# 毛细管电泳法检测肺癌 p53基因第七外显子的突变

刘 勇[1,2] 王 荣*[1,2] 高 岚[2] 贾正平[1] 辛晓婷[1,2] 谢 华[1] 马 骏[1]
[1](兰州军区兰州总医院临床药理基地, 兰州 730050) [2](兰州大学生命科学学院, 兰州 730000)

摘 要 p53基因点突变在肺癌的发生过程中起重要作用, 检测基因点突变的方法学研究将有助于临床准确诊断肺癌。本实验用 PCR扩增包含 249位密码子的肺癌及癌旁正常组织 p53基因第七外显子, 扩增样品分别经 96℃变性和 HaeⅢ酶切处理, 以 CE-SSCP、CE-RFLP、PAGE-SSCP和 PAGE-RFLP对其突变情况进行检测, 并从上样量、时间、检出限和检出率 4个方面进行比较。PAGE凝胶浓度为 15%; CE筛分介质 PEO浓度 3.0%, pH 8.2, 电压 15 kV, 温度 15℃, $\lambda_{ex}$ = 488 nm, $\lambda_{em}$ = 520 nm荧光检测。检出率由高到低分别为: CE-SSCP> PAGE-SSCP> CE-RFLP> PAGE-RFLP。CE-SSCP可作为大规模肺癌早期诊断的简便可靠的方法。

关键词 肺癌, 基因突变, 毛细管电泳, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 单链构象多态性, 限制性片段长度多态性

## 1 引 言

p53基因是一个具有独特作用的抑癌基因, 突变后具有癌基因作用, 一直是癌症研究的热点[1], 是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 其第七外显子是突变的集中区域, 237~ 249氨基酸位置的基因编码区是一个高度保守区密切相关的热点区[2]。通过对肺癌相关基因的研究, 将有助于肺癌早期诊断和治疗方案的制定, 降低死亡率, 促进其它癌症诊断方法学的研究。

常用检测基因突变的方法有: 单链构象多态性 (SSCP)、限制性片段长度多态性 (RFLP)、温度梯度凝胶电泳 (TGGE)、变性梯度凝胶电泳 (DGGE)、DNA芯片技术、DNA测序等, 其中 SSCP和 RFLP使用最为广泛。这些方法大多与聚合酶链式反应 (PCR)相结合, 检测手段依赖平板凝胶电泳, 在准确性、灵敏度、检测成本及时间等方面存在不足[3,4]。近年来, 越来越多的研究者将毛细管电泳 (CE)用于检测基因突变的研究中。Mitchelson等[5]用 CE对基因点突变进行了筛查; Fehnlee等[6]研究了 CE在临床诊断 DNA方面的潜在作用; 施维等[7]用自制线性聚丙烯酰胺凝胶电泳柱对寡聚核苷酸的分离进行了研究。越来越多的研究表明, 与其它检测技术相比, CE具有高效、快速、样品用量少、自动化程度高等优点, 在核苷酸分析方面具有独特的优越性。

本实验采用 SSCP, RFLP结合聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE)以及 CE对肺癌 p53基因突变进行研究, 并对这些方法进行了比较, 为寻找科学准确的基因诊断方法提供依据。

## 2 实验部分

### 2.1 仪器与试剂

P/ACE System 5000型毛细管电泳仪、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公司); 石英毛细管柱 (河北永年光导纤维厂)。

聚环氧乙烷 (PEO, $M_r$ = 300000); 限制性内切酶 HaeⅢ (TaKaRa); 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); 三羟甲基氨基甲烷 (Tris, 上海山浦化工有限公司); 硼酸、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA, 天津化学试剂厂); SYBR GreenⅠ核酸染料 (厦门百维信公司); pUC19 DNA/MspⅠ (HpaⅡ) DNA Marker(上海生物工程技术有限公司)。

肺癌及癌旁正常组织各 40例取自兰州军区兰州总医院病理科, 所有标本均来自肺部切除并经病理切片证实。

2009-03-04收稿; 2009-06-13接受
* E-mail: wangrong-69@163.com

**2 2** 组织 **DNA** 提取, 引物设计及 **PCR** 扩增

酚-氯仿法提取肺癌及癌旁正常组织基因组 DNA。PP5. 0软件设计 p53基因第七外显子, 包含 249位密码子突变位点的引物, 该位点突变后能引起限制性内切酶 HaeⅢ酶切位点(GGCC)消失, 引物由上海生物工程技术有限公司合成。上游: 5′-TAT CTC CTA GGT TGG CTC TG-3′, 下游: 5′-TGA CCT GGA GTC TTC CAG T-3′, 长度为 124 bp。PCR 扩增条件: 94 ℃变性 30 s, 60 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 30 s, 共 28个循环。

