

非同位素 PCR-SSCP-EB 染色技术检测 头颈部鳞癌 p53 基因点突变

王建广 黄洪章 李金荣 王刚 周刚 黄玉屏 鲁德银 侯炜

摘要 应用非同位素 PCR-SSCP-EB 染色技术检测新鲜头颈部鳞癌组织中 p53 基因点突变。结果显示 13 例标本中 7 例有异常电泳带, 其中位于第 5 外显子者 1 例, 位于第 6, 7, 8 外显子者各 2 例, 说明头颈部鳞癌的发生与 p53 基因突变有密切关系。与传统的同位素 PCR-SSCP 相比, 非同位素 PCR-SSCP-EB 染色技术是一种更简便、安全、快速、有效的检测基因点突变的方法, 适用于大量标本基因点突变的筛选性检测。

关键词 PCR-SSCP p53 基因 基因突变 头颈部肿瘤

基因点突变的传统检测方法为序列分析。该方法价格昂贵、费时, 尤其不适用于大量标本的检测。1989 年 Orita 等¹ 首次报道聚合酶链反应-单链构象多态性 (PCR-SSCP) 分析技术以来, SSCP 技术已成为基因突变和 DNA 多态性快速筛选和检测的重要手段。放射性同位素 PCR-SSCP 技术是将 a-³²P-dCTP 掺入扩增产物, 或扩增前先用 γ -³²P-ATP 标记引物, 但同位素存在放射性污染和操作复杂等问题。将银染技术与 PCR-SSCP 技术结合虽可取得较好效果, 但过程较繁琐。非同位素 PCR-SSCP-EB 染色技术是一种简便、快捷、有效而又无放射性污染的检测方法, 作者初步应用该技术对头颈部鳞癌组织中 p53 基因突变进行了检测。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本

取自湖北医科大学口腔医学院颌面外科手术切除的头颈部鳞癌新鲜肿瘤组织, 共 13 例, 均经病理检查证实, 其中 2 例同时取有肿瘤转移的淋巴结组织。正常对照标本 3 例, 均取自正常口腔粘膜。将标本立即置于 -196 液氮中, 冷冻 15 min, 保存于 -70 超低温冰箱中。

13 例标本中, 20~39 岁组 1 例; 40~59 岁组 9 例; 60~70 岁组 3 例。男 11 例, 女 2 例。肿瘤部位: 舌 6 例, 颊 3 例, 磨牙后区 2 例, 口底及牙龈各 1 例。

1.2 DNA 提取

按常规方法提取 DNA²。

1.3 引物设计

分别在 p53 抑癌基因高度保守区的外显子 5, 6, 7, 8 邻接之内含子区内设定, 合成 20 个对应碱基, 分别是:

exon 5: 5'-TTCCTCTTCCTGCA GTACTCC-3'
5'-GCCCCA GCTGCTACCA TCG-3'
exon 6: 5'-CACTGA TTGCTCTTA GGTCT-3'
5'-AGTTGCAAA CCA GACCTCA GG-3'
exon 7: 5'-TCTCCTA GGTTGGCTCTGAC-3'
5'-CAAGTGGCTCCTGACCTGGA-3'
exon 8: 5'-CCTA TCCTGA GTA GTGGTAA-3'
5'-GTCCTGCTTGCTTACCTCG-3'

1.4 PCR 扩增

反应在 0.5 ml EP 管中进行, 反应体积为 50 μ l。反应液中各成分浓度如下: 引物 1 μ mol/L; dNTP 每种 200 μ mol/L; 模板 DNA 1 μ g; KCl 50 mmol/L; Tris · HCl (pH 8.3) 10 mmol/L; MgCl₂ 1.5 mmol/L; 0.01% 甘油; Taq DNA polymerase 2.0 u。扩增条件: 96 热变性 5 min, 1000 r/min 30 s, 加 Taq 酶 2.0 u, 离心, 加液体石蜡 50 μ l, 离心, 93 1 min, 50 1 min, 72 1 min, 共 32 个循环, 最后一个循环 72 延伸时间为 10 min。扩增片段长度见附表。

附表 PCR 扩增 p53 基因第 5~8 外显子 4 个 DNA 片段

外显子位置	扩增片段长度	PCR 条件
5	204 bp	32 × 93 1 min, 50 1 min, 72 1 min
6	144 bp	32 × 93 1 min, 50 1 min, 72 1 min
7	133 bp	32 × 93 1 min, 50 1 min, 72 1 min
8	168 bp	32 × 93 1 min, 50 1 min, 72 1 min

