DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.040

第二组: 按改良式(方法二)施行肝移植25例,供体手术约需 30 min,受体手术约需 20 min, Ⅳ C和 PV 套接均在 1 min内完成, SV C吻合约需 12 min,无肝期平均 13 min(10~ 15 min)手术成功率达 100% (25/25),其中 22只存活 > 60 d的观察期,见附表。

3 讨论

大鼠原位肝移植系小视野精细手术,若操作时间过长易致术者疲劳,动作准确性差,极易发生血管吻合失败。通过试验,我们认为,目前报道的供肝切取方法切实可行,但在受体手术方面尚可进行不少改进。

受体肝的切除是大鼠原位肝移植的主要步骤之一,文献[4]介绍的方法中均为先切除受体肝脏,然后纳入供肝并吻合各血管,采用这种顺序将同时遗留 PV、Ⅳ C和 SV C三个主要血管断端, PV和 Ⅳ C套接吻合十分不便,必须在 PV和 Ⅳ C断端各结扎一根牵引线,固定在适当位置并保持一定的方向和牵引张力方能完成血管套接。在实践中,由于单人操作,致使血管套接和牵引难以同时兼顾,屡屡不能成功,因此耗时较长。在另一组动物中我们改变了切除受体肝的顺序,即在不切除受体肝的情况下,借助受体肝的原位自然牵引作用,于相反方向作一血管套线牵引,使血管呈现一定张力,局部长度也略有增加,则可在 1~ 2 min内很容易地完成 Ⅳ C和 PV两根血管的套接吻合,明显缩短了吻合时间,提高了吻合成功率。

通过改良,使受体手术时间缩短至 20 min左右,约为原来手术时间(平均 40 min)的 1/2。

无肝期是指 SV C和 PV从阻断到再通的一段时间,无肝期超过 26 min动物则不能存活[6]。本实验采用依次吻合 Ⅳ C、PV和 SV C的顺序,省去了安置 Ⅳ C和 PV的结扎牵引过程,加之 PV套接迅速,故受体肝切除时间也大为缩短,直至完成 SV C吻合,使无肝期由原术式的 17 min缩短至 13 min左右。

本实验中,由于 Ⅳ C、PV吻合迅速,全肝阻断时间和无肝期均明显缩短,因此手术成功率高(25/25),术后动物恢复较好。

改良方法能够明显简化手术,缩短手术时间,成功率高,易于掌握和普及。

关键词 大鼠;原位肝移植

中图法分类号 R617

参考文献

1 Xu H S, Stevenson W C, Pruett T L *et al*. Donor lazaroid pretreatment improves viability of livers harvested from non-heart-beating rats. Am J Surg, 1996; 171(1): 113

2 Yano K, Fukuda Y, Suminoto R *et al*. Developement of a rat model for orthotopic liver transplantation for hepatocellular carcinoma. Surgery, 1995; 118(3): 539

3 Goto M, Yamaguchi Y, Matsuno K *et al*. Suppression of hepatic allograft rejection in the rat by mitomycin C-treated donor splenocytes: in situ splenic distribution of donor class I major histocompatibilily complex antigen- positive cells in the recipient. J Surg Res, 1996; 60(1): 216

4 张文海,有井滋树,董雨亭等.大鼠原位肝移植术并发症的预防.中华器官移植杂志, 1995; 16(1): 12

5 陈忠华,夏穗生.改进的大鼠原位肝移植术.中华器官移植杂志, 1984; 5(4): 50

6 Kamada N, Calne R Y. Orthotopic liver transplantation in the rat-technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. Transplantation, 1979; 28(1): 47

(收稿: 1996-12-20;修回: 1997-03-20)

(编辑 汪勤俭)

PCR-单链构象多态分析基因变异电泳条件的探讨

Observation of electrophoretic conditions on PCR-SSCP pattern in polymorphous detection of gene mutations

刘泽军* Dey DC** 营野刚史** (第三医大学附属西南医院检验科)重庆,400038

提 要 目的:探讨不同电泳条件对基因检出灵敏度的影响。方法:使用不同浓度的凝胶和不同的缓冲

* 刘泽军,男, 4l岁,副主任技师,硕士

** 浜松医科大学临床检查部,日本

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

液进行 PCR-SSCP分析。结果: 12.5%凝胶及含 SDS的缓冲液检出率较高,但有时也与变异类型有关。结论:在检测基因变异时,应考虑使用含 SDS的缓冲液。

在使用 PCR检测基因变异的技术中,PCR-SSCP是容易操作,也是灵敏度较高的一种检测方法[1]。但是,原法需要使用放射性物质而且费时[2]。我们使用 Phast System全自动电泳装置进行电泳,然后选用银染色方法代替放射性方法,获得了极好的效果。本研究就应用此法时电泳条件,即凝胶浓度和缓冲液的种类对结果的影响进行了探讨。

