

毛细管电泳法检测胃癌 APC 基因 第十一外显子的杂合缺失

谢希晖^{1,2}, 王 荣^{1,2}, 谢 华², 贾正平^{1,2}, 张爱梅³, 孟宪栋², 马 骏²

(1. 兰州大学 药学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州军区兰州总医院 临床药理基地, 甘肃 兰州 730050; 3. 西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 采用聚合酶链反应(PCR)扩增了胃癌及癌旁正常组织中 APC 基因易发生杂合缺失的第十一外显子的部分碱基序列, 扩增样品分别经 96 °C 变性和 Rsa I 酶切处理, 以毛细管电泳(CE) - 单链构象多态性(SS-CP)、CE - 限制性片段长度多态性(RFLP)、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) - SSCP 对其杂合缺失情况进行检测。PAGE 凝胶浓度为 15%。CE 检测条件: 以 3.0% 聚环氧乙烷(PEO)为筛分介质, 1 × TBE(pH 8.2) 为电泳缓冲液, 分离电压 15 kV, 温度 15 °C, 结合激光诱导荧光($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$) 检测。不同方法的检出率由高到低分别为: CE - SSCP(30%) > PAGE - SSCP(25%) > CE - RFLP(20%)。并证实了 APC 基因易发生杂合缺失在胃癌组织中的突变率高于 10%, 且 CE - SSCP 方法较 PAGE - SSCP 和 CE - RFLP 的检出率高。CE - SSCP 检测方法具有快速、灵敏度高等优点, 可为建立简便可靠的胃癌临床早期诊断方法奠定基础。
关键词: 胃癌; 杂合缺失; 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
中图分类号: O657.8; Q754 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 4957(2011)05 - 0498 - 05

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.05.005

Methodology Research on Loss of Heterozygosity of APC Gene Detection Exon 11 of Gastric Cancer by Capillary Electrophoresis

XIE Xi-hui^{1,2}, WANG Rong^{1,2}, XIE Hua², JIA Zheng-ping^{1,2},
ZHANG Ai-mei³, MENG Xian-dong², MA Jun²

(1. Pharmacy College, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. State Base for Drug Clinical Trails, Lanzhou General Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China; 3. Life Science College, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In this paper, the part base sequences of APC gene on exon 11 were extracted from normal tissue and gastric cancer tissue and amplified by polymerase chain reaction(PCR), which contains some bases easily resulting in loss of heterozygosity(LOH). Then the amplified samples were denatured at 96 °C and digested by restriction enzyme of Rsa I and detected by capillary electrophoresis(CE) - single strand conformation polymorphism(SSCP), capillary electrophoresis - restriction fragment length polymorphism(RFLP) and polyacrylamide gel electrophoresis(PAGE) - SSCP. The concentration of polyacrylamide gel was selected to be 15%. The analysis of APC gene on exon 11 was performed by CE combined with laser-induced fluorescence detector($\lambda_{ex} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 520 \text{ nm}$), by using 3.0% polyethylene oxide(PEO) as sieving medium, 1 × TBE(pH 8.2) as electrophoresis buffer with a separation voltage of 15 kV at 15 °C. The sequence of detection ratios for APC gene detected by different methods was as follows: CE - SSCP(30%) > PAGE - SSCP(25%) > CE - RFLP(20%). The results revealed that the LOH of APC gene in gastric cancer tissue was higher than 10%, and the detection ratio for CE - SSCP was higher than that for PAGE - SSCP and CE - RFLP. Therefore, with the advantages of rapidness and high sensitivity, the CE - SSCP method could lay a good foundation for the convenient, reliable and early diagnosis on gastric cancer.

