

生物发光分析法检测 P53 基因上的突变点

周国华*, 古卓良, 章杰兵

(南京军区后勤部军事医学研究所药品仪器检验所, 江苏 南京 210002)

摘要: 目的 建立简单、快速和廉价的基因突变测定方法。方法 采用基于生物发光技术的焦测序法测定基因突变, 并通过毛细管和气压方式循环递加微量脱氧核糖核酸(dNTP)完成焦测序反应。结果 建立了一种供焦测序反应的新型装置; 研究了焦测序反应的影响因素和实验条件; 实测了 P53 外显子 8 上 Cys275Ser 突变点的 3 种可能形态(野生型、突变型和杂合型), 并提出了快速判断基因突变类型的方法。结论 建立的方法简单, 仪器装置成本低、操作简便, 可用于检测多种类型的基因突变。

关键词: 生物发光; 焦测序法; 基因突变; P53 外显子 8

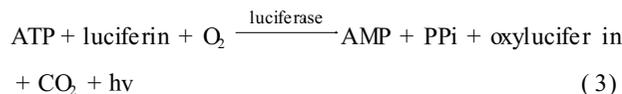
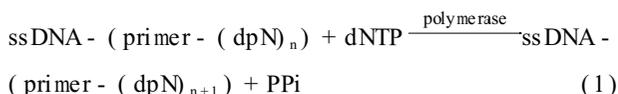
中图分类号: Q523.8 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)01 - 0041 - 05

基因突变是许多重大疾病(如肿瘤、糖尿病等)发生、发展的主要原因, 检测与疾病发生有关的突变基因, 可达到早期诊断和及时预防的目的。随着人类基因组计划(HGP)的完成, 特别是人们对基因突变与人类健康和疾病关系的理解, 在体检和临床检验中, 将突变基因的检测作为常规检测项目已越来越迫切。为此围绕高效基因突变检测技术的开发, 展开了一场激烈的竞争, 发展了许多方法, 除早期的限制性片段长度多态性分析(RFLP)和单链构象多态性分析(SSCP)法外, 最近主要发展了微阵列法(基因芯片)^[1,2]、激光解吸质谱法^[3,4]、编码微球法^[5,6]、电场控制核酸杂交法^[7]、分子信标探针法(molecular beacons probes)^[8]和动态等位基因杂交法(DASH)^[9]等。但这些方法各有优缺点^[10-12], 主要表现在: 仪器昂贵, 不能普及使用; 测定条件要求严格, 操作烦琐, 效率低、时间长, 不适合常规临床使用。因此发展一种简便准确的方法很有必要, 最近 Nyren 等^[13-15]采用生物发光分析法测定 DNA 片段序列, 是目前已知基因突变和单碱基多型性检测方法中准确度最高的方法之一, 并被命名为焦测序法(pyrosequencing)。但该方法在实际应用中需要特殊的设备, 循环递加 1 μ L 以下的脱氧核糖核酸(dNTP)供测序反应, 测定成本高, 不宜推广使用; 且对由野生型和突变型组成的杂合型样品, 很难快速判断其突变类型。本文详细研究了解决这些问题的途径和方

法; 并将其用于测定 P53 基因上的突变点。

方法原理

焦测序法是一种基于用发光分析法测定焦磷酸盐(PPi)的测序技术。在核酸聚合酶的作用下, 加入互补的 dNTP, 与引物退火的单链 DNA 发生延伸反应, 释放出等摩尔量的 PPi; PPi 在三磷酸腺苷硫酸化酶(ATP sulfurylase)的催化作用下转化为三磷酸腺苷(ATP); 荧光素酶(luciferase)催化作用下, ATP 与虫荧光素(luciferin)反应发光, 最大波长约为 560 nm, 可用光电倍增管(PMT)或电荷耦合装置(CCD)检测。由于光信号强度与 PPi 的量成正比, 可根据加入的 dNTP 种类和信号强度确定靶 DNA 的序列。可用以下方程式表示上述反应:



由于每次加入新的 dNTP 前必须完全去除前一种 dNTP, 所以该技术的关键是如何循环加入 4 种 dNTP(dATP, dCTP, dTTP, dGTP)进行延伸反应。到目前为止有 3 种方法, 即柱分离法^[16]、固相洗涤法^[17]和酶降解法^[13]。其中酶降解法是在均相反应体系中进行, 最为简单快速, 在该技术中三磷酸腺苷双磷酸酶(apyrase)被用于降解剩余的 dNTP 和反应生成的 ATP, 使测序反应能连续进行而不需洗涤步骤, 其

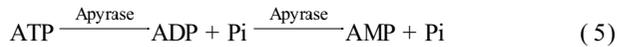
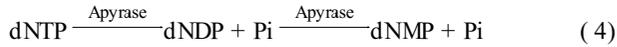
收稿日期: 2001-03-26.

