

two hours after the injection with anti-GBM serum, extensive proteinuria was present and the rats' kidneys were removed. Glomeruli were isolated using a sterile sieving technique and cultured in plastic tissue culture flasks. The viability of adherent cells emigrated from glomeruli were over than 98%, the purity of Macrophages were over than 95% which identified by non-specific esterase staining and anti-CD68 monoclonal antibody cell immunohistochemistry.

Key words: Macrophages Glomerulonephritis

This work was granted by the National Natural Science Foundation of China (39070389) and the Ninth Five-Year Scientific and Technological Foundation of the Ministry of Public Health.

银染 PCR-SSCP 方法检测胃癌微小卫星 DNA 不稳定性

郭文 张亚历 邱红明 吴保平 张立力 周殿元
(第一军医大学南方医院全军消化内科研究所 广州 510515)

微小卫星是散布于整个基因组内的 DNA 简单重复序列,虽然在个体之间存在明显的差异,但在遗传学上具有高度的保守性,突变率极低^[1]。近年来国外的研究资料显示,微小卫星 DNA 不稳定性 (Microsatellite instability, MIN) 与肿瘤及一些癌前病变密切相关^[2~7],因此,检测 MIN 在临床上具有重要意义。自从 1995 年 Schlegel 等报道了非同位素聚合酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 为基础的 MIN 检测方法以来^[8],近两年该法已用于多种临床肿瘤的检测,国内尚无这方面的研究报告。本文以胃癌 MIN 检测为例,重点介绍 PCR 单链构象多态性 (Single-strand conformation polymorphisms, SSCP) 检测 MIN 方法。

材料与 方法

一、组织标本

取外科切除、石蜡包埋、经组织病理学确诊的胃癌组织标本 30 例,其中高、中分化腺癌 12 例,低分化腺癌 18 例。同时取每例病人的正常切缘粘膜组织作为对照。

二、主要试剂和仪器

试剂主要有:蛋白酶 K、dNTP、Tag 酶购自 Sangon (加拿大)公司,N,N,N,N-四甲基乙二胺(TEMED)为 SIGMA 产品,丙烯酰胺、N,N'-亚甲双丙烯酰胺为国产分析纯。所用的主要仪器为 Hema 480 PCR 扩增仪, Multiphor I 型多用电泳系统 (Pharmacia)。

三、组织消化

1. 取 5 μ m 石蜡组织切片 3-6 片于洁净的载玻片上;
2. 切片 60 $^{\circ}$ C 烘烤化蜡 30min 后,浸泡于盛有二甲苯的竖式缸中分别脱蜡 2 次,各 5min;
3. 依次置无水乙醇中浸泡 3 次,各 2-3min;
4. 取出晾干后,用保安刀片将组织刮入 1.5ml Eppendorf 管中,注意刮入肿瘤组织时,先于显微镜下定位,去除出血、坏死和非瘤组织;
5. 加入 50mmol/L Tris (pH8.0)-蛋白酶 K (200 μ g/ml) 消化液 100 μ l,短暂离心后,37 $^{\circ}$ C 温育过夜;
6. 煮沸 8min,10000rpm 离心 10min,取上清,置 -30 $^{\circ}$ C 保存。

四、PCR 扩增

选用四种热点部位的微小卫星 DNA 标志进行检测,包括第 2 号染色体 2 个标记位点 (D2S123 和 D2S119),第 5 号和 17 号染色体各 1 个标记位点 (分别为 D5S107 和 D17S250)。引物参照文献设计^[1],由加拿大真达基因公司协助合成,其序列如下:

D2S123①5'-AAACAGGATGCCTGCCTTTA-3' 扩增片段为 197-227bp

②5'-GGACTTTCACCTATGGGAC-3'

D5S107①5' GATCCACTTTAACCCAAATAC-3' 扩增片段为 133-155bp

②5' GGCATCAACTTGAACAGCAT-3'

D17S250①5'-GGAAGAATCAAATAGACAAT-3' 扩增片段为 53-169bp

②5'-GCTGGCCATATATATATTTAAACC-3'

D2S119①5'-CTTGGGGAACAGAGGTCATT-3' 扩增片段为 214-232bp

②5'-GAGAATCCCTCAATTTCTTTGGA-3'

扩增时取 0.5ml 无菌离心管,反应体积为 25 μ l。按下列次序加样:

