DOI:10.16016/j.1000-5404.1995.02.023

技术与方法

银染单链构象多态性分析——一种快速检测基因点突变的新方法

Silver stain single strand conformation polymorphism—— A rapid and simple method to detect gene point mutations

王 东 史景泉 (第三军医大学基础部病理学教研室) 630038
罗元辉 鲁 荣 (第三军医大学西南医院消化实验室) 630038

基因点突变是肿瘤重要的分子遗传学改变之一，对于揭示肿瘤的发病机理，评估肿瘤的生物学行为，都有着十分重要的意义。检测基因点突变的方法很多，其中以PCR为基础的多聚酶链反应-单链构象多态性方法(polymeras chain reaction-single strand conformation polymorphism，PCR-SSCP)倍受青睐。现已被广泛用于各种肿瘤癌基因和抗癌基因突变的鉴定。但是，传统的PCR-SSCP分析为同位素标记方法，极大地限制了其变成常规诊断手段。因此，非放射性同位素检测已成为PCR-SSCP分析的一个重要发展方向。晚近，国外几家实验室成功地将银染技术用于PCR-SSCP分析[1,2]，给这一技术的应用带来很大希望。然而，这些实验室大多采用Bio-Rad或Parmacia公司的试剂盒，未见报道具体方法。我们参阅有关文献，成功地将银染技术应用于PCR-SSCP，现报告如下：

1 材料和方法

1.1 标本来源

38例肝细胞肝癌及癌旁组织，其中36例为新鲜组织，液氮保存，2例为石蜡包埋组织。2例正常人血标本来自西南医院正常献血员。组织DNA及白细胞DNA提取参照"分子克隆实验指南"进行。

1.2 P53基因第7外显子的扩增

用PCR扩增P53基因第7外显子全序列DNA片段，下游引物为该外显子正链上游内含子第23～44个核苷酸之间的序列：5′CCCAAGGCGCACTGACCTCA3′；下游引物为该外显子负链下游最后11个核苷酸和内含子前9个核苷酸之间的序列：5′GCTCCTGACCTGGAGTCTTC3′。反应产物长度为164 bp。反应体系为：模板DNA 1.8 μl，2.5 mmol/L dNTP，3.2 μl，20 pmol引物2 μl，10×Taq酶缓冲液4 μl(华美公司产品)，93℃变性8 min后置冰浴中，加2.2 μl Taq DNA聚合酶(华美公司产品)，72℃ 60 s，94℃ 35 s，54℃ 40 s。PCR在自动扩增仪(美国PE公司)上进行，35次循环后，72℃保温10min。

1.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳

扩增产物用HaeⅢ酶切，发现38例肝癌中7例有249位点突变(详文另发表)，将其余31例肝癌和2例正常人白细胞PCR产物进一步做PCR-SSCP分析，以确定249位点以外第7外显子的点突变。5 μl PCR产物(未经纯化)加入15 μl载样缓冲液中(95%去离子甲酰胺，10mmol/L EDTA，0.05%溴酚兰-二甲苯氰蓝)，85℃变性5分钟后置冰浴中。制备电泳凝胶(10 cm×9 cm×0.1 cm)，使胶中最终含12%丙烯酰胺(丙烯酰胺∶甲叉双丙烯酰胺=39∶1)，1×TBE，5%甘油。取变性后稀释液20 μl上样，用Tris-甘氨酸(25 mmol/L Tris，192 mmol/L 甘氨酸)做电泳缓冲液，16～20℃，200 V电泳4.5 h。