作者简介: 周国华(1964-), 男, 副主任药师.

* Tel: (025) 4540665, Fax: (025) 4541183,

E-mail: ghzhou@public1.ptt.js.cn

降解反应可用如下方程表示:



在焦测序法中共有 4 种酶催化反应,经控制反应条件可以使所有反应在同一容器中同时进行。

材料与方 法

试剂 聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、DNA 聚合酶 I Klenow 片段(无外切酶活性)和脱氧核糖核酸(dNTPs)均购自 Promega (WI, USA); *D* 虫荧光素、荧光素酶、三磷酸腺苷硫酸化酶、三磷酸腺苷双磷酸酶(VII)、5'-磷酸化硫酸腺苷(adenosine 5'-phosphosulfate, APS)和牛血清白蛋白(BSA)均购自 Sigma (St. Louis, MO, USA); 2'-脱氧核苷-5'-氧-(1-三磷酸)钠(dATPaS)购自 Amersham Pharmacia Biotech (Amersham, UK); 实验所用其他试剂均为分析纯或优级纯。所有溶液均由灭菌去离子水配制。

引物序列及 DNA 模板的制备 PCR 扩增用引物, PFp53B: 5'-biotin gtc ctg ctt gct tac ctc gct tag t-3'; PRp53: 5'-acc tga ttt cct tac tgc ctc ttg c-3'; PFm13B: 5'-biotin-tgt aaa acg acg gcc agt-3'; PRm13: 5'-aca gga aac agc tat-3'。焦测序法测序用引物, PYRp53: 5'-aac agc ttt gag gtg cgt gat-3'; PYRm13: cag cta tga cca tga tta c-3'。M13 片段序列: 5'-aca gga aac agc tat gac cat gat tac gaa ttc gag ctc ggt acc cgg gga tcc tct aga gtc gac ctg cag gca tgc aag ctt ggc act ggc cgt cgt ttt aca-3'。

用 DNAzol 试剂盒(Gibco BRL, Life Technologies)从血液中提取基因组 DNA, 然后用上述引物 PFp53B 和 PRp53P53, 按 PCR 反应试剂盒(Platinum Taq DNA polymerase kit, Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) 规程进行 PCR 扩增。PCR 反应程序为: 94 °C 变性 2 min, 然后热循环 35 次(94 °C, 30 s; 57 °C, 60 s; 72 °C, 1 min), 最后于 72 °C 置 5 min。以 QIAquick PCR 纯化试剂盒(QIAGEN, Hilden, Germany)精制所得 PCR 产物。该 DNA 片段为 p53 基因外显子 8, 长度为 200 bp。

焦测序法测序用样品的制备 取生物素标记的 PCR 产物 50 μL, 与抗生蛋白链菌素(streptavidin) 200 μg 涂层微球(Dynabeads M280; Dynal, Oslo, Norway)于室温下反应 30 min, 反应介质为 5 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 mmol·L⁻¹ EDTA, 1.0 mol·L⁻¹ NaCl, 除去上清液后加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 轻轻混匀并反应 5 min, 取上清液用 0.1 mol·L⁻¹ HCl 中

和, 并制备为含有 25 mmol·L⁻¹ Mg²⁺ 和 5 mmol·L⁻¹ Tris (pH 7.7) 的溶液, 加入 50 pmol 焦测序引物 PYRm13 或 PYRp53, 置 94 °C 5 min 后, 自然冷却至室温。

焦测序法 焦测序法标准混合液(100 μL) 的组成为: 0.1 mol·L⁻¹ Tris-HAc (pH 7.7), 2 mmol·L⁻¹ EDTA, 10 mmol·L⁻¹ Mg(Ac)₂, 0.1% BSA, 1 mmol·L⁻¹ 二硫苏糖醇(DTT), 3 μmol·L⁻¹ APS, 0.4 mg·mL⁻¹ PVP, 0.4 mmol·L⁻¹ *D* 虫荧光素, 200 mU·mL⁻¹ 三磷酸腺苷硫酸化酶 VII, 2 U·mL⁻¹ 三磷酸腺苷双磷酸酶(VII), 1 U 无外切酶活性的 DNA 聚合酶 Klenow, 适量荧光素酶(使 1 nmol·L⁻¹ PPi 获得适当的灵敏度)。加入样品 250 fmol 于上述混合液中, 依次加入 dATPaS, dCTP, dTTP 和 dGTP 进行测序反应。在 pH 7.7 和室温下, 所有 4 种酶反应均能在同一试管中进行, 无相互干扰或抑制。

