

# 变性高效液相色谱在大通量筛查基因突变中的应用\*

顾 颖<sup>1</sup> 李 延<sup>1</sup> 陈蔚丰<sup>1</sup> 尹大强<sup>1\*</sup> 赵庆顺<sup>2</sup>

(1 南京大学环境学院, 污染控制与资源化国家重点实验室, 南京, 210093;

2 南京大学模式动物研究所, 医药生物技术国家重点实验室, 南京, 210061)

**摘 要** 应用变性高效液相色谱 (DHPLC) 对已知序列的含外显子 7 的斑马鱼 *p53* 基因片段 PCR 产物进行突变检测, 结果表明, 通过克隆测序方法检测出的点突变, 用 DHPLC 同样可以检出, 且对该片段的最优化检测柱温为 60°C, 其特异性很好, 敏感性大于 95%.

**关键词** 变性高效液相色谱, 斑马鱼, *p53* 基因, 点突变.

基因突变检测技术如直接测序 (DS)、链构象多态性 (SSCP)、变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 等均有一定的局限性. 由于大多数环境化合物导致的基因突变多为低频、未知突变, 因此, 建立高通量基因突变筛查技术已成为环境化学物质遗传突变检测的研究热点之一. 变性高效液相色谱 (DHPLC) 是一种高通量、自动化的基因突变检测技术<sup>[1-2]</sup>. 该技术已在医学、癌症、药物等研究领域开展应用, 与 SSCP 和 DNA 直接测序等突变检测技术相比, DHPLC 具有灵敏性更高, 特异性更强, 廉价省时等优点<sup>[3-4]</sup>.

本文以已知序列的野生型和突变型含外显子 7 的斑马鱼 *p53* 基因 PCR 扩增片段为研究对象, 利用 DHPLC 法检测斑马鱼 *p53* 基因的点突变, 对 DHPLC 检测突变片段的敏感性和特异性进行分析.

## 1 样本及分析

检测样本为含有斑马鱼 *p53* 基因外显子 7 片段的大肠杆菌阳性克隆的 PCR 产物, 长度 173bp, 共 3 个样本, 其中 Wt 为纯合野生型, M1 和 M2 为纯合突变型, 突变位点分别为 49bp、66bp 和 145bp.

挑取上述 3 个样本中含有斑马鱼 *p53* 基因外显子 7 片段的阳性克隆, 接种到 5ml LB 液体培养基 (含 100 $\mu$ g $\cdot$ m<sup>-1</sup> 氯苄霉素) 中, 于 37°C 振荡培养过夜; 12000g 离心 2min, 移去上清液; 用 40 $\mu$ l 1 $\times$  STE 缓冲液悬浮菌体, 加入 40 $\mu$ l 苯酚: 氯仿 (1:1) 溶液振荡抽提; 12000g 离心 2min, 直接取上清液 PCR 反应的模板. 引物为: 5-GTTTAACAGTCA CATTTCCT-3 (正向), 5-ACAAGAGGAGGAATCAAATA-3 (反向). PCR 参数为: 95°C 起始变性 1min, 94°C 变性 40s, 52°C 退火 30s, 72°C 延伸 30s, 循环 30 次, 最后在 72°C 延伸 10min. 取 1 $\mu$ l PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

将 PCR 产物在 PCR 仪上 95°C 起始变性 5min, 94.5°C 变性 20s, 以后每 20s 一个循环降低 0.5°C, 缓慢降温到 25°C, 以形成同源和异源双链 DNA 分子混合物. 将 PCR 样品放入 DHPLC 进样室, 输入被检测片段的序列. 设定每次进样 5 $\mu$ l 注入 DNASep 检测柱内. 检测温度以该序列片段的解链温度 ( $T_m = 59.25^\circ\text{C}$ ) 为参照, 在  $T_m \pm 2^\circ\text{C}$  的范围内, 选择 59°C, 59.5°C, 60°C 和 60.5°C 为试柱温度. 洗脱液由缓冲液 A (0.1mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> 三乙胺乙酰盐) 和缓冲液 B (0.1mol $\cdot$ l<sup>-1</sup> 三乙胺乙酸盐和 25% 乙醇) 组成, 检测系统将自动按线性递增方式, 以 0.9ml $\cdot$ min<sup>-1</sup> 的流速将结合在 DNASep 检测柱上的 DNA 分子洗脱下来, 在 260nm 波长处读取吸光值, 经系统自动处理后, 信号被传送到监视屏上, 形成 DHPLC 峰型图谱, 供阳性片段分析鉴定.