**2 3** **PAGE-SSCP** 检测

扩增产物加入 1/6体积上样缓冲液, 96 ℃变性 15 min, 冰浴 5 min, 立即上样 3 μL, 凝胶浓度为 15%, 125 V 电泳 8 h; 凝胶作常规 $AgNO_3$ 染色。

**2 4** **PAGE-RFLP** 检测

酶切体系(30 μL): HaeⅢ 5U、扩增产物 9 μL、三次蒸馏水 18 μL、缓冲液 2 μL。37 ℃水浴 1 h, 升至 80 ℃灭活 20 min。扩增产物经酶切后, 以 15% PAGE检测, 样品中加入 1/6体积上样缓冲液, 125 V 电泳 6 h; 常规 $AgNO_3$ 染色。

**2 5** **CE-SSCP** 和 **CE-RFLP** 检测

参考文献[6]的方法涂层毛细管柱, $\lambda_{ex}$ = 488 nm, $\lambda_{em}$ = 520 nm 荧光检测, P/ACE System station数据处理软件采集数据。变性处理与酶切样品 22 μL分别加入 5 μL TBE, 3 μL SYBR GreenⅠ, 混匀后负极电动进样。采用实验室已确定的 PEO 分离 pUC19 DNA/MspⅠ (HpaⅡ) DNA Marker最佳条件, 对肺癌 p53基因的突变情况进行检测。

## 3 结果与讨论

**3 1** 最佳分离条件

CE 分离 pUC19 DNA/MspⅠ (HpaⅡ) DNA Marker的最佳条件[8]: 3. 0% PEO, pH 8. 2, 电压 15 kV, 温度 15 ℃。由图 1可见, 所有 DNA片段基本得到基线分离, 电泳在 15 min内完成, 分离效果好, 时间短。

**3 2** **PCR** 扩增结果

1. 5%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 目的片段长度为 124 bp。由图 2可见目的片段扩增成功。

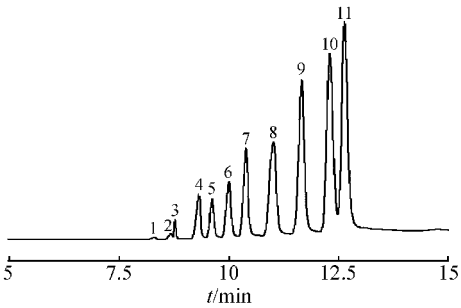


图 1　毛细管电泳分离 pUC19 DNA/MspⅠ (HpaⅡ) DNA Marker结果

Fig 1　Result of pUC19 DNA/MspⅠ (HpaⅡ) DNA Marker separation 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。

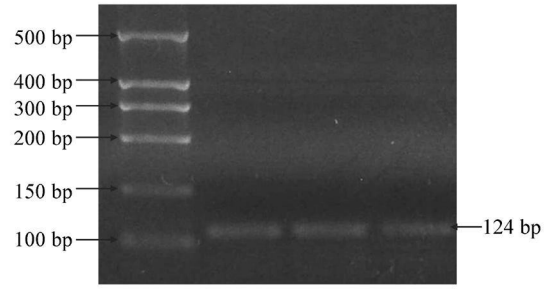


图 2　p53基因第七外显子扩增结果

Fig 2　Result of p53 gene exon 7 amplification

M. DL500™ DNA Marker　1. 癌旁正常组织(Normal tissue), 2, 3. 肺癌组织(Lung cancer tissue)。

**3 3** **PAGE-SSCP** 结果

双链 PCR产物发生变性, 与正常对照组相比, PAGE 可得到 3种异常迁移带型: 两条单链带皆发生迁移、多出一条或多出两条单链带, 这些都是异常的单链 DNA(ss)迁移, 由此可判断产物发生了碱基改变。

对凝胶浓度进行考察: 配制 8%、10%、12%和 15%的凝胶, 浓度为 8% ~ 12%时, 电泳时间较短, 约 5~ 7 h, 但 DNA 双链(ds)与 ss, ss与 ss之间距离较近, 不易区分; 浓度为 15%时, 效果较好, 电泳时间约

8 h。本实验采用的凝胶浓度为 15%,结果如图 3所示:由图 3可见 2~ 5均有异常条带迁移,所有样品中均有 dsDNA,以及癌旁正常组织变性得到的 ssDNA。