仪器装置 仪器装置为实验室自行组装, 主要由反应池、dNTP 储液池、光电倍增管(PMT, R6355, Hamamatsu Photonics K. K., Shizuoka, Japan)、放大器(AMP, NF Corporation, Yokohama, Japan) 和高压电源(HV, Matsusada Precision Inc., Japan) 组成, 采用计算机采集数据, 反应池和 dNTP 储液池间用内径为 52 μm 的毛细管连接。当 dNTP 储液池上施加一定压力时, dNTP 流入反应池发生聚合延伸反应。仪器测定参数为: 电压 845 V, 毛细管长 40 ~ 50 cm, 采用 1 mL 注射器施压, 室温下操作, PMT 收集光的波长为 300 ~ 700 nm。

结果与讨论

1 焦测序法中影响测序的因素

焦测序法是基于对 ATP 的测定而获得信号, 在 4 种 dNTP 中, dATP 的结构与 ATP 相似, 故也能与 luciferin 反应产生荧光, 因此当加入 dATP 时, 不管有无聚合反应发生, 均产生强的信号峰, 严重干扰序列的测定。研究发现^[13], 当采用 dATP 的类似物 dATPaS 时, 不仅不产生背景信号, 而且又不影响引物的延伸, 故本文也使用 dATPaS 代替 dATP 进行测序反应。

根据焦测序法的原理, 在焦测序过程中存在两种酶竞争同一底物 dNTP 的反应, 这两种酶分别是 DNA 聚合酶和 dNTP 降解酶 apyrase。所以当 DNA 聚合酶浓度不够或 apyrase 浓度过高时, 聚合反应不完全, 在测序图谱中会出现假阳性信号峰, 并且信号强度与掺入的碱基数目不成正比; 相反, 当 apyrase 量

过低时,过剩的 dNTP 不能被及时降解,当新的 dNTP 加入时就会发生聚合反应,同样会出现假阳性信号峰。因此选择合适的 DNA 聚合酶浓度和 apyrase 浓度是焦测序法的关键。本文以 M13 为例进行了研究,先以引物 PFm13B 和 PRm13 对 m13 进行 PCR 扩增,产生 105 bp 的 DNA 片段,并在其一端引入 biotin,然后用磁性微球技术制成单链 DNA,经引物 PYRm13 退火后,用焦测序法测定前 10 个碱基的序列。结果表明,当 DNA 聚合酶的浓度大于 $5 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时能使聚合反应完全,各峰的信号强度与其所代表的碱基数目成良好的线性关系,本文选择 $10 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ Klenow 进行以下焦测序实验。在该浓度下加入不同量的 apyrase 进行了进一步研究,结果见图 1。由图可知,当 apyrase 浓度为 $1 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,虽然信号很强,但峰严重拖尾,测定时间延长;当 apyrase 浓度为 $20 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,信号强度下降,峰高与碱基数的线性关系变差,因此本文以 $2 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 为常规测序浓度。在该浓度下,apyrase 即可有效降解 ATP,又不影响信号强度与碱基数间的线性关系。控制 apyrase 浓度的关键是使 apyrase 降解 ATP 的反应发生在 ATP 与 luciferin-luciferase 反应之后。

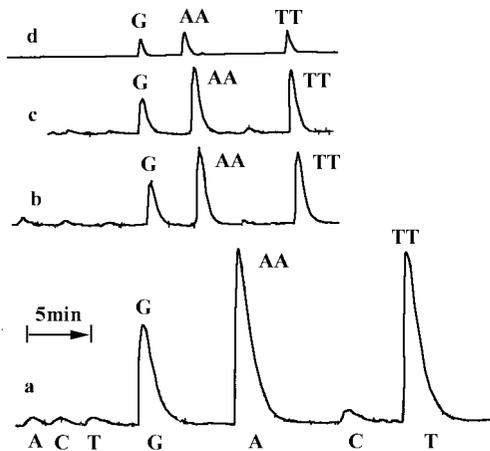


Figure 1 Pyrosequencing of M13 fragment under different amount of apyrase. The concentration of apyrase is $1 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for (a), $2 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for (b), $4 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for (c) and $20 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ for (d). Other conditions were shown in experimental section. As the dNTP's injection was operated by hand, the time interval between each dNTP's addition was not identical as shown in horizontal axis. A, C, T and G in the peaks represent dATPaS, dCTP, dTTP and dGTP respectively