作者单位: 430070 湖北医科大学口腔医学院口腔颌面外科 (王建广, 李金荣), 实验中心 (黄玉屏), 口腔粘膜病室 (周刚), 中山大学附属孙逸仙纪念医院 (黄洪章), 上海铁路中心医院口腔科 (王刚), 湖北医科大学病毒所 (鲁德银, 侯炜)

1.5 SSCP 分析

取 20 μl PCR 产物,与等量加样缓冲液(96% 甲酰胺, 0.2 mmol/L EDTA, 0.05% 溴酚蓝, 0.05% 二甲苯腈 EF)混合, 95 °C 热变性 5 min 后迅速置于冰浴, 加样于 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(29 × 1)电泳。电泳条件为: 0.5 × TBE, 4 ×, 电压 300 V, 预电泳 30 min, 加样后电泳直到溴酚蓝接近凝胶下缘。取下凝胶, 置于 0.5 mg% 溴化乙锭(EB)溶液中染色 30 min, 单链 DNA 电泳带可在凝胶中显示。照相, 记录结果。

2 结 果

2.1 3 例作为正常对照组的标本泳动带一致, 无异常泳动带出现。

2.2 13 例头颈鳞癌组织 p53 基因第 5~ 8 外显子的 4 个 DNA 片段中, 7 例有异常泳动带(53.85%), 说明其相应 p53 基因 DNA 片段发生了点突变。异常泳动带出现频率为: 第 5 外显子 1 例; 第 6, 7, 8 外显子各 2 例(见图 1~ 4)。

2.3 2 例癌症患者原发灶及淋巴结转移灶标本中, 均检测到相同 DNA 片段异常泳动带。

3 讨 论

目前认为癌肿的发生是一个由多种癌基因、抑癌基因共同参与的多步骤变化过程。有证据表明, 许多常见恶性肿瘤的发生与 p53 基因的丢失、突变、插入、重排或其表达产物与某些蛋白结合后失活有关^{4,5}。p53 基因异常在人类肿瘤的发生发展中起着重要作用。

迄今为止, 在人类肿瘤中, 至少已发现 350 种不同类型的 p53 基因点突变。与序列分析技术相比较, PCR-SSCP 技术检测基因点突变更为简便、省时; 而较之一般的同位素方法, 作者采用的非同位素 PCR-SSCP-EB 染色技术还具有安全、周期短,

成本低廉, 回收方便等优点, 特别适用于对大量标本基因点突变的筛选, 并可将突变定位于基因的某一片段, 因而具有较高的实用价值。

本实验应用非同位素 PCR-SSCP-EB 染色技术检测 13 例头颈鳞癌组织的 p53 基因, 确认 7 例有点突变, 突变率为 53.85%; 其中取自同一癌症患者原发灶及淋巴结转移灶的标本中, 均检测到相同 DNA 片段的异常泳动带。这一结果表明, p53 抑癌基因的变异与头颈鳞癌的发生有着密切关系。在人类肿瘤的发生中, 由于还存在 p53 及其它抑癌基因的缺失, 以及基因在转录水平和翻译水平的改变, 而这些改变是本研究方法所不能揭示的。另外, 本研究中患者例数有限, 临床观察时间较短, 因而, 需进一步对 p53 突变与头颈鳞癌临床及病理特征之间相关关系进行研究, 以探索有助于临床诊断、预后判断及肿瘤监控的分子生物学指标。

(本文图见中心插页 11)

4 参考文献

- 1 Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, et al. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 2766
- 2 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harb Lab Press, 1989, 463
- 3 林健志. SSCP 法による为核酸配列变化の检出. *实验医学*, 1991, 9(3): 95
- 4 Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*, 1991, 351: 453
- 5 Nigro JM, Baker SJ, Presinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature*, 1989, 342: 705

(1996- 08- 13 收稿, 1997- 04- 09 修回)

Detection of Point Mutation of p53 Gene in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Non- Isotopic PCR-SSCP

Wang Jianguang, Huang Hongzhang, Li Jinrong, et al

Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Hubei Medical University

Abstract

Non-isotopic PCR-SSCP technique was used to detect point mutation of p53 gene in fresh tissue taken from head and neck squamous cell carcinoma. The abnormal band of the single-stranded DNA (ssDNA) was identified in 7 of 13 cases. The results showed that point mutation occurred in the related DNA fragments. The point mutation of exon 5 was found in one case and that of exon 6, 7, 8 in two respectively. These results indicated that the p53 gene mutation was closely correlated with the

