



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410062751.2

[45] 授权公告日 2007年1月10日

[11] 授权公告号 CN 1294279C

[22] 申请日 2004.7.9

[21] 申请号 200410062751.2

[30] 优先权

[32] 2004.4.5 [33] CN [31] 200410014540.1

[73] 专利权人 周国华

地址 210002 江苏省南京市中山东路 293 号军事医学研究院

[72] 发明人 周国华

[56] 参考文献

CN1398988A 2003.2.26 C12Q1/68

CN1265155A 2000.8.30 C12Q1/68

CN1425075A 2003.6.18 C12Q1/68

CN1308135A 2001.8.15 C12Q1/68

EP0496027A1 1992.7.29 C12Q1/68

审查员 赵彦豪

[74] 专利代理机构 南京天华专利代理有限责任公
司
代理人 夏平

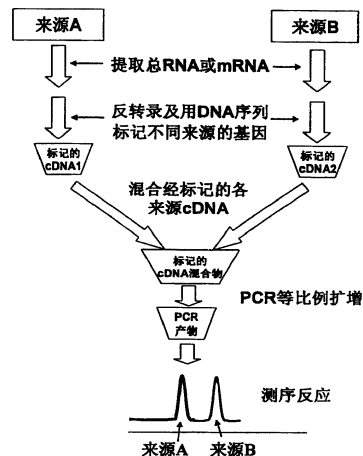
权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 3 页

[54] 发明名称

采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种用于定量比较同一基因在不同来源中的表达量的分析法，它利用生物发光法的定量特性和逐个加入不同的三磷酸脱氧核糖核苷 (dNTP) 的原理，定量比较同一基因在不同来源组织或细胞间的基因表达量差异。具体步骤为：将不同来源的信使核糖核酸 (mRNA) 反转录成 cDNA，并在各来源 cDNA 中标记一段来源特异性 DNA 序列；将经标记的各来源 cDNA 混合于一管中，作为聚合酶链反应 (PCR) 的底物；用一个共用引物和一个基因特异性引物进行 PCR 扩增；采用生物发光分析法测定碱基序列，其中碱基种类代表基因的不同来源，信号强度代表各来源中基因表达量。该方法对疾病相关基因的筛选、对临床早期诊断和创制治疗疾病的特效药具有重大意义。



1、一种采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法，它具有如下特征：

(a) 用序列不同的 DNA 片段使不同来源的信使核糖核酸 (mRNA) 的反转录产物互补 DNA (cDNA) 中含有一段来源特异性序列；

(b) 将经标记的各来源 cDNA 混合于一管中，作为聚合酶链反应(PCR) 的底物，用一个共用引物和一个基因特异性引物进行 PCR 扩增；

(c) 用生物发光分析法测定上述 PCR 扩增产物中与基因来源相对应的一段碱基序列，以碱基种类代表基因的不同来源，其信号强度代表各来源中基因表达量。

2、按权利要求 1 所述的采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法，其特征在于所述的不同来源是指不同的组织或细胞。

3、按权利要求 1 所述的采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法，其特征在于所述的 DNA 序列标记法是指用序列不同的引物分别反转录不同来源的 mRNA，使各来源的 cDNA 标记上序列不同的 DNA 片段；所述的序列不同的引物是指其 3' 端由多个胸腺嘧啶碱基组成，在 3' 端与 5' 端之间含有一段基因来源特异性的序列，并且在这段序列与该链的 5' 端之间含有一段不随基因来源而改变的碱基序列。

4、按权利要求 1 所述的采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法，其特征在于所述的共用引物是指其序列与权利要求 3 中所述的不随基因来源而改变的碱基序列中的全部序列相同。

5、按权利要求 1 所述的采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法，其特征在于所述的生物发光分析法是指定量测定延伸反应产生的焦磷酸盐 (ppi) 的方法。

6、按权利要求 5 所述的采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法，其特征在于所述的延伸反应是指以权利要求 1 中的 PCR

扩增产物或其单链产物为模板，加入测序引物进行退火，然后按一定次序逐个加入三磷酸脱氧核苷酸（dNTP），或三磷酸双脱氧核苷酸（ddNTP），在 DNA 聚合酶的作用下，当所加 dNTP 或 ddNTP 与模板互补时，所发生的聚合反应。