## 2 DHPLC 检测斑马鱼 *p53* 基因外显子 7 点突变的柱温条件

图 1 为 WAVEMAKER 4.0 软件预测的待测 173bp 片段在 59°C, 59.5°C, 60°C, 60.5°C, 61.5°C 和 62.5°C 时的解链曲线. 片段突变区域的螺旋结构比例达到 50%—99% 的温度条件下, 能够通过异源

\* 国家自然科学基金 (20577022) 资助项目. \*\* 通讯作者: yindq@nju.edu.cn

双链在错配碱基两侧区域的提前变性而分离同源和异源双链 DNA<sup>[1]</sup>, 两个突变样本的突变位点分别位于 49bp、66bp 和 145bp, 故选择 59°C、59.5°C、60°C、60.5°C 为试验柱温。

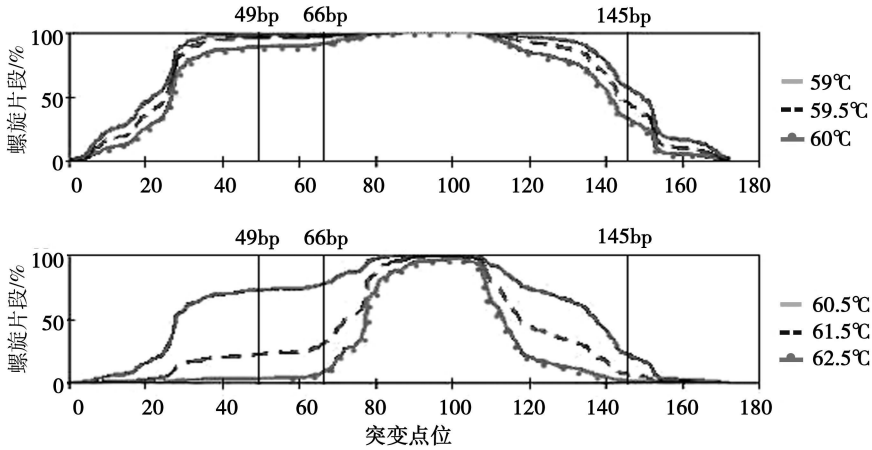


图 1 扩增片段在不同温度下的解链曲线

Fig 1 Melting profiles of the fragment under different temperature

将 M1 和 M2 的 PCR 产物分别与 Wt 标准样本的 PCR 产物按 DNA 含量比 1:1 混合缓慢复性, 产物用于 DHPLC 检测. 实验结果如图 2(a-b) 所示. 由图 2(a) 可以看出, 在四个温度下, 同源双链和异源双链能很好地分开, 此四个温度均可用于 M1 样本片段的突变检测, 而且随着温度的升高, 纯合双链也会部分变性, 由于 A=T 含有两个氢键, G=C 含有三个氢键, 前者变性程度比后者低, 在图谱上就表现为右边的峰渐渐分离出两个小峰. 由图 2(b) 可以看出, 同源双链和异源双链的最佳分离温度为 60°C, 因此, 60°C 最适合用于 M2 样本片段的突变检测, 前后两峰面积相差很大的原因推测可能和突变点的位置有关. 另外, 选择 60°C 柱温, 分别将三个样本的 PCR 产物单独进行 DHPLC 检测. 结果如图 2(c-e) 所示, 3 个样品均呈一尖锐的单峰, 表现出很高的特异性. 因此, 可以证明没有非特异性扩增产物和其它非特异性异源双链存在.