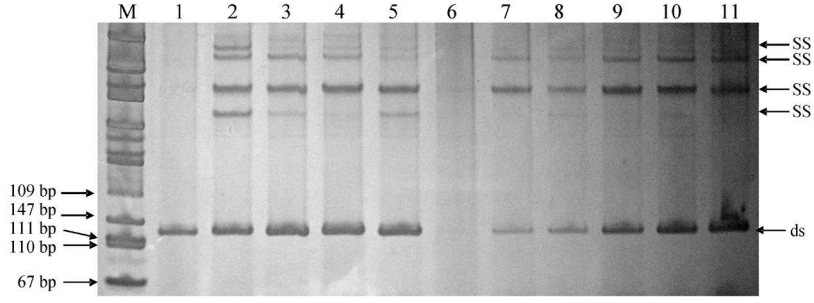


图 3 PAGE-SSCP结果

Fig. 3 Result of PAGE-single strand conformation polymorphism (SSCP)

M. pUC19 DNA/MspⅠ (HpaⅡ) DNA Marker; 1. 癌旁正常组织-未变性 (Normal tissue-non-denaturation); 2~ 5. 肺癌组织-变性 (Lung cancer tissue-denaturation); 6. 空白 (blank); 7~ 11. 癌旁正常组织-变性 (Normal tissue-denaturation)。ss. 单链 DNA (Single strand DNA); ds. 双链 DNA (Double strand DNA)。

### 3.4 PAGE-RFLP结果

突变常引起某一区域酶切位点消失,或产生新的酶切位点。用适当的限制性内切酶进行酶切,突变基因产生与正常基因长度不同的片段可用于判断突变的发生。PAGE-RFLP结果见图 4。

扩增产物经酶切后,癌旁正常组织得到 85和 39 bp两条片段;肺癌组织为 124 bp一条片段。理论上 15%凝胶最小可分离 25 bp DNA片段,但实验过程中癌旁正常组织 39 bp这条小片段接近分离低限,PAGE通常检测不到。

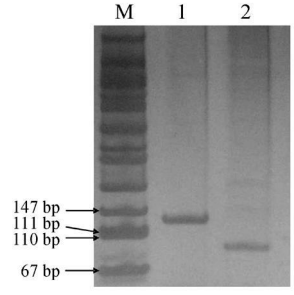


图 4 PAGE-RFLP结果

Fig. 4 Result of PAGE-restriction fragment length polymorphism (RFLP)

M. pUC19 DNA/MspⅠ (HpaⅡ) DNA Marker; 1. 肺癌组织 (Lung cancer tissue); 2. 癌旁正常组织 (Normal tissue)。

### 3.5 CE-SSCP结果

PCR反应剩余物质在紫外检测的 ds之前会产生一些杂峰,采用荧光检测可消除杂峰干扰[8],本实验采用荧光检测,结果见图 5。

图 5a为变性癌旁正常组织扩增样品,10 min前一条未变性完全 ds,12.5~ 15.0 min有两条 ss,图 5b和 5c为变性的具代表性肺癌组织,除有正常样品的 ds,ss外,还具有异常 ss。

### 3.6 CE-RFLP结果

癌旁正常组织和肺癌组织扩增产物酶切后进行 CE检测 (见图 6),10 min内即可完成。对于 PAGE-RFLP检测不出的 39 bp这条小片段,CE则能够清晰地检测到。

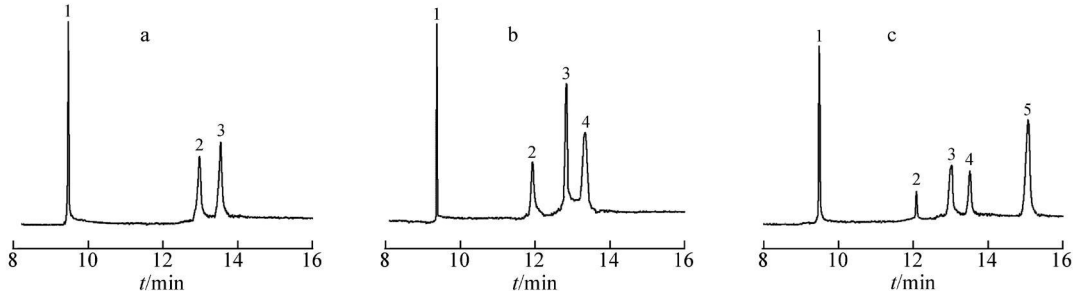


图 5 CE-SSCP结果

Fig. 5 Result of CE-SSCP

a. 癌旁正常组织 (Normal tissue); b, c. 肺癌组织 (Lung cancer tissue), 1. ds (Double strand); 2, 3. 癌旁正常组织变性后野生型 ss (Denaturated wild type single strand of normal tissue); 4, 5. 肺癌组织变性后突变型异常 ss (Denaturated mutant type single strand of lung cancer tissue)。