无菌水 10.5 μ l, 10 \times 扩增缓冲剂 2.5 μ l, 4种 dNTP 混合物(10mmol/L)1 μ l, 引物 I、II (100ng/ μ l)各 2 μ l, 模板 DNA 4 μ l。用 25 μ l 无菌石蜡油覆盖于反应混合液之上。于 97 $^{\circ}$ C 加热 8min 使 DNA 完全变性。将 3 μ l Taq 酶(0.75u)加入处于 80 $^{\circ}$ C 的反应混合液中,按下面循环参数进行 PCR 扩增:94 $^{\circ}$ C 变性反应 45 秒,55 $^{\circ}$ C 退火反应 1 分钟,2 $^{\circ}$ C 延伸反应 1 分钟。依次进行 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 分钟。反应结束后,置 4 $^{\circ}$ C 保存,并进一步分析。

五、琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物

用 2% 的琼脂糖倒胶(含溴化乙锭终浓度为 0.5 μ g/ml),凝胶凝固后,加入 0.5 \times TBE 电泳缓冲液,将 10 μ l PCR 扩增产物与 1 μ l 上样缓冲液(0.25%溴酚蓝-40%蔗糖水溶液)混匀依次加样。100V 恒压电泳 10min。在透射紫外灯下观察结果,阳性标本用于 SSCP 分析。

六、SSCP 分析

取上述 PCR 产物 6 μ l 加入 18 μ l 测序加样缓冲液混匀于 97 $^{\circ}$ C 变性 8min,置 40%乙醇碎冰中冰浴 5min,再快速加样于预冷 4 $^{\circ}$ C 的 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶板上。加样缓冲液含 98%去离子甲酰胺、10mmol/L EDTA, pH 8.0、0.025%二甲苯青(xylene cyanole FF)、0.025%溴酚蓝。聚丙烯酰胺凝胶含 5%甘油,丙烯酰胺:甲叉丙烯酰胺(methylene bisacrylamide)为 19:1。双链对照标本是将 6 μ l PCR 产物加入 2 μ l 上样缓冲液(0.25%溴酚蓝-40%蔗糖水溶液)中混匀,不作变性处理,直接上样。13 $^{\circ}$ C, 400V 恒压电泳 4 小时。电泳缓冲液为 0.5 \times TBE。

七、银染

取下凝胶,置大玻璃皿中,10%乙醇固定 10min,再用 1%硝酸脱色 3min,经蒸馏水漂洗 3 次后,用 0.012 mol/L 硝酸银液染色 20min,蒸馏水漂洗 3 次,0.28 mol/L 碳酸钠-0.019%福尔马林显影 10min,直至样本信号足够强而背景不致过高为止。蒸馏水漂洗 3 次后,10%乙醇固定,定影,干胶、照像(干胶作为底片,使相纸曝光成像)。

结 果

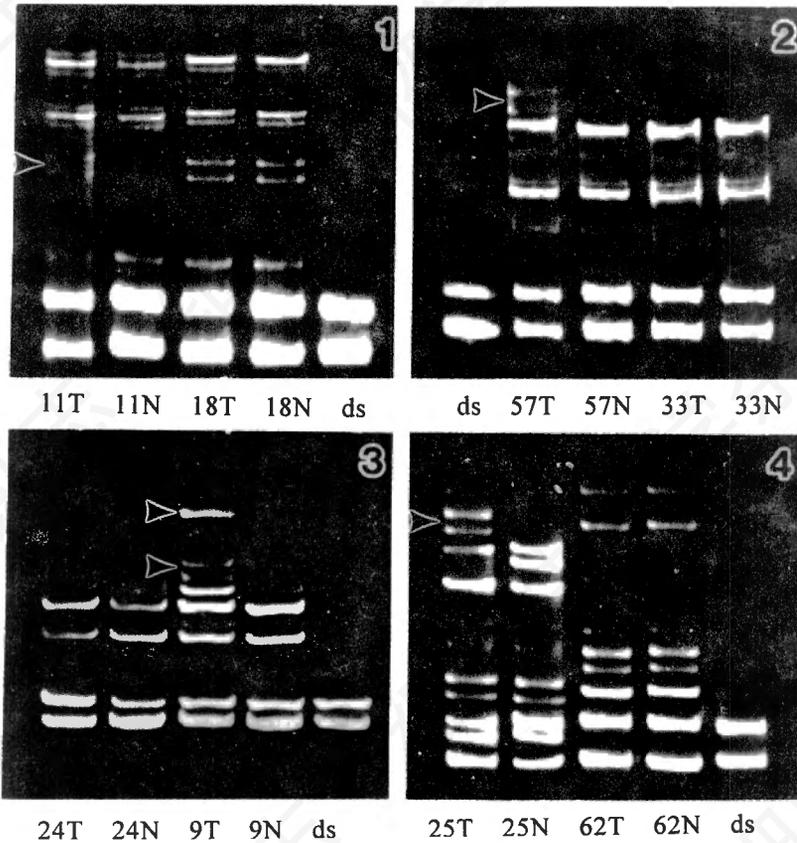
应用银染 PCR-SSCP 方法检测胃癌微小卫星 DNA 不稳定性,可清楚显示肿瘤细胞的 MIN。若肿瘤组织中 DNA 重复序列有增多或减少(即表现不稳定性),可致 DNA 单链的二级结构发生变化,在非变性胶电泳时,其泳动速度会发生改变,与正常组织相应的 PCR 产物比较,即可出现异常的泳动带(如图版 1-4)。