采用碱基序列测定法比较同一基因在不同来源中的表达量的方法

技术领域

本发明涉及一种定量比较同一基因在不同来源的组织或细胞中相对表达量的方法，具体说是一种用碱基测序的方法同时测定经不同碱基序列标记的 DNA 片段混合物中各 DNA 片段相对含量的方法。

背景技术

随着分子生物学和分析仪器的进步，人类基因组计划的测序工作已经完成，现已从构造分析转向功能分析[1]，即了解基因转写产物 mRNA 的分布状态及 mRNA 的翻译产物蛋白质在细胞及脏器组织中的存在量、分布情况和作用。通过比较健康和疾病个体间的基因表达量，可以寻找和发现疾病相关基因，进而用于临床早期诊断[2]。在药物筛选中，测定给药组与未给药组的相关基因表达量，可以发现药物的作用靶点，寻找创制治疗疾病的特效药[3]。因此，基因表达量的差异分析已逐渐成为“后测序时代”的主要任务之一。发达国家先后投入了很大的财力和物力，力争在该领域抢占制高点，实行技术垄断。目前用于比较基因表达量差异的分析方法主要有 SAGE 法[4]、RT-PCR 法[5]和微阵列法（即基因芯片）[6]等，但这些方法仍有一些缺点，主要表现在一次只能比较两个个体间的基因表达量的差异，仪器价格昂贵，操作复杂和定量性能差等。如 SAGE 法，测定相当繁琐，步骤多，难以掌握，成本也高，很难普及；RT-PCR 法的测定需使用专用仪器，且需用内标，测定繁琐，重复性差；微阵列法是一种高通量的测定方法，虽然测定批量大，可在一片芯片上同时测定若干个基因，但需要用荧光染料标记样品，灵敏度低，仪器价格昂贵，数据处理也较复杂，更主要的问题是其定量性能差，难于准确比较某一基因在不同来源间表达量差异。

采用生物发光技术测定碱基序列是新近发展起来的一种崭新技术

[7-8], 该法简便快速, 仪器价格便宜, 测定成本低, 易于自动化。但由于仅能测定 10-30 个碱基序列, 故该法仅限于分析基因的突变和基因的多态性[9]。

发明内容

本发明的目的就是采用了碱基序列测定的技术研究同一基因在不同来源中的相对表达量的方法, 即如何通过测定几个碱基的序列来测定基因的相对表达量, 建立一种灵敏度高、定量性好、价格低廉、操作方便的方法, 并用于临床诊断。

本发明的技术解决方案如下, 其测定原理如图 1 所示。

(1) 碱基序列法标记不同来源的同一基因

有两种方法来实现: 第一种方法是 DNA 适配器标记法, 即先提取不同来源组织或细胞中的总 RNA 或 mRNA, 并将其反转录成双链 cDNA, 再用限制性内切酶将各来源的 cDNA 切成不同长度的 DNA 片段, 分别将各来源的 cDNA 酶解产物与可区分不同来源的 DNA 适配器相连接, 使各来源的 cDNA 标记上序列不同的 DNA 适配器。DNA 适配器由两条不完全互补的单链 DNA 组成, 其结构如图 2 所示, 即一端含有与上述限制性内切酶切口互补的序列 1, 在连接酶作用下能与双链 cDNA 酶解片段连接; 另一端为“Y”形结构, 由一段不互补的碱基序列 2 和 3 组成, 也可以将序列 3 设计成与序列 2 互补, 但此时序列 3 的 3' 端必须加以适当的修饰使之不能在聚合酶的作用下发生延伸反应。序列 2 中含有一段基因来源特异性的序列 4, 并且在这段序列与该链的 5' 端之间含有一段不随基因来源而改变的碱基序列 5。可以将不同的基因来源特异性 DNA 适配器设计成仅在序列 4 处的碱基序列不同, 而组成该段序列的碱基种类和数目相同。

第二种方法为反转录引物标记法, 即先提取不同来源组织或细胞中的总 RNA 或 mRNA, 用序列不同的引物分别将其反转录成 cDNA, 使各来源的 cDNA 标记上序列不同的 DNA 片段。反转录引物的结构如图 3 所示, 其

