

# p53 基因第 8 外显子实时荧光 PCR 方法的建立

卫俊杰<sup>1</sup>, 刘 华<sup>2</sup>, 苏艳丹<sup>2</sup> (1. 云南省中医院检验科, 昆明 650021; 2. 昆明医学院第一附属医院检验科基因研究室 650032)

**【摘要】** 目的 建立实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 p53 基因第 8 外显子的方法。方法 用酚-氯仿抽提法提取云南省中医院的常规体检患者的 DNA, 应用 SYBR Green I 作荧光染料, 通过检测 PCR 产物中荧光讯号的强度来定量 p53 基因, 重复测定该标本 18 次, 以此建立检测 p53 基因的实时荧光定量 PCR 方法。结果 融解曲线分析表明该方法特异可靠。结论 该研究建立了 p53 基因实时荧光定量 PCR 检测方法, 该方法简便、特异、重复性好、可信度高, 为 p53 基因第 8 外显子的定量研究提供了理想的检测方法。

**【关键词】** p53 基因; 检测方法; 聚合酶链反应

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.04.019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)04-0421-01

**Establishment of real-time PCR for P53 detection** WEI Jun-jie<sup>1</sup>, LIU Hua<sup>2</sup>, SU Yan-dan<sup>2</sup> (1. Department of Laboratory, Yunnan Provincial Hospital of TCM, Kunming, Yunnan 650021, China; 2. Gene Research Room, Department of Laboratory, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650032, China)

**【Abstract】 Objective** To establish the real-time PCR for p53 8th exon. **Methods** DNA was extracted by Trizol from the people having examination in our hospital. SYBR Green I was used as staining reagent. p53 8th exon was quantitatively analyzed by determining the intensity of fluorescent signals. The detection was repeated 18 times to establish the needed method. **Results** Specific and reliable results were achieved. **Conclusion** A simple, specific, repeatable and reliable method has been established for detection of p53 8th exon.

**【Key words】** p53; detecting method; PCR

p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因。在短短的十多年里, 人们对 p53 基因的认识经历了从癌蛋白抗原、癌基因到抑癌基因的 3 个认识改变, 野生型 p53 参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程。基因突变、缺失或重排而造成功能改变或失活, 促进细胞转化, 导致肿瘤的发生。DNA 损伤是 p53 较常见的一种功能改变。实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)是将荧光能量传递技术应用与常规多聚 PCR 仪中, 通过受体发色团之间偶级-偶级相互作用, 能量从供体发色团转移到受体发色团, 受体荧光染料发射出的荧光讯号强度与 DNA 产量成正比, 检测 PCR 过程的荧光讯号便可得知靶序列初始浓度, 从而达到定量目的。

在定量 PCR 中, 需要经过数个循环后荧光信号才能够被检测到。荧光阈值的缺省设置是 3~15 个循环的荧光信号的标准偏差的 10 倍。但实际操作中一般以前 10 个循环的荧光信号作为荧光本底信号。C 代表循环(cycle), t 代表荧光阈值(threshold), Ct 值的含义是: 每个反应管内的荧光信号达到设定的阈值时所经历的循环数, 它可被视为一种特殊的反应时间, 而该值在反应条件一致、底物充足时, 主要与加入的反应物的起始拷贝数的倍数呈负相关。其他研究表明, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct 值越小。因此, 只要获得未知样品的 Ct 值, 即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数<sup>[1]</sup>。

针对 p53 基因进行定量扩增, 当发生 DNA 损伤的时候, 定量水平就发生相应的下降。通过建立这样的定量方法就可以检测 p53 基因的损伤程度。

## 1 材料与方 法

**1.1 仪器与试剂** ABI 生产的 Gene Amp 5700 Sequence Detection, 为日本 OSAKA 公司产品; SYBR Green Realtime PCR Master Mix 包含有 dNTPs、MgCl<sub>2</sub>、Taq DNA 多聚酶、抗 Tap 单克隆抗体、SYBR Green I 等。引物由大连宝生物设计合成,

