

• 研究论文 •

毛细管电泳-限制性片段长度多态性分析检测胃癌 H-ras 基因点突变

刘圆圆^{a,b,c} 王 荣^{*,a} 贾正平^a 郭志强^a 辛晓婷^{a,c}
谢 华^a 马 骏^a 王 娟^a 李文斌^a

(^a 兰州军区兰州总医院临床药理基地 兰州 730050)

(^b 甘肃省红十字血液中心 兰州 730046)

(^c 兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

摘要 建立一种毛细管电泳快速高效检测限制性内切酶切产物的方法,使其更好地用于基因诊断.以甲基纤维素(Methyl cellulose, MC)为筛分介质,用 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker 标准 DNA 片段为实验对象,通过考察筛分介质的浓度、pH 值、毛细管的温度和运行电压优化出分离小于 600 bp 的双链 DNA 片段的最适条件,并将此方法应用于临床 59 例胃癌患者肿瘤组织 H-ras 基因 12 位密码子点突变情况的检测. MC 是一种良好的筛分介质,运用其进行毛细管电泳对于遗传性疾病的诊断将更加快速、准确、简便、灵敏.

关键词 毛细管电泳; 甲基纤维素; 限制性片段长度多态性; H-ras; 基因突变

H-ras Gene Mutation Detection of Gastric Cancer by Restriction Fragment Length Polymorphism with Capillary Electrophoresis

Liu, Yuanyuan^{a,b,c} Wang, Rong^{*,a} Jia, Zhengping^a Guo, Zhiqiang^a
Xin, Xiaoting^{a,c} Xie, Hua^a Ma, Jun^a Wang, Juan^a Li, Wenbin^a

(^a Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050)

(^b Gansu Red Cross Blood Center, Lanzhou 730046)

(^c Life Science College, Lanzhou University, Lanzhou 730000)

Abstract To establish the high performance detection method for separating products of restrictive enzyme DNA fragments and diagnosing mutation gene of gastric cancer by restriction fragment length polymorphism with capillary electrophoresis, methyl cellulose was used to separate pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) fragments through capillary electrophoresis as sieving matrix. The effects of the concentration of methyl cellulose solution, running pH, running temperature and electric field strength on dsDNA (<600 bp) analysis were investigated in the experiment. The optimum separation condition was obtained and applied to mutation detection of H-ras gene at codon 12 of 59 gastric cancer tissues. Methyl cellulose is an excellent medium and it will make diagnosis of genetic disease rapidly, exactly, conveniently and sensitively.

Keywords capillary electrophoresis; methyl cellulose; restriction fragment length polymorphism; H-ras; gene mutation

基因突变的检测在临床疾病诊断中起十分重要的作用. 目前, 筛查基因点突变常常采用以 PCR 为基础的

聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳与各种基因突变检测技术相结合的方法, 这些方法在满足临床快速检测基因突变

* E-mail: wangrong-69@163.com

Received January 2, 2008; revised August 27, 2008; accepted November 3, 2008.

国家自然科学基金(No. 20775089)、甘肃省自然科学基金(No. ZS031-A25-70-E)和中国博士后基金(No. 2005037576)资助项目.

的需要时有一定的局限性. 毛细管电泳(CE)是20世纪80年代迅速发展起来的一种新型电泳与色谱相结合的分选分析技术, 具有分离效率高、分析速度快、样品用量少、应用范围广等特点^[1,2], 成为分离DNA片段的重要方法之一. CE与各种基因突变检测技术相结合时, 显示了无可比拟的优越性. 目前国内外研究的较多的是CE-单链构象多态性(SSCP)联用技术检测基因突变^[3-6], 而CE-限制性片段长度多态性(RFLP)联用技术报道较少^[7,8].