本文所用的 4 对引物,分别代表了第 2、5、17 号染色体不同位点,在所检测的 30 例胃癌中,11 例出现 1 个或多个染色体位点的不稳定性,检出率为 36.7%。其中,1 例全部位点均有异常(3%),2 例有 3 个位点的异常(6%),5 例有 2 个位点的异常(16.7%),3 例只出现 1 个位点的异常(10%)。

分析染色体位点 MIN 的发生率与胃癌的关系表明,以 D5S107 发生率最高,为 10/30 (33.3%),其次是 D2S123 为 9/30 (30%)、D17S250 为 5/30 (16.7%)、D2S119 为 4/30 (12%)。

讨 论

微小卫星 DNA 是真核基因组中大量而随机出现的简单重复序列,在人类基因组中,它们主要是由 1~6 个核苷酸形成的重复序列,并以二核苷酸的重复序列(CA)_n 最为常见^[1]。这种重复单位串联排列而成的单一序列,可用 PCR 体外扩增。由于其重复单位数量的改变可引起相当高的多态性,因而个体间的差异很大,但在家系中可稳定地遗传,突变率极低。微小卫星 DNA 不稳定性主要表现为 DNA 简单重复序



银染 PCR-SSCP 检测微卫星 DNA 不稳定性(MIN)

图 1 示第 11,18 例组织 D2S119 标志 MIN,11T 和 11N 间出现了单链带泳动变位(箭头)。图 2 示第 33,57 例组织 D5S107 标志 MIN,57T 和 57N 间出现异常泳动带(箭头)。图 3 示第 9,24 例组织 D2S123 标志 MIN,9T 和 9N 间出现异常泳动的单链带(箭头)。图 4 示第 25,62 例组织 D17S250 标志,25T 和 25N 间出现异常泳动的单链带(箭头)。上图中 T 为肿瘤组织,N 为正常粘膜组织。ds 为未变性的 DNA 双链对照。

列改变,导致微小卫星 DNA 序列长度的异常。与常见的癌基因与抑癌基因改变不同,MIN 主要表现为(CA)_n重复次数的增多或减少。据称 MIN 与细胞癌变密切相关,因此,近年来 MIN 被认为是细胞癌变的新机制^[1-3]。

MIN 的检测起初多用同位素标记 PCR 反应引物或反应底物(dNTP 中的一种),变性胶电泳、放射自显影后进行观察,因此设备条件要求较高。由于受诸多的限制如同位素对环境的污染、半衰期以及国内订货日期等,使其应用受到一定的限制。本文采用银染 PCR-SSCP 方

法,其基础是肿瘤细胞微小卫星 DNA 内(CA)_n或(AT)_n重复序列改变,即可导致其二级结构发生变化,与自身正常组织的同种微小卫星 DNA 标记对照,即可出现单链带的泳动变位。该法简便易行,无需序列分析仪等特殊设备,普通实验室即可开展,同时避免了同位素的污染及时间限制。加之硝酸银染色显示核酸的敏感性是溴化乙锭染色的 200 倍,其敏感性足以显示 pg 水平核酸的改变,因此越来越广泛应用于核酸的检测^[9]。

