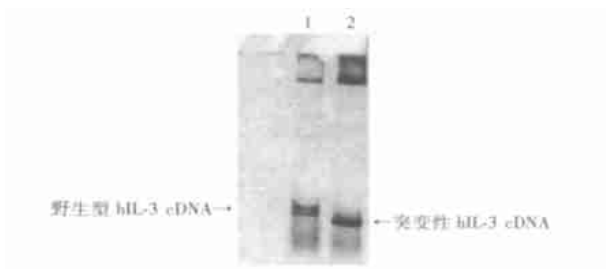


图2 野生型和突变型**hIL-3 cDNA**在聚丙烯酰胺凝胶上电泳图
1:$IL\text{-}3_{突}$;2:$IL\text{-}3_{野}$

3 讨论

人白细胞介素-3是一种作用于早期造血干细胞的重要调节因子。人IL-3成熟蛋白是由133个氨基酸组成的肽链,据文献[4]报道,键内有4个α螺旋结构,

作者简介:毛琼国(1971—),女,四川省简阳县人,硕士研究生,实验师,主要从事分子遗传方面的研究。电话:(023)68752257

收稿日期:2000-12-14;修回日期:2001-04-27

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其中第一个 α 螺旋和第 4 个 α 螺旋与 IL-3 生物学活性及与 IL-3 受体结合能力的高低可能相关。本室利用 PCR 技术对 hIL-3 cDNA 进行定点突变[5]，以期改变其所编码的氨基酸序列，在 hIL-3 的空间结构中，增强其功能基团的生物学活性。用 PCR 进行目的 DNA 的定点突变，有利于我们对细胞因子的生物活性，按预想的要求进行改变。

单链构象多态性分析技术是目前检测单个碱基或多个基因改变的非常敏感的方法，具有简便，快速，准确的特点，敏感性较高。在变性剂的作用下，双链 DNA 部分或全部被裂解为单链 DNA，当在非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳时，单链 DNA 的电泳迁移率除与 DNA 的长短有关外，更主要的取决于 DNA 单链所形成的空间构象。相同长度的 hIL-3 cDNA 由于发生了基因突变，单个碱基的改变，导致了 DNA 序列的空间构象改变，亦导致了电泳速度的改变。

聚丙烯酰胺 SSCP 技术电泳后，以前多采用放射自显影或溴化乙锭(EB)染色的方法来鉴定有无碱基突变的存在，前者耗时，价格昂贵，而且同位素易导致放射性污染；后者则由于 EB 对单链 DNA 的结合能力远比与双链 DNA 的结合能力差，所以易造成假阳性。本实验采用的银染法[6]与上两种方法相比，有以下优点：①灵敏度高，只需几微升 cDNA 液即可进行银染操作，结果直观，保存时间较长；②需要时间短，1 ~2 h 即可完成全部操作；③不需特殊的试剂和仪器，操作简便，一般实验室均可开展。

因此，我们采用的银染单链构象多态性技术(SSCP)为检测基因突变和 DNA 多态性提供了一种简便、快捷、灵敏的方法。

关键词：单链构象多态性(SSCP)；人白细胞介素-3(hIL-3)；基因突变
中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Lendeckel U, Wex T, Arndt M, *et al*. Identification of point mutations in the aminopeptidase N gene by SSCP analysis and sequencing[J]. Hum Mutat, 1998, (Suppl 1): 158－160.
[2] 谭 峻，刘 昕 主编. 基因工程技术及其实验原理[M]. 北京：科学技术文献出版社，1994. 78－91.
[3] 王 燕，朱锡华. 人的 IL-3 突变体的构建及其在大肠杆菌中表达的研究[J]. 第三军医大学学报，1997，19(1)：63－64.
[4] Barry S C, Bagley C J, Phillips J. Two contiguous residues in humun interleckine-3, Asp21 and Glu22, selectively interact with the α- and β-chains of its receptor and participate in function[J]. J Biol Chem, 1994, 269(11): 8488－8492.
[5] 王 燕，刘 昕. 用 PCR 对人 IL-3cNDA 进行定点突变的方法研究[J]. 解放军医学杂志，1999，24(2)：152－153.
[6] Zhang Q, Minoda K. Detection of congenital color vision defects using heteroduplex-SSCP analysis[J]. Jpn J Ophthalmol, 1996, 40(1): 79－81.

(编辑 谢义霞)

文章编号：1000-5404(2001)11-1359-02

技术方法

活体肝移植肝脏移植物的获取及修剪

Procurement of liver graft and back-table preparation for the graft in living-related liver transplantation

杨占 宇[1]，董家 鸿[1]，范 上达[2]，廖子良[2] ([1] 第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院，重庆 400038；[2] 香港大学玛丽医院外科学系)

提 要：目的 总结活体肝移植肝移植物的获取及修剪经验。方法 回顾性分析 2000 年 11 月完成的 1 例活体肝移植术中右肝移植物的获取及修剪过程。供受体体重相近，切取含中肝静脉的右半肝为移植物。在术前血管造影、术中多谱勒超声、术中胆道造影的指导下，确定离断肝组织的切面。解剖第一、第二、第三肝门，以 CUSA2000 超声刀离断左右肝间的肝组织桥。移植物离体后实施冷灌注。结果 肝移植物植入后功能良好，供体术后恢复顺利。结论 切取活体肝移植物时应仔细解剖第一、二、三肝门，以超声止血刀离断肝组织。

活体肝移植已被广泛应用于治疗儿童和成人的终末期肝病患者[1,2]。获取功能良好的肝脏移植物是保证活体肝移植成功的关键步骤之一。本所于 2000 年 11 月完成 1 例活体肝移植，总结供肝切取及修剪经验。

1 临床资料

1.1 一般临床资料

受体男性，37 岁，体重 67 kg，身高 169 cm。诊断：慢性重型乙型病毒性肝炎，肝性脑病 II 度；肝肾综合征。供体男性，35 岁，体重 60 kg，身高 170 cm。肝功能正常，乙型肝炎病毒标记物阴性，肝穿刺活检提示肝脏正常，腹腔动脉造影见肝动脉无变异，螺旋 CT 扫描见肝脏大小、质地正常，引流肝脏 VIII段有一支较粗大的静脉支，见图 1。

基金项目：重庆市科学技术委员会攻关资助重点项目(2000847)
作者简介：杨占宇(1966－)，男，河北省唐山市人，博士研究生，主治医师，讲师，主要从事肝脏移植的临床及基础方面的研究，发表论文 11 篇。电话：(023)68752653
收稿日期：2001-01-23；修回日期：2001-04-11

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net