扩增范围主要为 P53 基因第 8 外显子。引物序列: 蒸馏水为灭菌注射用纯水。

**1.2 标本来源** 选取本院常规体检健康人的乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K<sub>2</sub>)抗凝血液标本。阴性对照为灭菌注射用纯水。

### 1.3 方法

**1.3.1 DNA 的提取** 采用改良酚-氯仿抽提法。

**1.3.2 PCR 体系** 上游引物 0.5 μL; 下游引物 0.5 μL; 蒸馏水 23 μL; 模板 DNA 150 ng; SYBR Green Realtime PCR Master Mix 25 μL; Total 50 μL。

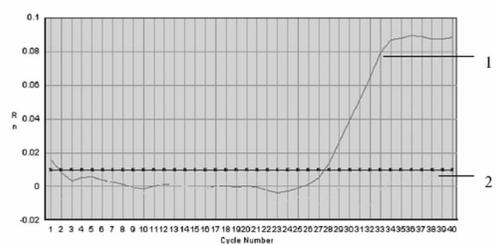
**1.3.3 PCR 扩增** 4 步法。

94 °C 45 s }  
 94 °C 5 min → 58 °C 45 s } × 40 次循环 → 72 °C 5 min。  
 72 °C 45 s }  
 89 °C 5 s }

**1.4 统计学方法** 使用 SPSS10.0 统计软件对数据进行统计分析。重复测定同一份标本 20 次, 对所得数据进行正态分析, 所得正态数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结 果

**2.1 阴性和阳性标本定量扩增结果** 见图 1, 阳性标本记录的曲线呈典型的“S”型, 而阴性对照则基本呈直线。



注: 1 为阳性标本; 2 为阴性对照。

图 1 扩增曲线

**2.2 融解曲线** 见图 2, 所测标本在 89 °C 时(下转第 423 页)

表 3 正常形态精子百分率

正常形态精子	0	0~15	>15
n	28	306	68
比例(%)	6.6	72.9	20.5

### 3 讨论

精液常规分析是用于诊断男性生育最基本的临床指标,精液常规分析只对精液理化性状进行评估,以此来预测男性生育状况很不准确。精子形态是受孕过程中起重要作用的参数之一,被认为是衡量男性生育中最好的指标<sup>[1-2]</sup>。形态正常的精子的百分率与受孕有直接关系,比精子密度、精液量、活动率更能在受孕中起预测作用。研究显示精子形态与其功能密切相关。任何精子形态上的缺陷将导致其功能下降,影响男性生育力。

一般男科学认为,生育健康男性精液中正常精子大于 70%,畸形精子少于 20%~40%。畸形精子大于 40%即为畸形精子症,它可能影响生育能力<sup>[3-4]</sup>。如畸形精子超于 70%,则属于严重的畸形精子症,会影响男性生殖能力,导致不育。如正常形态小于 15%体外受精极低。各种异常精子形态中,头部畸形比率最高占 50%,大多数畸形精子是顶体异常,这种精子很难穿透卵子透明带,精子缺失后顶体就不能与卵子结合,妨碍受精过程,或受精失败。睾丸疾病、睾丸功能低下是畸形精子发生的主要原因<sup>[5]</sup>。附睾的分泌不足,使精子不能进一步成熟,造成精子顶头不足,畸形;尾部卷曲,胞质不能浓缩排出,而残存胞质小体,颈部膨大,折头;尾部成熟不足,引起运动过小、过大、转圈运动等。当解脲支原体感染时,精子表现为光

头、头尾折角、卷尾<sup>[6]</sup>。有资料显示,精子正常形态率与不良孕史密切相关。精子畸形率高会导致习惯性流产、胎儿停止发育、胎儿畸形等。测定精子正常形态率可为不良孕产史夫妇查找病因,作为临床诊治的依据。

因此,精子形态染色在临床男性不育的诊断中占有重要地位。在进行常规精液分析时,增加形态学染色项目,对男性不育患者的诊治有很大帮助,有助于临床为不孕患者选择助孕方式,为有不良孕产史夫妇查找病因,作为临床诊治的依据。