当片段只有 1 个解链温度时, 一般在该温度上下 1°C 范围内, 用 1 个温度条件即可检出该片段的点突变, 但实际工作中可能需要更多的温度条件, 特别是有 2 个解链温度的片段, 则需要在两个或多个温度条件下进行分析<sup>[5]</sup>. 能检出变异的柱温还取决于变异碱基类型及其邻近序列的影响, 有的变异在  $T_m$  值上下 4—11°C 均可检出, 而有的变异只能在特定的柱温下才能被检出<sup>[6]</sup>.

本研究中的样本片段只有 1 个解链温度 ( $T_m = 59.25^\circ\text{C}$ ), 因此, 理论上只需要 1 个温度, 即 60°C 即可检出点突变. 实验结果也表明, 在 49bp、66bp 和 145bp 处的点突变均可在 60°C 被检测, 该温度与斯坦福大学计算网站的 Melt 软件所推荐的检测柱温一致, 但是从图 1 的预测解链曲线可以看出, 60°C 时 80bp—110bp 段处于完全未解链状态, 理论上不能检出该区域的点突变, 因此, 在实际应用 DHPLC 进行未知点突变筛查时亦应该采用 2 个或多个温度分析, 现有的一些研究也建议在软件预测温度以外, 再选择上下各 2°C 的范围作检测以覆盖到全部的突变位点.

### 3 DHPLC 检测斑马鱼 p53 基因外显子 7 点突变的敏感性

将 M1 和 M2 的 PCR 产物分别与 Wt 标准样本的 PCR 产物按 DNA 含量比 1:1、1:4、1:9、1:19 和 1:99, 即突变型片段含量为 50%、20%、10%、5% 和 1% 混合缓慢复性, 产物用于 DHPLC 检测, 结果见图 3. 峰面积定性地代表同源和异源双链 DNA 的含量. 对于 M2 样本片段, DHPLC 能灵敏地检测出 PCR 混合物中 5% 的突变成分, 检测率达到 95% 以上, 对于 M1 样本片段, DHPLC 能检测出 PCR 混合物中 1% 的突变成分, 检测率达到 99% 以上.

本研究结果表明, 通过克隆测序方法检测出的点突变, 用 DHPLC 同样可以检出, 且 DHPLC 检测斑马鱼 p53 基因外显子 7 点突变的敏感性可以达到 95% 以上, 与其他学者进行的 DHPLC 检测结果一

致<sup>[7]</sup>, 明显高于常用的 DGGE, CSGE 和 SSCP 等变异检测技术<sup>[8-9]</sup>. PCR 产品的质量是影响 DHPLC 检测效果的关键因素, 要优化引物和反应体系的条件, 避免循环数过多, 以减少非特异性扩增产物的出现. PCR 产物浓度必须足够大, 如果样品浓度太低, 因为信噪比下降, 分析结果的可靠性也会随之下降. 此外, 检测时柱温的选择、DNA Sep 柱质量以及流动相梯度等都可对 DHPLC 的灵敏性、特异性产生影响<sup>[1-9]</sup>, 所以 DHPLC 的敏感性要完全达到 100% 可能还需要进一步优化.