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 已发现胃癌的发生发展中伴随着多种基因的异常, 其中原癌基因H-ras突变与胃癌发生关系密切, 检测其突变对于确定肿瘤病因, 判断预后等有重要意义. 已报道H-ras基因突变检测都是采用平板凝胶电泳, 费时、费力, 突变检出准确性低^[9,10], 不能适应大规模临床应用. 据报道H-ras基因12位密码子是突变热点^[10,11]. 本文为了建立高效、快速、简便的CE-激光诱导荧光检测器(LIF)和RFLP联用技术检测基因突变方法, 以甲基纤维素(Methyl Cellulose, MC)为筛分介质, 用pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker标准DNA片段为实验对象, 优化分离双链DNA片段的最适条件, 并用于胃癌H-ras基因12位密码子突变情况的检测.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

P/ACE System 5000 型毛细管仪、P/ACE System 5000 station 数据处理软件、P/ACE System laser module 488 nm 激光发射器(美国 Beckman); 石英毛细管柱(河北永年光导纤维厂); PCR 扩增仪(杭州朗基科学仪器有限公司); TG16-W 微量高速离心机(湖南仪器仪表总厂兴华仪器厂).

MC(上海化学试剂厂, M450), 丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)(国药集团化学试剂有限公司); γ -甲基丙烯酰基-三(甲氧基)硅烷(MAPS)(Johnson Matthey 公司); 89 mmol/L Tris+89 mmol/L 硼酸+2 mmol/L EDTA (1×TBE 缓冲液); SYBR Green I 核酸染料(10000×, 50 μ L/支, 厦门百维信公司); TaqDNA 聚合酶、PCR 试剂(TaKaRa)、Msp I 内切酶(TaKaRa); pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker (MBI Fermentas).

59 例胃癌及癌旁组织标本均取自兰州军区兰州总医院病理科, 这些标本都是来自行胃部切除并经病理证实为胃癌的病人.

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA提取及PCR扩增

传统酚-氯仿法提取胃癌及癌旁正常组织基因组

DNA. H-ras 基因 12 位密码子突变会引起 Msp I 酶切位点(CCGG)的消失. 为了检测这一位点的突变情况, 设计 PCR 扩增引物(上海生工合成): 上游: 5'AGTCCTTG-CTGCCTGGCGTTG3', 下游: 5'CGTATTCGTCCACA-AAATGGTTCTG3'. 扩增片段长度为 279 bp; PCR 扩增反应体系 25 μ L 中含 dNTP 200 μ mol/L、TaqDNA 聚合酶 0.5 U/ μ L、引物 0.05 μ mol/L、DNA 模板 20 mg/L. PCR 反应循环条件: 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共行 35 个循环.

1.2.2 RFLP 分析 PCR 扩增产物

用限制性内切酶 Msp I 切割 PCR 扩增产物, 20 μ L 酶切体系中含有: Msp I 10 U, PCR 产物 8 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴反应 1 h. 扩增产物中含有两个 Msp I 酶切位点, 其中的一个作为内对照, 酶切后野生型形成 56, 64, 159 bp 3 条 DNA 片段; 突变型形成 120, 159 bp 2 条 DNA 片段.

1.2.3 毛细管柱涂层方法

根据参考文献[12]并做了改进共价涂层毛细管柱(37 cm×75 μ m, 有效长度 27 cm). 取一段石英毛细管, 用 0.2 mol/L NaOH 清洗 1 h, 再分别用水、甲醇、空气各冲洗 15 min; MAPS/甲醇(V/V, 1/1)冲洗毛细管柱 1 h, 通 N₂, 100 $^{\circ}$ C 反应过夜; 第二天先分别用甲醇、水、空气各冲洗毛细管柱 15 min, 再用 3.4%丙烯酰胺单体溶液冲洗毛细管柱 1 h, 通 N₂, 100 $^{\circ}$ C 反应 4 h, 用水冲洗 20 min, 即可使用.

1.2.4 毛细管电泳条件及实验方法

MC 作为筛分介质, 1×TBE 作为缓冲溶液(89 mmol/L Tris+89 mmol/L 硼酸+2 mmol/L EDTA, pH 8.2), 取 DNA 样品 2 μ L, 荧光染料 SYBR Green I 5 μ L, 再加去离子水补充到 30 μ L 体系, 混匀, 10 kV 负极电动进样 10 s, 激光诱导荧光检测器检测(λ_{ex} =488 nm, λ_{em} =520 nm), P/ACE System station 数据处理软件采集数据.