除选择合适的酶浓度以外, dNTP 的加入量也很重要。实验表明,如果 dNTP 的加入量不够,聚合反应不完全,不能得到正确的序列;相反如果加入过量的 dNTP,可能发生 dNTP 的错配。为考察不同 dNTP

加入量对测定结果的影响,以 M13 为目标样品进行了两次测序试验,一次固定 dNTP 的加入量,另一次采用不同的 dNTP 的加入量,所得结果分别见图 2 (a)和(b)。经比较,发现两图谱一致,均得到了正确的序列。因此在焦测序法中,加入足够量的 dNTP 是关键,过量的 dNTP 会很快被共存的 apyrase 降解,不会产生错误聚合。这一结果也提示在焦测序法中,对用于依次循环递加 4 种 dNTP 的装置在精度上无特殊要求,这一特点给仪器制造带来了极大便利。

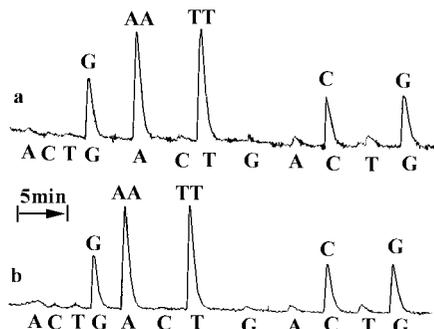


Figure 2 Comparison of different amount of dNTP for pyrosequencing. The addition order of nucleotide in one cycle is ACTG, and three cycles were added for sequencing 7 bases in M13 fragment
a. The amount of dNTPs injected was $0.2 \mu\text{L}$ for the first addition cycle, $0.3 \mu\text{L}$ for the second cycle and $0.4 \mu\text{L}$ for the third cycle; b. The amount of dNTPs injected was $0.2 \mu\text{L}$ for all the three cycles. Other conditions were the same as those in experimental section

2 信号强度与碱基数目的线性关系

在 ATP 降解酶 apyrase 存在下,采用虫荧光素和荧光素酶测定 PPi 的动态范围未见报道。实验结果表明:当测定液中含有 $2 \text{ mU} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ apyrase 时, PPi 的浓度在 $0 \sim 200 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 与信号强度呈现良好的线性关系 ($r = 0.9995$),因此反应体系中加入 apyrase 后,不会影响 PPi 的定量分析。但这不能说明信号强度与碱基个数有好的线性关系,为此本文进行了进一步研究。由于无法得到实际样品,故采用一次加入 2 种或 3 种 dNTP 的方法模拟同质 (homogenous) 区,即含有相同碱基的部分。本文所研究的 M13 片段,当加入 dNTP 的顺序和种类分别为 dGTP, dATPaS + dTTP, dCTP + dGTP + dATPaS 和 dCTP + dTTP 时,得到 4 个信号峰,分别代表 1, 4, 5 和 2 个碱基,经回归分析,信号强度与其所代表的碱基数目有很好的线性关系,相关系数为 0.9993,这一结果提示焦测序法能有效地测定含有同质区的 DNA 序列,可用于各种复杂样品的分析。

3 焦测序法测定 P53 基因外显子 8(exon 8) 突变点

P53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因, 大约与 50 % 的肿瘤有关。现已认识到引起肿瘤形成或细胞转化的 P53 蛋白是基因突变的产物, 它能促进肿瘤的形成, 而野生型 P53 基因是一种抑癌基因, 因此测定 P53 基因有无突变, 对肿瘤的诊断和治疗至关重要^[18]。P53 基因突变位点因肿瘤类型不同而不同。本文以 P53 基因外显子 8 上 Cys275Ser 突变点^[19]为例, 测定了其野生型 (A)、突变型 (T) 及野生型与突变型杂合体 (A/T) 的序列。测定时, 先按实验方法从血液中提取 gDNA, 进行 PCR 扩增, 制备单链 DNA, 与特异性引物退火, 然后按 dATPaS → dCTP → dTTP → dGTP 的顺序循环递加 dNTP 进行测序反应, 结果见图 3。由图 3(a) 和 (b) 可知其所代表的样品序列分别为: “AAACACGC” 和 “TAACACGC”, 根据这些序列很容易判断出样品是属于野生型还是属于突变型。但对于由野生型与突变型组成的杂合体