3' 端即图中序列 1 由多个胸腺嘧啶碱基组成, 在 3' 端与 5' 端之间含有一段基因来源特异性的序列 2, 并且在序列 2 与该链的 5' 端之间含有一段不随基因来源而改变的碱基序列 3。可以将不同的基因来源特异性反转录引物设计成仅在序列 2 处的碱基序列不同, 而组成该段序列的碱基种类和数目相同。

(2) PCR 等比例扩增不同来源的同一基因片段

通常由组织中提取的目的基因的表达量很少, 必须经过 PCR 扩增才能检测到。如何在单管中等比例扩增上述经标记的不同来源的同一基因是本专利的关键技术之一。首先根据目的基因序列设计一条基因特异性引物 GSP; 同时设计另一共用引物 CP, 其序列与图 2 中的序列 5 (用 DNA 适配器标记时) 或图 3 中的序列 3 (用反转录引物标记时) 相同。在引物 CP 和 GSP 的存在下, 若某来源中存在目的基因, 则 GSP 首先与之退火并发生延伸反应, 引物 CP 与该延伸产物退火并延伸, 如果没有 GSP 的延伸产物, 引物 CP 不会延伸。由于采用一对共同引物 CP 和 GSP 扩增不同来源的同一基因片段, 且扩增产物的 T_m 值完全相同 (长度和碱基种类相同), 所以能够保证 PCR 的等比例扩增。

如果图 2 中臂 3 与臂 2 互补, 则臂 3 就会在 DNA 聚合酶的作用下延伸, 产生供引物 CP 退火的模板, 这样就不能实现不同来源基因的等比例 PCR 扩增。

(3) 不同来源基因扩增产物的序列测定

目前通常的测序反应是基于凝胶电泳的原理, 但这种方法属于定性测定序列, 定量性能差; 并且不能测定引物后面碱基的序列, 即不适用于测定前 50 个碱基的序列。基于 PPi 测定的生物发光测定法, 如焦测序法, 是通过依次逐个循环加入各 dNTP 进行测序反应, 不但可以直接测定引物后面的碱基序列, 而且定量性能很好, 能通过测量峰高确定重复碱基的个数。本发明采用基于 PPi 测定的测序法测定不同来源基因扩增产物的序列, 根据序列中碱基的种类区别各来源的基因, 根据峰强度就可

判断不同来源的基因表达量差异。

基因表达量分析是基因组学研究的重要内容，本发明旨在将测序技术用于基因表达量差异的比较分析中。与现有技术相比，其创新性表现在：通过一次分析就可以同时测得相同基因在多个不同个体中的表达量差异，且不需增加额外的测定成本。易于仪器化，不需要使用激光、凝胶、荧光标记和电泳。本发明方法灵敏度高、定量性好、价格低廉、操作方便，具有很大的应用前景。本发明方法对疾病相关基因的筛选、对临床早期诊断和创制治疗疾病的特效药具有重大意义，也可以用于研究人体、动物或细胞在药物等方法处置下，各相关基因的表达情况。

附图说明

图 1 是本发明基因表达量差异测定原理图。

图 2 是 DNA 适配器的构造示意图。

图 3 是反转录引物构造示意图。

图 4 是用 DNA 适配器法标记人脑癌组织、正常组织和肝癌组织中的 P53 基因时的测序结果图。

图 5 是用反转录引物法标记人肝癌细胞和人膀胱癌细胞中的 P53 基因时的测序结果图。

具体实施方式

下面以具体事例来阐述以上方法，主要实验步骤如下：

(1) 标识不同来源的同一基因。分别提取各个体中相关组织或细胞中的总 RNA 或 mRNA，并测定其浓度。然后按照 DNA 适配器标记法或反转录引物标记法，使各来源的 cDNA 标记上序列不同的 DNA 适配器或序列不同的 DNA 片段。当以 DNA 适配器标记法标记时，首先将 mRNA 反转录成双链 cDNA，用可识别四个碱基序列的限制性内切酶 (Mob I) 将 cDNA 切割

成一定长度的片段，分别用含有基因来源特异性序列的 DNA 适配器与之相连接，然后再将经 DNA 适配器标记的各来源 cDNA 片段混合，作为 PCR 扩增反应的模板。当以反转录引物标记法标记时，分别用各来源相对应的反转录引物，将 mRNA 反转录成 cDNA，纯化后混合，作为 PCR 扩增反应的模板。