2 结果与讨论

为了建立一个适合于分离较大范围内限制性内切酶酶切产物的 CE 分离体系, 本实验以 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 中的 26 bp 与 34 bp, 111 bp 与 147 bp, 489 bp 与 501 bp 为研究对象, 这三对 DNA 片段之间碱基数目相差较少, 考察其分离能够更好地说明 MC 分离 DNA 片段的能力. 本文考察了 CE 过程中各参数(MC 浓度, 筛分介质的 pH, 温度和电场强度)对 DNA 分离的影响. 上述三对片段的分离度分别记为 Rs_1 , Rs_2 , Rs_3 .

2.1 MC 浓度对 DNA 分离的影响

MC 在浓度超过 2%时就会很难溶解, 且黏度大, 因

此将 MC 溶于 $1 \times$ TBE 缓冲液中配制成浓度分别为 0.4%, 0.8%, 1.2%, 1.6%, 2.0%, 2.2% 的筛分介质, 10 kV 电压进样 10 s, 电场强度为 200 V/cm, 温度为 25 °C, pH 为 8.2, 用此 6 个浓度分离 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 时得到电泳图, 见图 1. 不同浓度的 MC 对上述几个片段分离度的影响见图 2.

实验结果显示, MC 浓度对 DNA 分离影响较大, 尤其对于较小(26, 34 bp)和较大(489, 501 bp)片段的影响显著. 随着 MC 浓度的增加, 碱基对的分度度均有所升高, 至 MC 浓度达到 2.0% 后, 继续增大浓度, 分度度又呈下降趋势. 这是因为筛分介质的浓度增大则筛分孔径减小, 对于小于 500 bp 的 DNA 片段可以使它们之间差异增大, 从而使分度度增大, 但是继续增加浓度, 可能导致筛分介质黏度增加, 对 DNA 分子的迁移时间延长. 随着浓度的升高聚合物溶液黏度增加, 使灌柱和冲洗都比较费时费力, 因此选择 2.0% 的浓度来进行电泳分离.

2.2 筛分介质的 pH 的影响

筛分介质的 pH 影响 DNA 在毛细管中的分离, 主要考察了筛分介质的 pH 在 7.0~9.0 之间变化时(MC 浓度为 2.0%, 毛细管温度为 25 °C, 10 kV 电压进样 10 s, 电场强度为 200 V/cm)对上述三个分离度影响(图 3).

pH 影响毛细管内 MC 和管壁表面的相互作用状态, 同时也影响 DNA 的荷电状态, 从而影响其迁移速度. 它还影响筛分介质组分的电离度, 即影响有效电荷的多少, 从而引起迁移率的变化. 结果显示, pH 值对较小和较大的 DNA 片段影响较大, 在 pH 8.0 时三个分离度均达到最大值.

2.3 温度和电场强度的影响

温度的变化会影响 DNA 的分离. 本文主要考察了 15~35 °C 之间的 5 个温度对 DNA 分离的影响, MC 浓度为 2.0%, pH 值 8.0, 10 kV 电压进样 10 s, 电场强度为 200 V/cm 得到上述 3 个分离度变化情况见图 4.