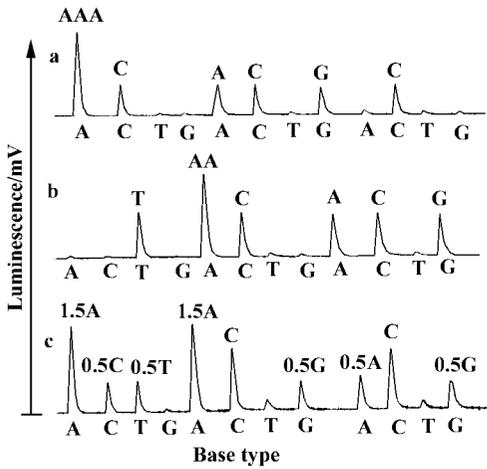


Figure 3 Real-time pyrosequencing on P53 exon 8 fragment
a. Wildtype, homozygous A; b. Mutant, homozygous T; c. Mixture of wildtype and mutant, heterozygous A/T. The cyclical addition order of dNTP is A, C, T, G

结 论

随着人类基因组计划的完成和人 SNP 数据库的建立, 基因突变与疾病的关系已越来越被人们所认识。快速诊断突变基因方法的建立, 将会加速人类基因组研究成果造福于人类的进程。本文建立的方法和仪器装置简单、快速, 且结果准确可靠, 能实现大批量分析, 适合我国国情, 有向基层医院推广使用的潜力。按照本文的仪器装置设计原理, 可以很容易实现全自动基因突变诊断仪的批量生产。虽然目前焦测序法所测序列数目有限, 但这已足够用于测定基因突变和单碱基多型性。由于本法有良好的

来说, 情况就复杂得多, 如图 3(c) 所示, 仅从 dNTP 的加入顺序和信号强度很难快速判断样品的基因突变类型。为此本文采用了一种简单快速的诊断方法——模式识别法, 即测序前根据 dNTP 的加入顺序及野生型和突变型的序列, 分别作出野生型、突变型及其杂合体的棒型碱基序列图, 然后将其与实测序列进行比较, 据此可以很快得到准确的判断。P53 基因外显子 8 上 Cys275Ser 突变点的 3 种理论序列棒型图 (按 dATPaS → dCTP → dTTP → dGTP 序列加入 dNTP) 如图 4 所示, 比较图 3 和图 4 可知, 图 3(c) 是突变型和野生型的杂合体。由于本法是基于样品的碱基序列, 所以经过一次测定就可准确判断样品有无突变, 而在常规荧光标记法中, 需要用不同颜色的荧光基团标记野生型和突变型, 然后在不同波长下测定, 操作繁琐。相比之下, 焦测序法具有简单快速的优点。

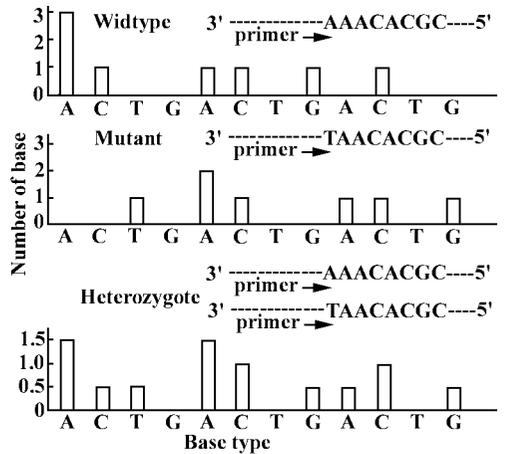


Figure 4 Predicted sequences of P53 exon 8 fragment in the case of wildtype, mutant and heterozygote when the addition order of dNTP is the same as that in Figure 3

定量特性, 故还可用于测定基因表达量, 有关应用正在进一步研究中。

REFERENCES:

[1] Schmalzing D, Belenky A, Novotny MA, et al. Microchip electrophoresis: a method for high-speed SNP detection. *Nucleic Acids Res* [J], 2000, 28(9): E43.
[2] Fan JB CX, Halushka MK, Berno A, et al. Parallel genotyping of human SNPs using generic high density oligonucleotide tag arrays. *Genome Res* [J], 2000, 10(6): 853 - 860.
[3] Sauer S, Lechner D, Berlin K, et al. A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* [J], 2000, 28(5): E13.