收稿日期: 2010 - 08 - 01; 修回日期: 2011 - 01 - 10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20775089); 甘肃省自然科学基金资助项目(ZS031 - A25 - 70 - E); 中国博士后基金资助项目(2005037576)

通讯作者: 王 荣, Tel: 0931 - 8994675, E - mail: wangrong - 69@163.com

贾正平, Tel: 0931 - 8994652, E - mail: zhengpingjia@163.com

Key words: gastric cancer; loss of heterozygosity; capillary electrophoresis; polyacrylamide gel electrophoresis; single strand conformation polymorphism; restriction fragment length polymorphism

腺瘤性息肉病基因(Adenomatous polyposis coli, 简称 APC 基因) 位于染色体 5q21, 由 15 个外显子组成。研究发现, 在胃粘膜肠上皮化生、异型增生及胃癌中不仅存在 APC 基因突变, 亦存在杂合缺失和蛋白表达异常, 提示 APC 基因以多种方式的失活参与胃癌的发生^[1-7]。国内外关于 APC 基因杂合缺失突变密集区的文献报道较多, 但主要集中在 APC 基因第十一外显子^[8]和第十五外显子 5' 端的一侧^[9-10]。APC 基因缺失是胃癌的早期改变, 通过对胃癌相关基因的研究, 有助于寻找并建立打破传统的胃癌早期诊断和治疗的方法, 降低死亡率, 促进肿瘤诊断方法学的研究。

肿瘤传统的诊断方法无法诊断早期肿瘤。而肿瘤发病的原因中基因突变起着重要的作用, 因此检测基因突变是非常必要的。目前, 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 的使用最为广泛。近年来, 毛细管电泳(CE) 用于检测基因突变的研究日益增多。刘勇等^[11]用含金纳米粒子的筛分介质对不同长度 DNA 片段进行了毛细管电泳分离; Mitchelson 等^[12]用 CE 对基因点突变进行了筛查; Zhang 等^[13]用自制的短链线性聚丙烯酰胺凝胶涂层毛细管对 K-ras 基因突变进行了研究。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、重复性好等优点, 在核苷酸分析方面具有独特的优越性^[14-15]。

本实验采用 PCR 扩增, SSCP、RFLP 结合 PAGE 以及 CE 对胃癌 APC 基因杂合缺失进行研究, 并对这些方法进行了简单比较, 从而为寻找科学准确的基因诊断方法提供依据。

1 实验部分

1.1 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); PCR 扩增仪(杭州晶格科学仪器有限公司)。

聚环氧乙烷(PEO, $M_r = 300\ 000$); 限制性内切酶 Rsa I (Ferment); 丙烯酰胺(上海生物工程技术有限公司)、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, A Johnson Matthey Company); 三羟甲基氨基甲烷(Tris, 北京鼎国生物技术有限公司); 硼酸、乙二胺四乙酸二钠(EDTA, 天津化学试剂厂); TaqDNA 聚合酶、PCR 试剂(北京鼎国生物技术有限公司); SYBR Green I 核酸染料($10\ 000 \times$, $50\ \mu\text{L}/\text{支}$, 厦门百维信公司); pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker(上海生物工程技术有限公司)。

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

1.2 实验方法

1.2.1 组织 DNA 提取、引物设计及 PCR 扩增 DNA 基因组采用蛋白酶 K 消化, 酚-氯仿法提取胃癌及癌旁正常组织基因组 DNA。PP5.0 软件设计 APC 基因第十一外显子突变位点的引物(上海生工合成)。上游: 5'-GCACTACAGGCCATTGCAGAA-3', 下游: 5'-GGCTACATCTCCAAAAGTCAA-3', 长度 133 bp。PCR 扩增反应体系 $25\ \mu\text{L}$ 中含 dNTP $200\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 、TaqDNA 聚合酶 $0.5\ \text{U}/\mu\text{L}$ 、引物 $0.05\ \mu\text{mol}/\text{L}$ 、DNA 模板 $20\ \text{mg}/\text{L}$ 。PCR 反应循环条件: $94\ ^\circ\text{C}$ 变性 $30\ \text{s}$, $55.6\ ^\circ\text{C}$ 退火 $30\ \text{s}$, $72\ ^\circ\text{C}$ 延伸 $30\ \text{s}$, 共 30 个循环。