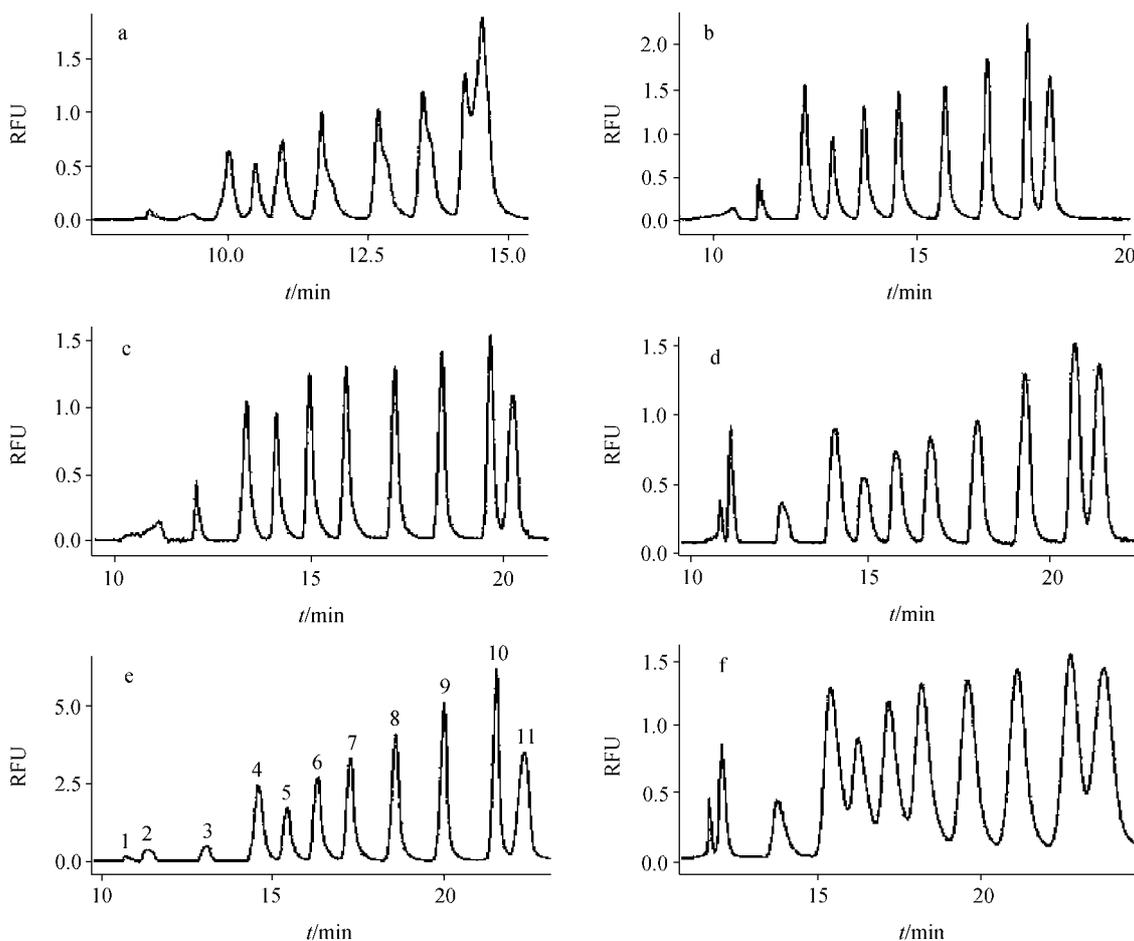


图 1 不同筛分介质浓度下 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 电泳图

Figure 1 Electropherograms of pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker under different concentration of methyl cellulose (MC) Concentration of MC: 0.4%~2.2%, voltage injection: 10 s at 10 kV, electric field strength: 200 V/cm, temperature: 25 °C, pH 8.2

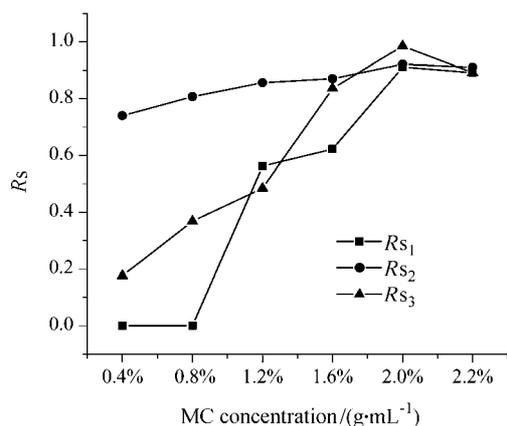


图2 不同浓度 MC 对 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 中片段分离度的影响

Figure 2 The effects of concentration of methyl cellulose on DNA fragments of pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker resolution

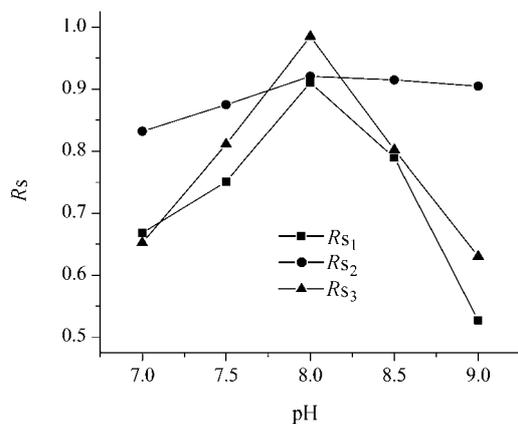


图3 不同 pH 下分离度变化图

Figure 3 Variation of resolution under different pH

Concentration of MC: 2.0%, voltage injection: 10 s at 10 kV, electric field strength: 200 V/cm, temperature: 25 °C