1 材料和方法

经由 DNA测序已经查明乳酸脱氢酶 A或 B亚单位变异个体的 DNA, PCR扩增后的产物与含有 95%甲酰胺, 20 mmol/L EDTA, 0.05%溴酚蓝, 0.05%二甲苯蓝的溶液等量混合,加热到 80℃使变性,立即置于冰浴中,然后使用 Phast System仪器, 15℃条件下电泳,泳动结束后,使用同一仪器上的银染色程序进行染色。电泳凝胶分别使用 7.5%均一凝胶(Homogeneous gel)、12.5%均一凝胶和 8%~25%梯度凝胶(Gradient gel),同时分别使用 Native及含有 SDS的缓冲液电泳(Pharmacia Biotech Sweden)。Native缓冲液含有 0.88 mol/L丙氨酸, 0.25 mol/L Tris·pH 8.8的泳动缓冲液; SDS缓冲液含有 0.55% SDS, 0.2 mol/L Tris-tricine, pH8.1的缓冲液。

2 结果

附表为使用不同电泳介质和缓冲液检出基因变异的数目。

附表 使用不同电泳介质和缓冲液检测基因变异的灵敏度

变异			基因	外显子	7.5%凝胶		12.5%凝胶		8%~25%凝胶	
					Native	SDS	Native	SDS	Native	SDS
酪氨酸	147	终止密码(TAT→TAG)	LDH-B,	外显子 4	-	+	-	+	-	+
精氨酸	173	组氨酸 (CGC→CAC)	LDH-B,	外显子 4	-	+	+	+	+	+
酪氨酸	174	终止密码(TAC→TAA)	LDH-B,	外显子 4	-	-	+	+	+	-
丝氨酸	131	精氨酸 (AGT→CGT)	LDH-B,	外显子 3	-	+	+	+	-	+
谷氨酸	328	终止密码(GAG→TAG)	LDH-A,	外显子 7	+	-	+	-	+	-
赖氨酸	6	谷氨酸 (AAA→GAA)	LDH-B,	外显子 1	-	+	+	+	+	+
丙氨酸	35	谷氨酸 (GCG→GAG)	LDH-B,	外显子 1	-	+	+	+	-	+
检出变异数					1	5	6	6	4	5

+:表示检出变异;使用的电泳介质为 7.5%均一凝胶, 12.5%均一凝胶和 8%~25%梯度凝胶,缓冲液为 native缓冲液和含 SDS的缓冲液。

3 讨论

比较附表结果, 12.5%均一凝胶检出变异的灵敏度最高, 14例中共检出 12例,检出率为 85%,其次为 8%~25%梯度凝胶,共检出 9例,检出率为 64%。因此一般情形下,在经由 12.5%均一凝胶电泳和银染色步骤后,可以将异常带取出,经 PCR放大后,直接测序,找出变异位置。

使用含 SDS缓冲液比使用 Native缓冲液的检出率高,在所使用的 3种凝胶 21例中共检出 16例,检出率为 75%; Native缓冲液条件下只检出 11例,检出率为 52%。可能因为 SDS缓冲液增加各带的分辨率而导致检测灵敏度的提高。

但是,某些变异序列,使用 Native缓冲液更易于检出变异,如 LDH-A外显子 7变异(谷氨酸 328→终止密码)中,含 SDS的 3种不同凝胶都没能检出变异,而使用 Native缓冲液对 3种不同凝胶都检出了变异。相反的例子如 LDH-B外显子 4变异(酪氨酸 147→终止密码),结果正相反。由此可见基因变异除了与所使用的凝胶和缓冲液有关外,还与变异序列有关。

单链构象多态分析的最适条件受到 DNA片段的长度,碱基的排列顺序,缺失,插入等多种因素的影响,只用一种电泳条件不能完全否定变异的存在。在临床 DNA诊断中,除了使用 Native缓冲体系外,还应该考虑使用 SDS缓冲液体系,提高基因变异的检出率。

关键词 单链构象多态(SSCP);缓冲液;凝胶; SDS
中图法分类号 Q78

参考文献

1 Hayashi K. Manipulation of DNA by PCR. In: Mullis K B ed. The polymerase chain reaction. Boston: Birkhauser, 1994. 7~14

2 Orita M, Suzuki Y, Sekiya T *et al*. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphsms using the polymerase chain reaction. Genomics, 1989; 5: 874

(收稿: 1997-04-22;修回: 1997-11-13)
(编辑 冷怀明)

?1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net