1.4 凝胶镀银染色

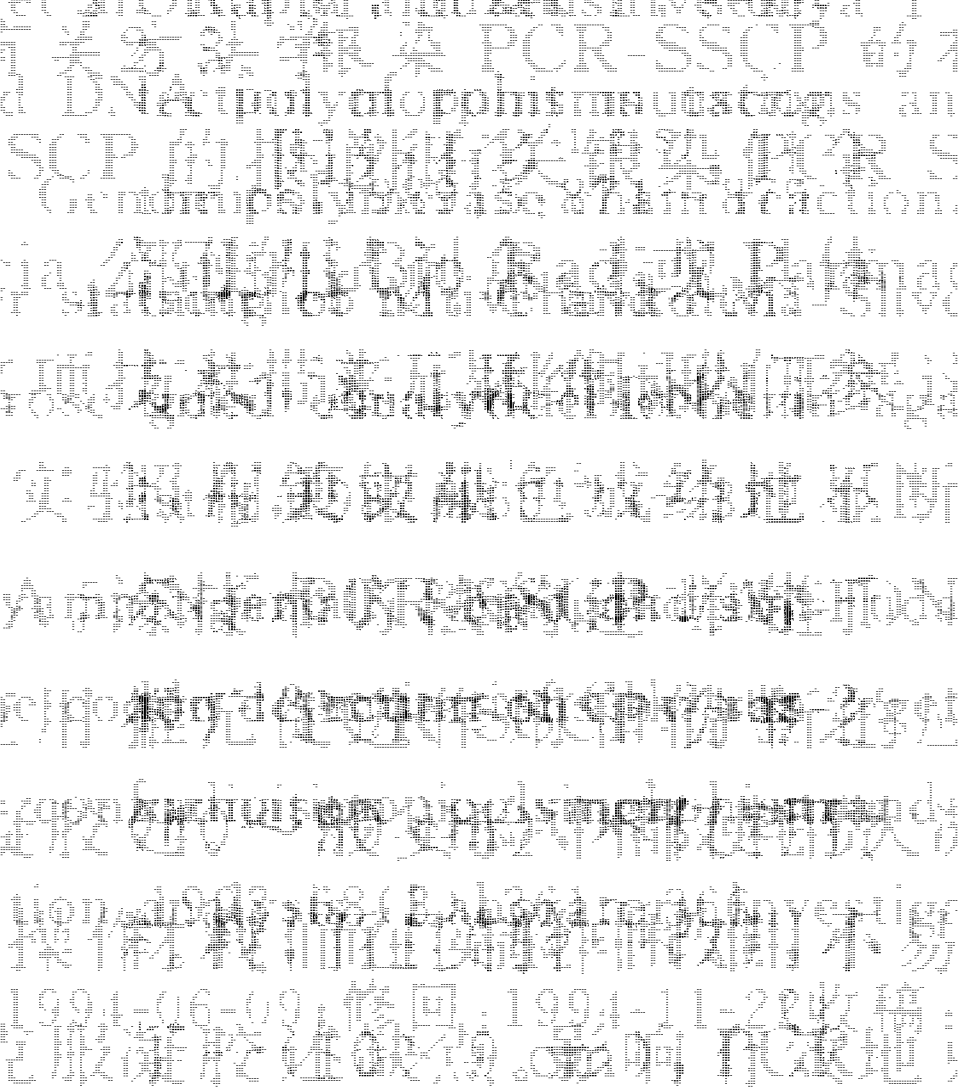
电泳完毕后，取出凝胶放入一大培养皿中，用10%乙醇、5%乙酸固定30 min，蒸馏水洗2次，0.1%$AgNO_3$染色30 min，蒸馏水洗3次，2.5%Na_2CO_3、0.04%甲醛溶液显色20～30 min，直至条带清晰，10%乙酸溶液停显，凝胶照像。在操作中各步骤最好在水平摇床上轻轻摇荡，以获得最佳效果。

2 结果与讨论

2.1 PCR-SSCP分析的基本原理

PCR-SSCP是1989年日本关谷实验室结合PCR反应和单链DNA非变性聚丙烯胺电泳首先创立的[3]。其基本原理是：在不含变性剂的中性聚丙烯胺凝胶中电泳时，DNA单链的迁移率除与DNA链的长短有关外，更主要的是取决于DNA单链所形成的构象。在非变性条件下，DNA单链可自身折叠形成具有一定空间结构的构象。这种构象由DNA单链基顺序决定，其稳定性靠分子内局部顺序的相互作用(主要为氢键)来维持。相同长度的DNA单链因其顺序不同，甚至单个碱基不同，所形成的构象不同，电泳迁移率不同。PCR扩增产物变性后，单链产物经中性聚丙烯酰胺电泳，靶DNA中含单碱基置换，数碱基插入成缺失等改

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



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