温度主要影响筛分介质的黏度和筛分孔径的大小。温度较低时, 筛分介质黏度增大, DNA 片段迁移时间延长, 分离度变差; 随着温度的升高, 介质黏度减小, DNA 片段迁移速率增大, 使某些碱基对数目接近的片段分离变差; 另一方面, 温度升高, MC 分子在筛分溶液中运动活跃, 造成筛分孔径减小, 分离变差。结果显示, 较小和较大片段的分离度受温度影响较大, 实验中选择 25 °C 为电泳分离的最适温度。

电场强度在 150~300 V/cm 之间变化时上述 DNA 之间三个分离度大小变化情况见图 5。

电场强度对分离的影响主要表现在对 DNA 片段电泳淌度的影响, 较低的电场强度产生较小的牵引力, DNA 片段的迁移时间延长, 峰增宽, 弥散性增强, DNA 分离度降低; 较高的电场强度使迁移速度快, 各片段迁移速率的差别减小, 分离选择性变差, 这是因为随着电

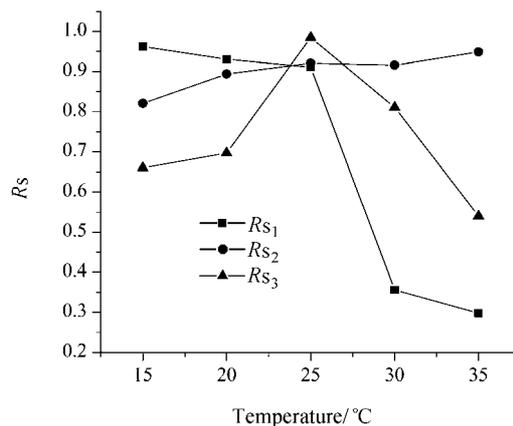


图4 不同温度对 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 中片段分离度的影响

Figure 4 The effects of temperature on DNA fragments of pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) Marker resolution

Concentration of MC: 2.0%, voltage injection: 10 s at 10 kV, electric field strength: 200 V/cm, pH 8.0

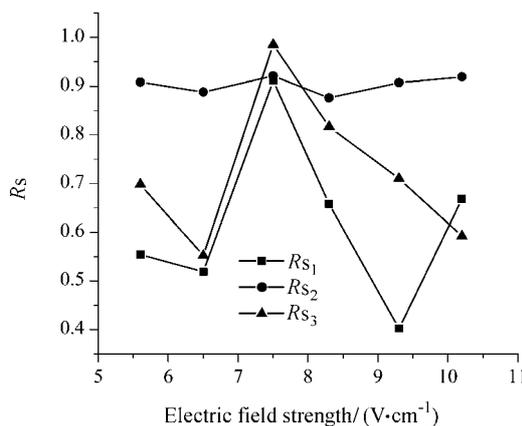


图5 不同电场强度对 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 中片段分离度的影响

Figure 5 The effects of electric field strength on DNA fragments of pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker resolution

Concentration of MC: 2.0%, voltage injection: 10 s at 10 kV, temperature: 25 °C, pH 8.0

场强度的增大, DNA 片段在电泳时会沿电场方向定向伸展, 电场强度越高, 伸展程度增大, 造成谱带展宽, 分离变差。结果显示, 电场强度在 200 V/cm 时 3 个分离度均达到较大值。

2.4 最佳分离条件

通过以上条件的优化, 得到了分离 DNA 片段的最佳分离条件: MC 浓度 2.0%, pH 值 8.0, 毛细管温度 25 °C, 电场强度 200 V/cm。最佳分离 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 电泳图见图 6, 所有的 DNA 片段得到了基线分离, 且分离在 25 min 内完成, 分离时间短。