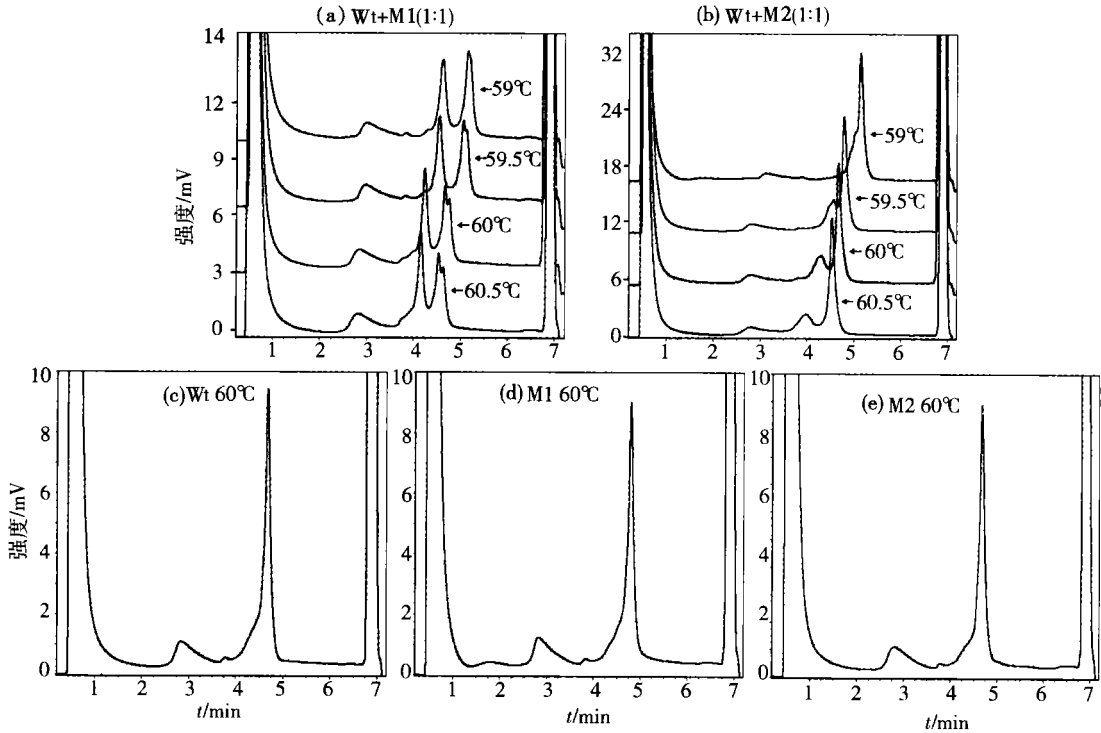


图 2 PCR 产物在不同温度下的 DHPLC 图谱

Fig 2 DHPLC chromatograms of PCR products at different temperature

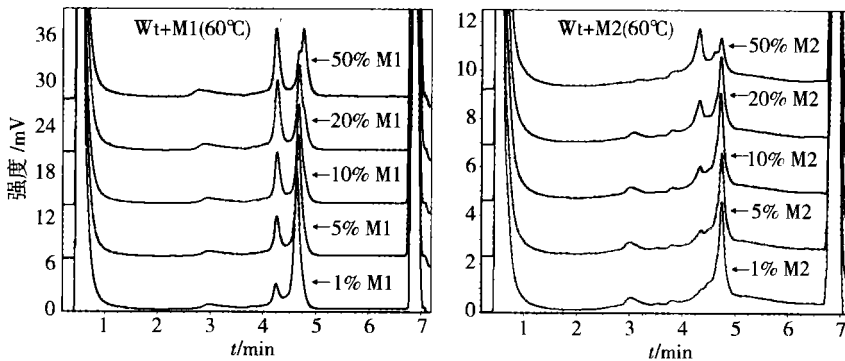


图 3 DHPLC 检测 *p53* 外显子 7 点突变的敏感性分析

Fig 3 Sensitivity of DHPLC used for *p53* exon 7 point mutation detection

#### 4 DHPLC 检测技术的特点

DHPLC 检测技术的主要特点是: 高通量检测, 适合于大规模基因突变的筛查; 自动化程度高, 提高检测效率; 灵敏度和特异度均较高, 与直接测序相当, 检测率可达 95% 以上; 快速, 每份标本的检测时间不超过 10min, 相对价廉<sup>[1, 10]</sup>. 但它只提供了定性的信息, 而无法得出具体的突变类型和突变位点. 尚需测序等后续方法证实; 其结果判断通常是由操作者进行的, 容易产生观察差异, 不利于各实验室之间的灵敏度比较; 另外, 许多片段有多个主要解链温度, 需要筛查的温度较

多,增加了工作量<sup>[6]</sup>。尽管如此, DHPLC 仍然是目前最先进的快速、高效、准确、经济及半自动化筛查基因突变的工具, 优于测序等其他分子生物学方法, 特别对于低频未知基因突变的大通量筛选。