(2) PCR 扩增。以与基因来源无关的共用引物 (CP)，和一个基因特异性引物 (GSP) 对 (1) 中的 DNA 模板进行 PCR 扩增反应。由于采用同一对引物 CP 和 GSP 扩增多个来源的同一基因，故该基因在各来源中的相对比例在扩增过程中保持不变，即以相同的比例扩增，而不会随着扩增次数的增加而变化。如要分别测定多个基因在上述不同来源中的表达量差异时，仅需改变基因特异性引物 GSP 即可。

(3) 同时定量测定不同来源的基因片段扩增产物。用微球技术或酶切技术将扩增的 PCR 产物制备成单链后，加入与模板序列互补的通用引物进行退火。也可以直接将 PCR 产物纯化后，加入与模板序列互补的通用引物进行退火。然后用生物发光测序法测定碱基的序列，即在含有底物的溶液中分别加入与基因来源相对应的 dNTP 或 ddNTP，如所加入的 dNTP 或 ddNTP 与模板互补，则释放出焦磷酸盐 (PPi)，PPi 在酶的作用下可迅速转化成 ATP，ATP 与 luciferin 和 luciferase 反应产生光信号。所得结果中的碱基序列代表着基因的不同来源，信号强度代表各来源的基因表达量。根据各个体的基因表达量的差异，可迅速判断基因的功能和发现与疾病相关的功能基因。

【实施例 1】人正常组织、脑癌组织和肝癌组织中 P53 基因表达量差异的测定。

本例叙述了以 DNA 适配器标记法标记测定三个不同来源组织中 P53 基因的相对表达量。首先设计三种不同的 DNA 适配器，分别与经限制性内切酶消化过的 cDNA 片段连接，然后混合进行 PCR 扩增。

1. cDNA 样品的制备

(1) 总 RNA 的提取：取人正常组织、脑癌组织和肝癌组织各 0.1g，加 1 ml Trizol 于组织研磨器中研磨，按照 Trizol 说明书操作提取总 RNA。经电泳鉴定其 28s 和 18s 条带完好无降解后，用紫外吸收光谱法测定其浓度，再用灭菌 DEPC-H₂O 调节终浓度为 1 μg/μl。

(2) cDNA 第一链的合成：Oligo(dt)₁₈ (100 pmol/L) 1 μl 和总 RNA (1 μg/μl) 3 μl，70°C 10 min 后，置于冰上，加入 5 倍浓度的第一链缓冲液 4 μl，0.1 mol/L DTT 2 μl，RNase 抑制剂 (40 U/μl) 1 μl，dNTP 混合物 (各 2.5 mmol/L) 4 μl，DEPC-H₂O 4 μl，37°C 2 min，加入 Superscript II (200 U/μl) 1 μl，于 42°C 1 h，70°C 10 min，冰上冷却。

(3) 双链 cDNA 的合成：在上述混和液中加入 5 倍浓度的第二链缓冲液 30 μl，dNTP 混合物 (2.5 mmol/L each) 12 μl，E coli 连接酶 (10 U/μl) 1 μl，DNA 聚合酶 I (4 U/μl) 10 μl，RNase H (2 U/μl) 1 μl，加入 DEPC-H₂O 至总体积为 150 μl，16°C 2 h，70°C 10 min。

2. 标识不同来源的同一基因

(1) 酶切反应：取双链 cDNA 10 μl，加入 10 倍浓度的缓冲液 2 μl，Mbo I TaKaRa 内切酶 (10 U/μl) 1 μl，灭菌蒸馏水 7 μl，共 20 μl 反应体系，置于 37°C 水浴中反应 2 h，再置于 70°C 10 min，使 Mbo I 酶灭活。Mbo I 内切酶的特性是能识别 DNA 中 5' → 3' 的 GATC 顺序，并切断使之形成 5' 端突出 GATC 的粘性末端。

(2) 连接反应：取等体积的各来源的酶切反应液，分别与三种不同的 DNA 适配器相连，三个 DNA 适配器中有一条链 adp-4 是相同的，另一条链中含有四个基因来源特异性的碱基，这四个碱基仅是序列不同，均由 c, t, g, c 组成，其序列分别为：adp-1: 5' - ccc cac ttc ttg ttc tct cat gtca cg cat cac tcg-3' ; adp-2 : 5' - ccc cac ttc ttg ttc tct cat ctga cg cat cac tcg-3' ; adp-3 : 5' - ccc cac ttc ttg ttc tct cat atcg cg cat cac tcg-3' ; adp-4 : 5' -gat ccg agt gat gcg cta ag-3' ，其中下划线斜体部分为基因来源特异性的碱基。adp-1