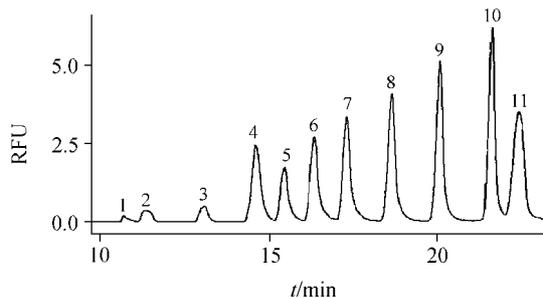


图 6 毛细管电泳分析 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 电泳图谱

Figure 6 Electropherogram of pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker by CE

1—26 bp; 2—34 bp; 3—67 bp; 4—110, 111 bp; 5—147 bp; 6—190 bp; 7—242 bp; 8—331 bp; 9—404 bp; 10—489 bp; 11—501 bp

2.5 CE-RFLP 分析临床样品

在该分离条件下,应用 CE-RFLP 方法检测癌组织及癌旁正常组织的 PCR 扩增产物的酶切产物,分析基因突变情况.图 7a 为 12 密码子野生型电泳图;图 7b 为 12 密码子突变型电泳图.由图显示,所建立的 CE-RFLP 方法能够快速完成胃癌中 H-ras 基因 12 位密码子突变情况的检测.

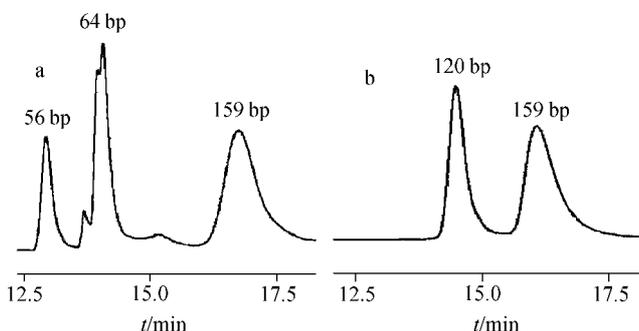


图 7 CE-RFLP 分离 DNA 样品电泳图

(a) 12 位密码子野生型电泳图; (b) 12 位密码子突变型电泳图

Figure 7 Electropherogram of DNA of clinical samples by CE-RFLP

(a) Electropherograms of wild type at codon 12; (b) Electropherograms of mutant at codon 12

图 7 表明所建立的方法可用于 H-ras 基因 12 密码子野生型和突变型检测,该方法能使酶切后野生型形成 56, 64, 159 bp 3 条 DNA 片段;突变型形成 120, 159 bp 2 条 DNA 片段得到基线分离.本文在 59 例胃癌标本检测出 5 例 H-ras 基因发生突变, ras 基因点突变率为 11.11%, 国外文献报道, ras 基因突变率在胃癌中在 10% 以下^[13,14], 其检测结果高于文献报道检测的点突变率, 这可初步判断与本文使用灵敏的检测方法有关.

3 结论

尽管文献已有报道应用其它的筛分介质对 DNA 样品进行分离检测,但运用 MC 作为筛分介质建立的 CE-RFLP 分析方法检测基因突变点的文献未见报道.本文探索性地利用 MC 简单、方便、易于得到等优点,建立以 MC 为筛分介质的 CE-RFLP 分析方法. MC 作为筛分介质克服了用线性聚丙烯酰胺(LPA)做筛分介质时黏度大,容易堵塞毛细管柱,合成困难等缺点,同时证明 MC 是一种良好的筛分介质^[15].利用 MC 为筛分介质建立的 CE-RFLP 分析方法非常适合检测癌组织中基因突变情况.

同时,实验结果表明,MC 浓度,筛分介质的 pH, 温度和电场强度的变化对 DNA 的片段长度为 26 bp 与 34 bp 之间分离度 Rs_1 , 111 bp 与 147 bp 之间分离度 Rs_2 , 489 bp 与 501 bp 之间分离度 Rs_3 的影响不同,其中对 Rs_1 和 Rs_3 影响较大,而对 Rs_2 影响较小.因此,在分离小于 50 bp 片段和分离 500 bp 左右片段 DNA 时考虑使用 MC 作为筛分介质,可以得到较好的分离结果.