1.2.2 PCR 产物酶切 用限制性内切酶 Rsa I 切割 PCR 产物, 酶切体系 ($30\ \mu\text{L}$) 含有 Rsa I $10\ \text{U}$ 、扩增产物 $9\ \mu\text{L}$ 、三次蒸馏水 $18\ \mu\text{L}$ 、缓冲液 $2\ \mu\text{L}$, $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴孵育 4 h, 升至 $80\ ^\circ\text{C}$ 灭活 $20\ \text{min}$ 。

1.2.3 PAGE-SSCP 检测 取扩增样品适量, 加入样品体积 1/6 的上样缓冲液, $96\ ^\circ\text{C}$ 变性 $15\ \text{min}$, 立即冰浴 $5\ \text{min}$, 上样 $3\ \mu\text{L}$, 凝胶浓度为 15%, $125\ \text{V}$ 电泳 $8\ \text{h}$, 电泳缓冲液为 $1 \times$ Tris-硼酸(TBE); 凝胶做常规 AgNO_3 染色。

1.2.4 CE-SSCP 和 CE-RFLP 检测 参考文献[16]的方法涂层毛细管柱, 以 $\lambda_{\text{ex}} = 488\ \text{nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} =$

520 nm 进行荧光检测, P/ACE System station 数据处理软件采集数据。向 22 μL 变性处理与酶切样品中分别加入 5 μL TBE、3 μL SYBR Green I, 混匀后负极电动进样。采用 PEO 分离 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 最佳条件, 对胃癌 APC 基因的杂合缺失情况进行检测。

2 结果与讨论

2.1 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 最佳分离条件

CE 分离 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 的最佳条件^[17]: 3.0% PEO, pH 8.2, 电压 15 kV, 温度 15 $^{\circ}\text{C}$ 。其分离结果见图 1。由图可见, 在该条件下, pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 12 条 DNA 片段中有 11 条得到分离, 其中 26 bp 和 34 bp DNA 片段未达到基线分离(峰 1, 2); 110 bp 和 111 bp 两 DNA 片段未能分离(峰 4)。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶检测 PCR 扩增产物

15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物, 电泳结束后, 进行常规 AgNO_3 染色, 并观察结果, 检测结果见图 2。40 例胃癌与癌旁正常组织扩增结果均可见 133 bp 单一目的片段, 说明扩增成功。其中 Marker 为 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker。

2.3 PAGE - SSCP 检测临床样品

将胃癌组织及癌旁正常组织的 PCR 扩增产物经变性后, 进行 PAGE 检测, 结果见图 3。从图 3 可知, 胃癌组织中可得到 3 种异常的迁移带型: 两条单链带均发生迁移、多出或缺少单链带, 属异常的单链 DNA (ss) 迁移, 由此可判断产物发生了碱基改变。样品 1 为癌旁正常组织产物变性所得两条 ss 和未完全变性的 1 条双链 DNA(ds), 胃癌组织样品 6、7、8 与其癌旁正常组织样品 2、3、4 相比均有异常条带迁移或缺失, 所有样品中均有未完全变性的 ds 及癌旁正常组织变性得到的 ss。采用 PAGE - SSCP 检测的 40 例胃癌组织样品中有 10 例发生缺失, 缺失率为 25%。说明 APC 基因缺失与胃癌的发生有着密切的关系。

2.4 CE - RFLP 检测临床样品

突变常引起某一区域的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。APC 基因第十一外显子扩增产物经 Rsa I 酶切后, 若癌旁正常组织得到 48、85、133 bp 3 条峰则可判断该基因为杂合子; 其相应的胃癌组织只得到 48、85 bp 2 条峰或 133 bp 1 条峰可判断该基因为杂合缺失。对癌旁正常组织和胃癌组织扩增产物酶切后进行 CE 检测, 10 min 内即可完成检测, 检测结果见图 4。实验结果显示, 癌旁正常组织得到 48、85、133 bp 3 条峰, 而胃癌组织只得到 48、85 bp 2 条峰, 说明 APC 基因在胃癌组织中存在杂合缺失。在 40 例胃癌组织样品中有 8 例发生杂合缺失, 缺失率为 20%。CE 结合 RFLP 检测