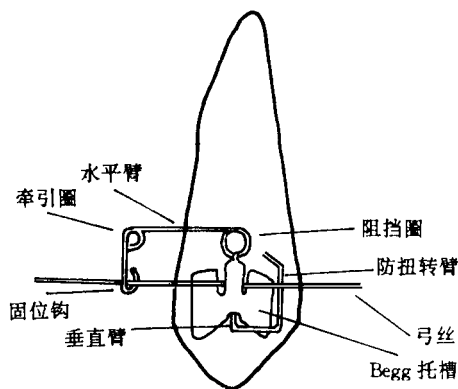
development of head and neck squamous cell carcinoma Compared with the traditional isotopic PCR-SSCP technique, the non-isotopic PCR-SSCP one is a kind of simpler, safer, quicker and more effective way to detect the mutation of p53 tumor suppressor gene It is especially useful in the screening of point mutation when handling a large number of samples

Key words: PCR-SSCP p53 mutation head and neck neoplasms

一种新型尖牙牵引装置

王学侠 姬广国 陈宝勇

远中移动尖牙是矫治牙颌畸形中的一个重要步骤。后移尖牙有滑动法和关闭曲法¹两种,滑动法因不需弯制关闭曲而常被采用。因尖牙牙根长而粗壮,具有较大的抵抗力,后移过程中很容易造成支抗丧失,引起不良后果。成功地后移尖牙不仅需要合适的力量和精心地操作,减少后移过程中的摩擦力也至关重要。作者介绍一种尖牙后移装置(附图),不需结扎尖牙,可大大减少托槽与弓丝间的摩擦力。



附图 右上及左下尖牙牵引装置

1 制作方法及临床应用

采用直径 0.35~0.45 mm 不锈钢丝、澳丝或仿澳丝,顺(或反)时针弯制直径 1.0~1.5 mm 阻挡圈 2.5 圈,形成垂直臂和水平臂,调整垂直臂与圈垂直。沿水平臂离阻挡圈 3~4 mm 处,反(或顺)时针向弯制直径 1.0~1.5 mm 牵引圈 2.5 圈,并形成固位臂和固位钩。将垂直臂插入左上、右下(或右上、左下)尖牙 Begg 托槽竖管内(注意垂直臂位于弓丝颊侧)让阻挡圈与竖管紧密接触,以防止弓丝滑脱。而后将垂直臂于竖管上方水平向弯向近中 90°;再沿尖牙近中

边缘龈向弯曲 90°;同时将末端抵住尖牙近中部,此臂可防止尖牙后移时发生扭转。调整阻挡圈使水平臂与垂直臂成 90°或略大于 90°;固位钩固位于弓丝时不应有力。将支抗牙牵引钩与牵引圈以弹力线或螺簧相连,即可有效地后移尖牙。

2 临床应用中的注意事项

2.1 主弓丝应能在托槽槽沟内自由滑动,其直径应大于弯制牵引装置之弓丝直径。作者的经验,主弓丝和牵引装置弓丝直径分别以 0.40 mm 和 0.35 mm 为宜。主弓丝太细则易变形,不利于保护支抗和尖牙移动的控制;弓丝太粗,则增加了弓丝与托槽间的摩擦力。必要时可稍磨宽槽沟,以保证弓丝在托槽内顺利滑行。

2.2 随着尖牙后移,固位钩和固位臂与第二双尖牙相抵触,妨碍尖牙进一步移动。此时可重新制作一短水平臂的尖牙牵引装置。亦可在水平臂上作一向垂直曲,使水平臂缩短。则可继续牵引尖牙后移,直至所希望的位置。

2.3 尖牙最好位于牙弓内,或突出于牙弓不太多,且有足够的牙冠长度(一般应大于 5 mm)。否则应先用其它弓丝稍作平整,再用此装置。

2.4 此装置也适用于第二双尖牙拔除,需要远中移动第一双尖牙的病例。它可同样控制第一双尖牙移动时的倾斜与旋转。

3 参考文献

- 1 丹狄 FV 著,姚森译 口腔正畸矫治器图谱 北京:世界图书出版公司,1991:120~122

(1996-10-23 收稿)