### 3.7 4种检测方法的比较

根据以上实验结果, 从上样量、时间、检出限及检出率 4个方面对 4种方法进行评价, 结果见表 1。

检出率从高到低为: CE-SSCP > PAGE-SSCP > CE-RFLP > PAGE-RFLP。40例癌旁正常组织中, 4种方法均未检测到基因突变。

以上结果可以看出, CE各个方面都优于 PAGE检测方法: 完成一次电泳只需要几十分钟, 结合荧光检测, 无需染色过程节省大量时间, 并且上样量为 nL级, 检出限与检出率比 PAGE高, 分析时间短、分辨率高、样品用量少、自动化程度高等优点对于临床检测基因突变十分重要。

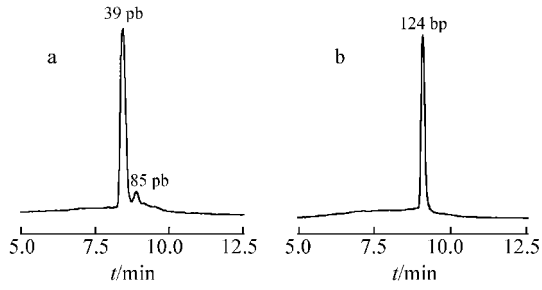


图 6　CE-RFLP结果

Fig. 6　Result of CE-RFLP

a. 癌旁正常组织 (Normal tissue); b. 肺癌组织 (Lung cancer tissue)。

表 1　检测方法比较

Table 1　Comparison of detection methods

| | | PAGE | | CE | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | SSCP | RELP | SSCP | RFLP |
| | 上样量 Sample volume | 3~5 μL | 3~5 μL | nL | nL |
| 时间 Time | 样品处理 Sample treatment | 20 min | ~90 min | 20 min | ~90 min |
| | 检测过程 Detection process | ~7 h | ~7 h | ~30 min | ~30 min |
| | 总耗时 Total time-consuming | ~8 h | ~9 h | ~1 h | ~2 h |
| | 检出限 Detection limit[10~11] | 1 ng | 1 ng | $10^{-12}$ mol/L | $10^{-12}$ mol/L |
| 检出率 Detection rate(%) | 癌旁正常组织 Normal tissue | 0(0/40) | 0(0/40) | 0(0/40) | 0(0/40) |
| | 肺癌组织 Lung cancer tissue | 27.5(11/40) | 12.5(5/40) | 35.0(14/40) | 17.5(7/40) |

CE-SSCP与 CE-RFLP相比, 在肺癌组织 p53基因突变检测方面, 检出率分别为 35.0% (14/40)和 17.5% (7/40), CE-SSCP的检出率明显高于 CE-RFLP。因此, SSCP结合 CE不仅能满足临床检验快速, 精确等要求, 而且能在基因突变点检测过程中提供更多的信息。

对于癌症这种复杂的疾病来说, 仅靠一种检测手段来达到精确诊断, 是非常困难的。针对不同种类的疾病采取不同的处理方法, 不断寻找更加准确的检测方法是分析工作者研究的重要工作。

## References


1　Li Da-Hu(李大虎), Zhang Ling-Qiang(张令强), He Fu-Chu(贺福初). *Hereditas*(遗传), **2008**, 30(06): 697~703

2　Chen Qiao-Yun(陈巧云), Wang Rong(王 荣), Jia Zheng-Ping(贾正平), Wang Ye-Qiu(王业秋), Liu Yuan-Yuan(刘圆圆), Xie Hua(谢 华), Ma Jun(马 骏). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **2007**, 35(9): 1305~1308

3　Nollau P, Wagener C. *Clin. Chem.*, **1997**, 43(7): 1114~1128

4　Righetti P G, Gelfi C. *Electrophoresis*, **1997**, 18(10): 1709~1714

5　Mitchelson K R, Cheng J, Kricka L J. *Tibtech*, **1997**, 15(11): 448~458

6　Fehnlee T A, Oda R P, Persing D A, Landers J P. *J. Chromatogr. A*, **1995**, 717(1~2): 127~137

7　Shi Wei(施 维), Zhang Yu-Kui(张玉奎), Chen Nong(陈 农), Zhang Jin(张 津), Wang Lei(王 磊), Zou Han-Fa(邹汉法). *Chinese J. Anal Chem.* (分析化学), **1998**, 26(1): 1~6