近年来国外的研究资料显示,MIN 与具有

遗传背景的大肠癌有密切关系^[2]。目前已将其作为大肠癌高危人群的基因筛检手段。临床上,胃癌多以肠型胃癌为主,从组织起源和发生上与大肠癌具有相同的基因改变背景,因此,研究胃癌与微小卫星 DNA 不稳定性关系对阐明胃癌发生机制及提供临床诊断途径有重要意义^[7]。

本文首次采用银染 PCR-SSCP 方法检测胃癌组织标本 MIN,发现在胃癌发生的早期可检出 MIN,其 MIN 的检出率与胃癌分期无明显相关性,说明 MIN 是胃癌发生的早期事件,可能是胃癌发生的重要机制。由于本文采用的 MIN 检测是基于石蜡包埋组织切片之上,标本可用存档的病理蜡块,来源丰富,无需新鲜取材。加之所需切片组织量极少,因此具有很好的临床推广价值,特别适合于胃癌的临床回顾性资料研究。

摘 要

应用银染 PCR-SSCP 方法检测 30 例常规石蜡包埋胃癌组织第 2、5、17 号染色体 4 个位点的微小卫星 DNA 不稳定性(MIN)。结果发现 11 例阳性病例(36.7%),其中出现 4、3、2 个及单个位点异常分别为 1(3%)、2(6%)、

5(16.7%)和 3 例(10%)。4 个位点中,以 D5S107 发生率最高(33.3%),其次为 D2S123(30%)、D17S250(16.7%)、D2S119(12%)。提示 MIN 是胃癌病变中常见的分子遗传学事件,MIN 的出现可能是胃癌发生的又一重要机制。银染 PCR-SSCP 是一简便、快速、灵敏、有效的检测 MIN 的方法。

关键词: 胃肿瘤 微小卫星 DNA 不稳定性 聚合酶链反应

参 考 文 献

- [1] Wooster, R. et al., 1994, *Nat. Genet.*, **6**: 152-156.
- [2] Peltomaki, P. et al., 1993, *Cancer Res.*, **53**: 5853-5855.
- [3] Merlo, A. et al., 1994, *Cancer Res.*, **54**: 2098-2101.
- [4] Yee, C. J., et al., 1994, *Cancer Res.*, **54**: 1641-1644.
- [5] Ogasawara, S. et al., 1995, *Cancer Res.*, **55**: 891-894.
- [6] Huang, T. H. et al., 1995, *Diagn. Mol. Pathol.*, **4**: 66-68.
- [7] Rhyu, M. G. et al., 1994, *Oncogene*, **9**: 29-32.
- [8] Schlegel, J. et al., 1995, *Virchows Arch.*, **426**: 223-227.
- [9] Spagnolo, D. V. et al., 1994, *Adv. Anat. Pathol.*, **2**: 61-64.

DETECTION OF MICROSATELLITE INSTABILITY BY SILVER STAINING PCR-SSCP IN HUMAN GASTRIC CARCINOMA

GUO Wen ZHANG Ya Li QOU Hong Ming et al.

(PLA Research Institute for Digestive Diseases, Nanfang Hospital, Guangzhou 510515)

ABSTRACT

Silver staining PCR-SSCP method was used to detect microsatellite instability (MIN) at 4 loci on chromosome 2, 5, 17 in paraffin-embedded gastric carcinoma tissues. The abnormal shifting of the single-stranded DNA was identified in 11 out of 30 cases (36.7%). Of these 11 tumors, 1(3%) showed MIN at all 4 loci, 2 tumors(6%) at 3 loci, 5 tumors(16.7%) at 2 loci, and 3 tumors(10%) at one locus. From these 4 loci, the detective rate of MIN was the highest at D5S107(33.3%), and it was 30%, 16.7%, 12% at D2S123, D17S250 and D2S119, respectively. The results indicate that MIN is a common molecular hereditary event in gastric carcinoma, and it may be one of the important mechanisms

of gastric carcinogenesis. Silver staining PCR-SSCP is a convenient, rapid, sensitive and reliable method for detecting of MIN in gastric carcinoma.