References

- 1 Ren, J. J. *Chromatogr. B* **2000**, *741*, 115.
- 2 Lin, B. C. *Instruction of Capillary Electrophoresis Analysis*, Science Press, Beijing, **1996**, pp. 1~32 (in Chinese). (林炳承, 毛细管分析导论, 科学出版社, 北京, **1996**, pp. 1~32.)
- 3 Shi, X.-Z.; Li, J.-H.; Zhao, C.-X.; Lv, S.; Yang, Q.; Xu, G.-W. *Chin. J. Anal. Chem.* **2005**, *33*, 177 (in Chinese). (石先哲, 李建华, 赵春霞, 吕申, 杨青, 许国旺, 分析化学, **2005**, *33*, 177.)
- 4 Jia, H.; Jia, Z.-P.; Wang, R.; Chen, Q.-Y.; Xie, H.; Ma, J. J. *Lanzhou Univ. (Med. Sci.)* **2006**, *32*, 7 (in Chinese). (贾海, 贾正平, 王荣, 陈巧云, 谢华, 马骏, 兰州大学学报医学版, **2006**, *32*, 7.)
- 5 Jia, H.; Wang, R.; Jia, Z.-P.; Chen, Q.-Y.; Xie, H.; Ma, J. *Chin. J. Anal. Chem.* **2007**, *35*, 1347 (in Chinese). (贾海, 王荣, 贾正平, 陈巧云, 谢华, 马骏, 分析化学, **2007**, *35*, 1347.)
- 6 Ru, Q.; Jing, H.; Luo, G.; Huang, Q. *J. Chromatogr. A* **2000**, *894*, 171.
- 7 Mitchell, C. E.; Belinsky, S. A.; Lechner, J. F. *Anal. Biochem.* **1995**, *224*, 148.
- 8 Chen, Q.-Y.; Wang, R.; Jia, Z.-P.; Wang, Y.-Q.; Liu, Y.-Y.; Xie, H.; Ma, J. *Chin. J. Anal. Chem.* **2007**, *35*, 1305 (in Chinese). (陈巧云, 王荣, 贾正平, 王业秋, 刘圆圆, 谢华, 马骏, 分析化学, **2007**, *35*, 1305.)
- 9 Yu, J.; Zhang, J.-K.; Yi, C.-Q. *Tumor* **1994**, *14*, 327 (in Chinese).

- (于君, 张锦坤, 易粹琼, 肿瘤, **1994**, *14*, 327.)
- 10 Wang, J.-R.; Deng, G.-R.; Liu, W.-W.; Lv, Y.-Y.; Wang, B. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae* **1993**, *15*, 91 (in Chinese).
(王俊茹, 邓国仁, 刘为汶, 吕有勇, 王冰, 第三军医大学学报, **1993**, *15*, 91.)
- 11 Gu, H.-L.; Dong, J. *Acta Acad. Med. QingDao Univ.* **2006**, *42*, 56 (in Chinese).
(顾华丽, 董静, 青岛大学医学院学报, **2006**, *42*, 56.)
- 12 Shi, W.; Zhang, Y.-K.; Chen, N.; Zhang, J.; Wang, L.; Zou, H.-F. *Chin. J. Anal. Chem.* **1998**, *26*, 1 (in Chinese).
(施维, 张玉奎, 陈农, 张津, 王磊, 邹汉法, 分析化学, **1998**, *26*, 1.)
- 13 Mariyama, M.; Kishi, K.; Nakamura, K.; Obata, H.; Nishimura, S. *Jpn. J. Cancer Res.* **1989**, *80*(7), 622.
- 14 Nanus, D. M.; Kelsen, D. P.; Mentle, I. R.; Altorki, N.; Albino, A. P. *Gastroenterology* **1990**, *98*(4), 955.
- 15 Endo, Y.; Zhang, L.; Katashima, R.; Itakura, M.; Doherty, E.; Barron, A. E.; Baba, Y. *Electrophoresis* **2005**, *26*, 3380.

(A0801024 Zhu, H.; Chen, J.; Dong, H.)