### 参考文献

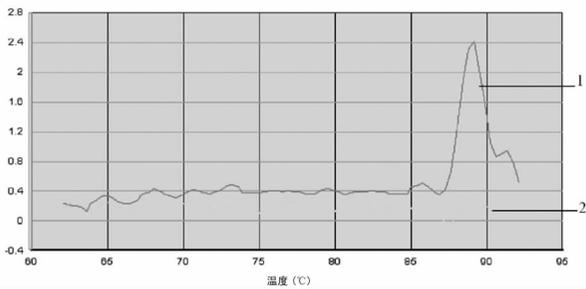
- [1] 黄宇烽. 男性病实验诊断手册[M]. 2 版. 南京:东南大学出版社,1993.
- [2] 黄平怡,李永梅. 男性不育[M]. 北京:中国科学技术文献出版社,1990.
- [3] 徐建平,徐元诚,黄宇烽. 精液参数分析的几种方法比较与评价[J]. 生殖与避孕,1997,17(5):2.
- [4] Weber RF, Dohle GR, Momijn JC. Clinica laboratory evaluation olnalc subfertility[J]. Adv Clin Chem, 2005, 40: 317-364.
- [5] Gomendio M, Malo AF, Garde J, et al. Male fertility sperm traits and male fertuluty in natural populations[J]. Reproduction, 2007, 134: 19-29.
- [6] 袁祖立,杨楷. 不育男性精子分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2006, 5(9): 1381.

(收稿日期:2010-10-29)

(上接第 421 页)

出现荧光最高吸收峰,而阴性标本在该温度无此峰。

2.3 重复性测定 18 次测定该标本 Ct 值分别为 23. 80、27. 97、25. 38、27. 60、27. 61、27. 16、23. 11、27. 78、28. 35、20. 52、23. 76、21. 18、25. 01、25. 23、25. 19、26. 93、25. 74、25. 73。经过正态检验得: $P=0. 2>0. 05$ ,为正态分布,算术均数为 25. 45,标准差值为 2. 28,变异系数值为 9. 0%。



注:1 为阳性标本的融解曲线;2 为阴性对照的融解曲线。

图 2 融解曲线

### 3 讨论

p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因<sup>[1]</sup>。野生型 p53 参与了 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞凋亡及抑制血管生成等过程。DNA 损伤是 p53 较常见的一种功能改变。由于 DNA 损伤不同于点突变,难于采用传统的限制性酶切或 SSCP 等方法确认。本文中作者结合实时荧光定量 PCR 针对 p53 基因的第 8 进行定量扩增,当发生 DNA 损伤的时候,定量水平就发生相应的下降。通过建立这样的定量方法就可以有效的检测 p53 基因的损伤程度。通过对同一标本的重复测定,说明该方法有一定的可靠性,且该方法简便,只需进行一次 DNA 的扩增即可发现异常。为 p53 基因 DNA 损伤的

研究提供了一条新思路。

作者采用的是 SYBRGreenI 染料标记的实时荧光定量方法,由于该染料是非特异性的与双链 DNA 结合,因此在反应过程中产生的少量引物二聚体也可能对结果造成干扰。为了消除干扰,作者又在 65 °C~93 °C 对产物进行了融解曲线的测定,发现在 89 °C 附近有一个由产物形成的荧光峰,因此又在循环过程中在 89 °C 时增加 5 s 的停留,因为 5700 扩增是在循环的最后一步记录荧光,这一措施有效地消除了引物二聚体对反应的干扰。这一措施在目前的 SYBRGreenI 染料标记的实时荧光定量方法中尚少见报道,具有一定的创新性和可实施性。PCR 技术由于具有高敏感性,往往出现污染问题,作者在实验过程中充分考虑到了该问题,首先是根据卫生部对 PCR 实验室的要求对实验室进行合理分区,实验用器械均专室专用,实验室具备完整的防污染规章制度,并且获得了卫生部技术验收合格证书。检测过程中设立了阴性对照,证明实验过程中无污染。

SYBRGreenI 染料标记的实时荧光定量 PCR 技术,直接检测 PCR 过程中荧光信号的变化使 PCR 的扩增及其分析过程的均在同一封闭系统下完成,只需加样时打开一次 PCR 反应管,其后的过程完全是闭管操作,免除了标本和产物的污染,且无复杂的产物后续处理过程,高效、快速,并在电脑分析软件支持下实现对 PCR 扩增产物的动态监测和自动定量;荧光染料能监测任何 dsDNA 序列的扩增,不需要设计探针,使检测方法变得简便化,同时也降低了检测的成本。

### 参考文献

- [1] 付春华,陈孝平,余龙江,等. 实时荧光定量 PCR 的应用和进展[J]. 激光生物学报, 2005, 14(6): 466-471.

(收稿日期:2010-08-26)