- [4] Fei Z, Smith LM. Analysis of single nucleotide polymorphisms by primer extension and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* [J], 2000, **14**(11) :950 - 959 .
- [5] Chen J, Iannone MA, Li MS, *et al.* A microsphere-based assay for multiplexed single nucleotide polymorphism analysis using single base chain extension. *Genome Res* [J], 2000, **10**(4) :549 - 557 .
- [6] Iannone MA, Taylor JD, Chen J, *et al.* Multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping by oligonucleotide ligation and flow cytometry. *Cytometry* [J], 2000, **39**(2) :131 - 140 .
- [7] Gilles PN, Wu DJ, Foster CB, *et al.* Single nucleotide polymorphic discrimination by an electronic dot blot assay on semiconductor microchips. *Nat Biotechnol* [J], 1999, **17**(4) :365 - 370 .
- [8] Tyagi S, Bratu DP, Kramer FR. Multicolor molecular beacons for allele discrimination. *Nat Biotechnol* [J], 1998, **16**(1) :49 - 53 .
- [9] Howell WM, Jobs M, Gyllensten U, *et al.* Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms. *Nat Biotechnol* [J], 1999, **17**(1) :87 - 88 .
- [10] Syvanen AC. From gels to chips: "minisequencing" primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum Mutat* [J], 1999, **13**(1) :1 - 10 .
- [11] Nollau P, Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. IFCC Scientific Division, Committee on Molecular Biology Techniques. *Clin Chem* [J], 1997, **43**(7) :1114 - 1128 .
- [12] Whitcombe D, Newton CR, Little S. Advances in approaches to DNA-based diagnostics. *Curr Opin Biotechnol* [J], 1998, **9**(6) :602 - 608 .
- [13] Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* [J], 1998, **281**(5375) :363,365 .
- [14] Nyren P, Karamohamed S, Ronaghi M. Detection of single-base changes using a bioluminometric primer extension assay. *Anal Biochem* [J], 1997, **244**(2) :367 - 373 .
- [15] Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, *et al.* Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal Biochem* [J], 2000, **280**(1) :103 - 110 .
- [16] Hyman ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* [J], 1988, **174**(2) :423 - 436 .
- [17] Nyren P, Pettersson B, Uhlen M. Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Anal Biochem* [J], 1993, **208**(1) :171 - 175 .
- [18] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, *et al.* P53 mutations in human cancers. *Science* [J], 1991, **253**:49 - 53 .
- [19] Gao HG, Chen JK, Stewart J, *et al.* Distribution of P53 and K-ras mutations in human lung cancer tissues. *Carcinogenesis* [J], 1997, **18**(3) :473 - 478 .

P53 GENE MUTATION DETECTION BY BIOLUMINOMETRY ASSAY

ZHOU Guo-hua, GU Zhuo-liang, ZHANG Jie-bing

(Department of Drug Control and Instrument Examination, Nanjing Military Area Institute for Medical and Biotechnics, Nanjing 210002, China)

ABSTRACT: **AIM** To develop a simple, fast and inexpensive approach as well as an instrument for detection of gene mutation. **METHODS** Pyrosequencing based on bioluminometry assay was employed to detect gene mutation. Pyrosequencing is a method of sequencing by synthesis step-by-step using four enzymes, DNA polymerase, ATP sulfurylase, luciferase and apyrase. The signal was produced by detecting pyrophosphate released during a dNTP incorporation. For mutation detection, a DNA fragment was amplified by PCR at first, followed by a single-stranded DNA preparation. In the second step, a short primer was annealed to the position just before the mutation point. Finally, specific dNTPs were added in terms of the template sequence. The mutation species can be readily determined by the sequence. **RESULTS** A new instrument was developed for gene mutation detection by pyrosequencing. To iteratively inject small amount of each dNTP for the sequencing reaction, capillaries were used to connect dNTP reservoirs and the reaction chamber. Each dNTP was delivered by adding a gas pressure on the top of a corresponding dNTP reservoir, by which 0.2 μ L of dNTP can be exactly added each time. It was theoretically proved that undesired liquid seep through the capillary did not affect the sequencing reactions in pyrosequencing. In addition, the three possible variants (wildtype, mutant and heterozygote) of a mutant point Cys275Ser in P53 gene exon 8 were determined by pyrosequencing using the instrument. A simple method was also described for rapidly distinguishing the type of a variant. **CONCLUSION** The developed method is very simple, and the corresponding instrument is inexpensive and easy to operate, which can be used to detect many types of mutation.

KEY WORDS: bioluminescence; pyrosequencing; gene mutation; P53 exon 8