8　Xin Xiao-Ting(辛晓婷), Wang Rong(王 荣), Jia Zheng-Ping(贾正平), Xie Hua(谢 华), Gao Lan(高 岚), Liu Yong(刘 勇), Liu Yuan-Yuan(刘圆圆), Ma Jun(马 骏). *Journal of Instrumental Analysis*(分析测试学报), **2009**, 28(4): 379~384

9　Jing Hui-E(敬慧娥), Liu Ji(刘 戟), Ru Qin-Hua(茹钦华), Deng Ying-Ping(邓应平), Luo Guo-An(罗国安), Huang Qian(黄 倩). *Chinese Journal of Medical Genetics*(中华医学遗传学杂志), **2001**, 18(4): 317~321

10　Liao Xiang(廖 翔), Ying Tian-Yi(应天翼), Huang Liu-Yu(黄留玉), Huang Pei-Tang(黄培堂). *Letters in Biotechnology*(生物技术通讯), **2003**, 14(6): 522~524

11　Lu W, Han D S, Yuan J, Andrieu J M. *Nature*, **1994**, 368(6468): 269~271

# Methodology Research on P53 Gene Mutation Detection Exon 7 of Lung Cancer by Capillary Electrophoresis with Single Strand Conformation Polymorphism and Restriction Fragment Length Polymorphism

LIU Yong[1,2], WANG Rong*[1,2], GAO Lan[2], JIA Zheng-Ping[1], XIN Xiao-Ting[1,2], XIE Hua[1], MA Jun[1]

[1](*Department of Pharmacy, Lanzhou General Hospital of the Chinese People's Liberation Army, Lanzhou 730050*)

[2](*Life Science college, Lanzhou university, Lanzhou 730000*)

**Abstract** P53 gene point mutation is important in the occurrence of lung cancer, and methodology research on gene mutation detection is useful to exactly diagnose clinical lung cancer. P53 gene exon 7 simultaneously containing 249 codon was amplified by PCR. Then amplified samples were denatured at 96 ℃ and digested by HaeIII. The point mutation of p53 gene exon 7 simultaneously containing 249 codon was detected by CE-single strand conformation polymorphism (SSCP), CE-restriction fragment length polymorphism (RFLP), PAGE-SSCP and PAGE-RFLP. The advantage of four methods from four respects that contain: inject volume, time, detection limit and detection rate were compared. PAGE condition included the concentration of polyacrylamide gel 15%. CE detection condition included concentration of sieving medium PEO 3.0%, pH 8.2, separation voltage 15 kV, temperature 15 ℃, $\lambda_{ex}$ = 488 nm, $\lambda_{em}$ = 520 nm. The results reveal that the order from good to bad is: CE-SSCP > PAGE-SSC > CE-RFLP > PAGE-RFLP. CE can offer a convenient and reliable method to early diagnosis of lung cancer at large scale.

**Keywords** Lung cancer; gene mutation; capillary electrophoresis; polyarclymide gel electrophoresis; single strand conformation polymorphism; restriction fragment length polymorphism

(Received 4 March 2009; accepted 13 June 2009)

---

# 《液相色谱质谱联用技术在食品和药品分析中的应用》

随着现代仪器分析的发展,液相色谱质谱联用技术(LC/MS)日趋成熟,并在科研与生产中发挥了重要作用。该书由三部分组成:第一部分基础理论,介绍了液相色谱和质谱的工作原理、仪器结构及工作条件、LC/MS接口、质谱信息解析;第二部分食品功能成分分析,介绍了LC/MS方法分析食品中的蛋白质和肽、低聚糖、皂苷、核苷、黄酮、维生素、甾醇等功能成分及有害残留物;第三部分药品分析,介绍了采用LC/MS技术对化学合成药物、抗生素、中药、天然药物等进行成分和杂质分析,及其药物代谢研究中的应用。在食品和药物分析部分,通过具体的实例,详述了样品处理、分析条件、结构鉴定等完整的分析过程,具有很高的参考价值。该书可供从事食品和药品生产和检测人员及相关监管部门工作人员阅读,使用,也可供仪器分析、有机合成、药品和食品研究人员参考。

该书由盛龙生、汤 坚 编著,化学工业出版社出版,定价 39.00元。