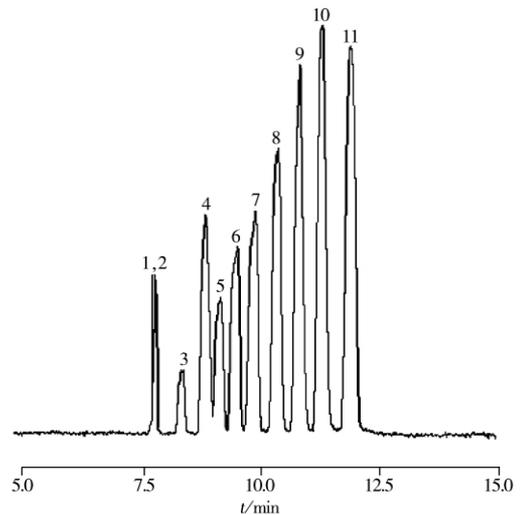


图 1 毛细管电泳检测 pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker 的电泳图

Fig. 1 Electropherogram of pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker separation by CE
DNA (1 - 11): 26, 34, 67, (110, 111), 147, 190, 242, 331, 404, 489, 501 bp

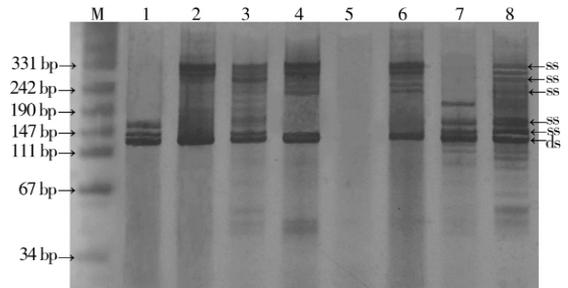


图 3 PAGE - SSCP 检测变性 DNA 样品的电泳图

Fig. 3 Electropherograms of degenerated DNA samples by PAGE - SSCP

M. pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker, 1 - 4. normal tissue - denaturation, 5 - 8. gastric cancer tissue - denaturation; ss. single strand, ds. double strand

与传统的 PAGE 凝胶电泳检测相比, 不仅缩短了检测时间, 而且分离效果较好。

2.5 CE - SSCP 检测临床样品

采用激光诱导的荧光检测器检测临床样品, 结果见图 5。图 5A 为变性胃癌旁正常组织扩增样品的电泳图, 电泳图中在 10 min 前有 1 条未变性完全的 ds, 10~11 min 有 2 条 ss; 图 5B 为变性的代表性胃癌组织的电泳图, 除有正常样品的 ds、ss 外, 还具有异常 ss。经检测, 40 例胃癌组织样品中有 12 例发生缺失, 缺失率为 30%。CE - SSCP 较 PAGE - SSCP 检测具有快速、直观且检出率高等优点。本实验中 CE - SSCP 检测方法比 PAGE - SSCP 检出率提高了 5%, 比 CE - RFLP 检出率提高了 10%, 说明 CE - SSCP 可作为基因突变检测更为简便可靠的方法。

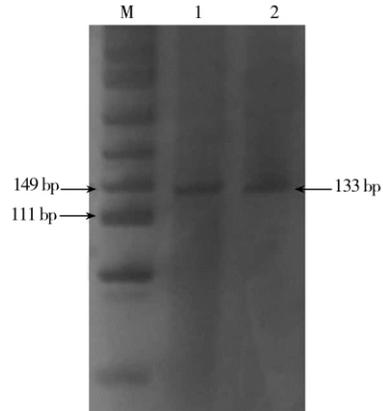


图 2 PAGE 检测 PCR 扩增电泳图
 Fig. 2 Electropherogram of PCR amplification by PAGE
 M. pUC19 DNA/Msp I (Hpa II) DNA Marker,
 1. normal tissue (癌旁正常组织),
 2. gastric cancer tissue (胃癌组织)