## 5 结论

对已知序列的 3 个含外显子 7 的斑马鱼 *p53* 基因样本片段的 DHPLC 突变检测分析表明, 通过克隆测序方法检测出的点突变, 用 DHPLC 同样可以检出。DHPLC 对该片段的最优化检测柱温为 60℃, 其特异性很好, 检测敏感性大于 95%。DHPLC 可以用来筛选斑马鱼 *p53* 基因的点突变, 并可在将来发展为环境化学物质遗传突变的大通量筛查方法, 在应用 DHPLC 检测点突变时, 需要对 PCR 引物、PCR 反应体系以及柱温等参数进行优化选择。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Xiao W, Oefner P J. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review. *Human Mutation*, 2001, **17**: 439–474
- [ 2 ] Kristensen V N, Kekelofotis D, Kristensen T et al., High-Throughput Methods for Detection of Genetic Variation. *Biotechniques*, 2001, **30** ( 2 ) : 318–322
- [ 3 ] Jones A C, Sampson JR, Cheadle J P. Low Level Mosaicism Detectable by DHPLC But Not by Direct Sequencing. *Human Mutation*, 2001, **17**: 233–234
- [ 4 ] Choy Y S, Dabora S L, Hall F et al., Superiority of Denaturing High Performance Liquid Chromatography Over Single-Stranded Conformation and Conformation-Sensitive Gel Electrophoresis for Mutation Detection in TSC2. *Ann. Hum. Genet.*, 1999, **63**: 383–391
- [ 5 ] Gross E, Kiechle M, Amold N, Mutation Analysis of *P53* in Ovarian Tumors by DHPLC. *J Biochem Biophys Methods*, 2001, **47**: 73–81
- [ 6 ] Jones A C, Austin J, Hansen N et al., Optional Temperature Selection for Mutation Detection by Denaturing HPLC and Comparison to Single-Stranded Conformation Polymorphism and Heteroduplex Analysis. *Clin. Chem.*, 1999, **45**: 1133–1140
- [ 7 ] Amold N, Gross E, Schwarz-Boeger U et al., A Highly Sensitive Fast and Economical Technique for Mutation Analysis in Hereditary Breast and Ovarian Cancers. *Human Mutation*, 1999, **14**: 333–339
- [ 8 ] Kuklin A, Munson K, Gjerdet D et al., Detection of Single Nucleotide Polymorphism with the WAVE DNA Fragment Analysis System. *Genet. Testing*, 1997, **1** ( 3 ) : 201–206
- [ 9 ] Skopek T R, Glab W E, Monroe J J et al., Analysis of Sequence Alterations in a Defined DNA Region: Comparison of Temperature Modulated Heteroduplex Analysis and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Mutat. Res.*, 1999, **430** ( 1 ) : 13–21
- [ 10 ] Shen J, Wang R T, Xu X P. Screening Unknown SNPs by Denaturing High Performance Liquid Chromatography (DHPLC). *Foreign Medical Sciences (Section Genetics)*, 2001, **24** ( 6 ) : 341–344

## DHPLC AS A HIGH-THROUGHOUT METHOD FOR MUTATION ANALYSIS

GU Ying<sup>1</sup> LI Yan<sup>1</sup> CHEN Weifeng<sup>1</sup> YIN Da-qiang<sup>1</sup> ZHAO Qing-shun<sup>2</sup>

( 1 School of the Environment, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse,  
Nanjing University, Nanjing 210093, China

2 Model Animal Research Center, State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, Nanjing University, Nanjing 210061, China

### ABSTRACT

In this paper, we reported the optimal temperature and sensitivity of denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) for mutation detection in zebrafish *p53* gene fragment containing exon 7. Our results showed that two point mutated samples determined by sequencing were also detectable by DHPLC. The optimal temperature to detect the point mutation of this fragment is 60℃ and the sensitivity for detecting molecules with point mutation is more than 95%. The results indicated that DHPLC can be developed to detect the point mutation of zebrafish *p53* gene.

**Keywords** DHPLC, zebrafish, *p53* gene, point mutation