Key words: Gastric neoplasm Microsatellite instability Polymerase chain reaction

一种用矽石快速提取总 RNA 的方法

游力 赵跃然 张建 高春义

(山东省医学科学院基础医学研究所, 山东肿瘤生物治疗研究中心 济南 250062)

核酸的提取是分子生物学研究中最基本的方法。目前从组织或细胞中抽提总 RNA 的方法主要是根据 Chomczynski 介绍的异硫氰酸胍-酚-氯仿法^[1]或在其基础上加以改进,但仍存在着步骤多、时间长且收率不高等缺陷。我们参考国外文献,根据矽石(Silica)能够吸附核酸的特性,从组织和细胞中抽提总 RNA,并经过 RT-PCR,克隆了人血小板生成素(TPO)片段,取得了满意的结果。现将方法介绍如下:

材料与 方法

一、材料

1. 溶液 D 4mol/L 异硫氰酸胍、25mmol/L 柠檬酸钠 (pH7.0)、0.5% 十二烷基肌氨酸钠、0.1mol/L β -巯基乙醇。

2. 矽石 (Silica) Sigma 产品,5 克矽石溶于 50ml 双蒸水中,振荡 5 分钟,室温静置 4 小时吸去上清,以去除小的矽石颗粒,取适量的矽石加入 TE (pH7.4) 缓冲液中,使终浓度为 30mg/ml。

3. 洗涤液 50% 乙醇、10mmol/L EDTA (pH 8.0)、50mmol/L Tris-HCl (pH7.4)、200mmol/L NaCl。

4. TPO 引物 上游 5'-ATGTCGACCATG-GAGCTGACTGAATTG-3'、下游 5'-TTACCT-GACGCAGAGGGTGGACC-3'。由上海生工公司合成。

二、方法

1. 细胞和组织总 RNA 的抽提 2×10^6 细胞或 100mg 胎肝组织经研磨后,生理盐水洗一次,加 200 μ l 溶液 D。悬浮细胞,再依次加入 20 μ l 2mol/L NaAc (pH4.0)、200 μ l Tris-HCl (pH8.0) 饱和酚、40 μ l 氯仿-

异戊醇(49:1),处理组织时所加各种试剂量均相应增加 5 倍。每种试剂加入后均需混匀,最后震荡 5 分钟,置冰浴 15-30 分钟,12000 转/分离心 5 分钟,取上清置于另一 Eppendorf 管中,加矽石液(用时摇匀)1ml,颠倒混匀,室温放置 2 分钟,10 000 转/分离心 1 分钟,弃上清,加洗涤液 1ml,悬浮沉淀,离心后重复一次,用丙酮洗一次,室温干燥,加 60 μ l 经焦碳酸二乙脂(DE-PC)处理过的双蒸水,悬浮沉淀,置 65 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟,12000 转/分离心 1 分钟,上清即为细胞或组织总 RNA。

2. TPO 片段的 RT-PCR 取 7 μ l 胎肝总 RNA 为模板,0.5 μ g 随机引物,经逆转录获得 TPO cDNA,再以 0.5 μ g TPO 引物,25mmol/L MgCl₂ 3 μ l、10 \times buffer 5 μ l、2.5mmol/L dNTP 4 μ l、cDNA 1 μ l, Taq 酶 1.25u 进行 RT-PCR,循环参数为 95 $^{\circ}$ C 10 分钟变性,再 94 $^{\circ}$ C 1', 60 $^{\circ}$ C 1' 72 $^{\circ}$ C 1' 30", 30 个循环,72 $^{\circ}$ C 5 分钟延伸,扩增结束后经 1% 琼脂糖电泳观察。

3. 总 RNA 纯度及完整性的鉴定 制备 1.5% 的琼脂糖凝胶于 1 \times TAE 电泳缓冲液中,每孔上样 6 μ l 总 RNA 及 6 \times 上样液 2 μ l,加水至 12 μ l,电压为 50v/cm,当溴酚蓝指示剂到整个凝胶长度的 2/3 时,于紫外分析仪上观察总 RNA 情况。同时于 754 紫外分光光度计上检测 RNA 的含量和纯度。

结果与 讨论

1. RNA 的鉴定 用矽石法提取胎肝及 K562、P158、人单核细胞等十种细胞总 RNA。对细胞样品总 RNA 的产量为 5-10 μ g/2 \times 10⁶,100mg 胎肝组织可得 80 μ g 左右的总 RNA,OD260/OD280 为 1.820 \pm 0.002,琼脂糖凝胶电泳分析,细胞及组织均可见清晰的