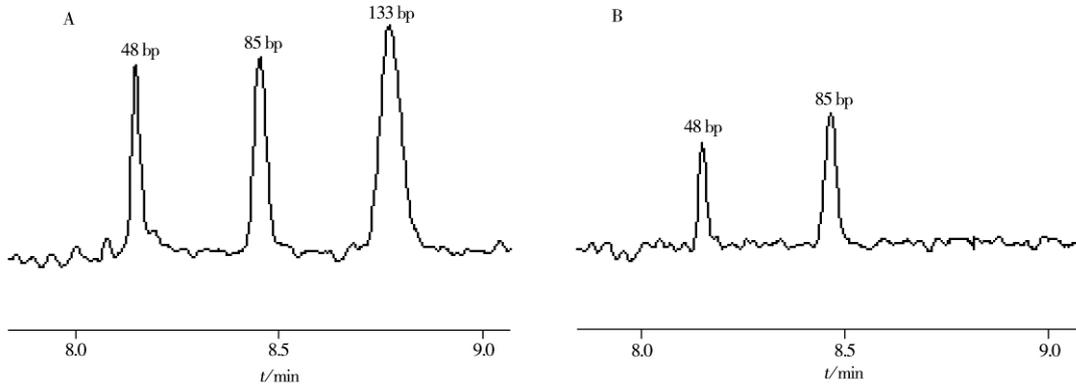


图 4 CE - RFLP 检测 DNA 酶切癌旁正常组织(A) 和胃癌组织(B) 样品的电泳图
 Fig. 4 Electropherograms of enzymes cut DNA samples of normal tissue(A)
 and gastric cancer tissue(B) by CE - RFLP

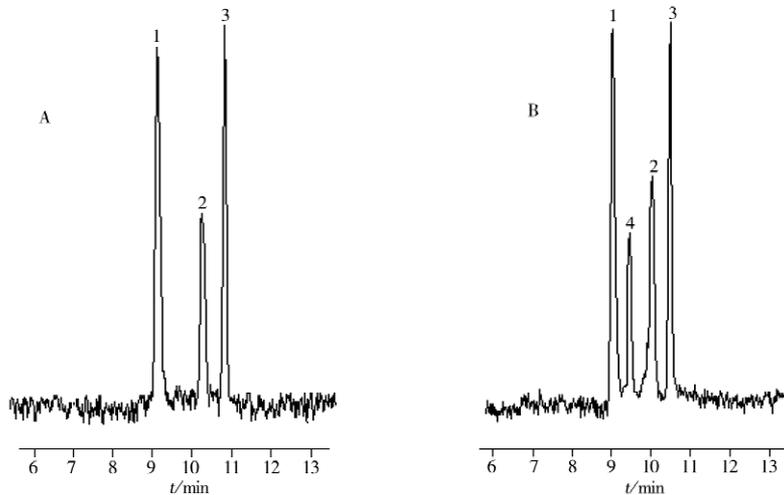


图 5 CE - SSCP 检测变性 DNA 癌旁正常组织(A) 和胃癌组织(B) 的电泳图
 Fig. 5 Electropherogram of degenerated DNA samples of normal tissue(A)
 and gastric cancer tissue(B) by CE - SSCP

1. double strand, 2-3. denaturated single strand of normal tissue(癌旁正常组织变性后的 ss), 4. denaturated mutant type single strand of gastric cancer tissue(胃癌组织变性后的突变型异常 ss)

3 结 论

碱基的缺失、插入、替代是引起基因突变的几个重要方面,同时癌基因的激活与抑癌基因的失活在肿瘤的发生和发展过程中起着重要作用。本实验采用不同方法研究了 APC 基因第十一外显子的缺失情况,发现 APC 基因在胃癌的发生过程中存在杂合性缺失,与文献报道结果一致且检出率有所提高^[18]。CE-SSCP 与 CE-RFLP 对胃癌组织 APC 基因缺失的检出率分别为 30% 和 20%,CE-SSCP 的检出率明显高于 CE-RFLP。SSCP 结合 CE 不仅能满足临床检验快速、准确等要求,同时也为胃癌早期诊断方法的建立提供了有力依据。

参考文献:

- [1] 王东旭,房殿春,刘为纹.胃粘膜肠化生组织中多种抑癌基因的杂合缺失[J].中华病理学杂志,1999,28(4):264-267.
- [2] 宫立群,余龙,尹浩然,王瑞年,邓余,朱正纲,张熙曾,林言箴.胃癌患者 APC 基因突变的分析[J].中华医学杂志,1996,76(11):859-860.
- [3] SATO T, TSUJINO T, YOSHIDA K, NAKAYAMA H, HARUMA K, ITO H, NAKAMURA Y, KAJIYAMA G, TAHARA E. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 1q, 5q and 17p in human gastric carcinoma[J]. Cancer Res, 1991, 51(11): 2926-2931.
- [4] 陆以霞,薛鸿鹏,卢艳红,迟宝荣. APC 基因在胃癌、癌前病变及胃腺瘤中表达意义的研究[J].哈尔滨医科大学学报,2007,41(2):160-162.
- [5] 吴红阳,杨光霖,董聿明.胃癌前病变 APC 抑癌基因原位杂交光镜及电镜观察[J].中华肿瘤杂志,2000,22(4):308-310.
- [6] NAKATSURU S, YANAGISAWA A, ICHII S, TAHARA E, KATO Y, NAKAMUR Y, HORII A. Somatic mutations of the APC gene in gastric cancer: Frequent mutation in very well differentiated adenocarcinoma and signet ring cell carcinoma[J]. Hum Mol Genet, 1992, 1(8): 559-563.
- [7] RHYU M G, PARK W S, JUNG Y J, CHOI S W, MELTZER S J. Allelic deletions of MCC/APC and p53 are frequent late events in human gastric carcinogenesis[J]. Gastroenterology, 1994, 106(6): 1584-1588.
- [8] 刘宝瑞,张学庸,于文彬,张立伟,王晓鸣,蔡晓滨,范渝红,代秀兰. APC、MCC 基因杂合型缺失与胃癌生物学行为的关系[J].中华肿瘤杂志,1996,18(1):3-5.
- [9] 房殿春,罗元辉,杨仕明,李小安,凌贤龙,方丽,刘为纹.多重 PCR 和 DNA 测序技术检测胃癌 APC 基因 15 外显子突变[J].第三军医大学学报,2001,28(8):890-895.
- [10] 宫立群,余龙,尹浩然,王瑞年,朱正纲,林言箴.用 PCR-SSCP 银染方法检测人原发性胃癌 APC 基因点突变[J].中国肿瘤临床,1996,23(11):765-768.
- [11] 刘勇,王荣,高岚,贾正平,辛晓婷,谢华,马骏.含有金纳米粒子的筛分介质对不同长度 DNA 片段的毛细管电泳分离[J].分析测试学报,2009,27(10):1179-1182.
- [12] MITCHELSON K R, CHENG J, KRICKA L J. The use of capillary electrophoresis for point-mutation screening[J]. Trends Biotechnol, 1997, 15(11): 448-458.
- [13] ZHANG Z Z, WU Y M, CHENG W M, WU R J. Single strand conformation polymorphism analysis of K-ras gene mutations by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence(LIF) detector[J]. Clin Chim Acta, 2000, 301(1/2): 205-211.
- [14] 梁琼麟,罗国安,王义明.高效毛细管电泳在核酸、蛋白质分析中的新进展[J].分析化学,2003,31(12):1514-1519.
- [15] RIGHETTI P G, GELFI C. Analysis of clinically relevant, diagnostic DNA by capillary zone and double-gradient gel slab electrophoresis[J]. J Chromatogr: A, 1998, 806(1): 97-112.
- [16] 刘圆圆,王荣,贾正平,郭志强,辛晓婷,谢华,马骏,王娟,李文斌.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[J].化学学报,2009,67(4):323-328.
- [17] 辛晓婷,王荣,贾正平,谢华,高岚,刘勇,刘圆圆,马骏,王娟.毛细管电泳检测肺癌基因突变的方法学研究[J].分析测试学报,2009,28(4):379-384.
- [18] TAMURA G, MAESAWA G, SURUKI Y J, TAMADA H, SATOH M, OGASAWARA S, KASHIWABA M, SATO-DATE R. Mutations of the APC gene occur during early stages of gastric adenoma development[J]. Cancer Res, 1994, 54(5): 1149-1151.