与 adp-4 构成一个 DNA 适配器 1, adp-2 与 adp-4 构成 DNA 适配器 2, adp-1 与 adp-4 构成另一个 DNA 适配器 3, 且都具有 5' 端突出四个碱基 GATC 的结构。DNA 适配器 1, 2 和 3 分别用于标记人正常组织、脑癌组织和肝癌组织中的 P53 基因。取酶切液 1 μ l, 加入构成 DNA 适配器的两条单链 (10 pmol/L) 各 2 μ l, 10 倍 T4 DNA 连接酶缓冲液 2 μ l, 灭菌蒸馏水 11 μ l, 置于 70°C 10 min, 然后以 0.2°C/s 的速度降至 16°C, 加入 T4 DNA 连接酶 (4 U/ μ l) 2 μ l, 反应 2 h。

3. PCR 扩增及单链的制备

(1) PCR 扩增: 将上述三个不同来源的连接产物按 1: 1: 1 的比例混合于同一反应管中, 分别加入共用引物 (CP, 5' - ccc cac ttc ttg ttc tct cat-3') (10 pmol/L) 2 μ l, 生物素标记的 P53 基因的特异性引物 (5' - gga gca cta agc gag cac tg-3') (10 pmol/L) 2 μ l, Mg^{2+} (25 mmol/L) 3 μ l, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 4 μ l, 10 \times PCR Buffer 5 μ l, TaKaRa Taq DNA 聚合酶 (5 U/ μ l) 0.5 μ l, 加灭菌蒸馏水至总体积 50 μ l, 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为: 94°C 30s, 60°C 30s, 72°C 30s, 反应 35 个循环。最终得到的产物是生物素标记的双链 DNA。

(2) 单链的制备: 取 25 μ l M280 磁珠, 按照使用说明书的要求洗涤, 溶于 50 μ l 的 2 \times B&W Buffer (洗涤缓冲液) 中, 加入等体积的 PCR 产物, 反应 30 min, 反应过程中轻轻振摇使磁珠始终处于悬浮状态。用磁铁固定磁珠, 弃去上清液, 用 1 \times B&W Buffer 洗涤 2~3 次后加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 20 μ l, 反应 5 min, 吸取上清液至另一试管中, 用稀 HCl 调节 pH 值为 6~7, 冷藏保存。固相的磁珠洗涤后溶于 1 \times B&W Buffer 中保存, 待用。

4. 碱基序列测定法比较同一基因在不同来源组织中的相对表达量

取上述单链 DNA 样品 (步骤 3 中的微球) 制备成含有 25 mM Mg^{2+} 和 5 mM Tris (pH 7.7) 的溶液, 并分别加入 5 pmol 的共用引物 CP, 70°C 加热 10min 后自然冷却至室温。取 1~5 μ l 加入到 100 μ l 的序列测定

标准混合液中，然后依次加入 dNTP，进行测序反应。

序列测定标准混合液组成为：0.1 M Tris-HAc (pH 7.7)，2 mM EDTA，10 mM Mg(Ac)₂，0.1%白蛋白 (BSA)，1mM 二硫苏糖醇 (DTT)，3 μM 5' - 磷酸化硫酸腺苷 (APS)，0.4 mg/ml 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)，0.4 mM 荧光素，200 mU/ml 三磷酸腺苷硫酸化酶，2U/ml 三磷酸腺苷双磷酸酶 (apyrase)，1U 无外切酶活性的 DNA 聚合酶 Klenow，及适量荧光素酶。

5. 测定结果

由于 DNA 适配器 1，2 和 3 分别用于标记人正常组织、脑癌组织和肝癌组织中的 P53 基因，当加入 dGTP 时所得信号强度代表来源于人正常组织的基因表达量，当加入 dCTP 时所得信号强度代表来源于人脑癌组织的基因表达量，当加入 dATP α S (dATP 的类似物) 时所得信号强度代表来源于人肝癌组织的基因表达量。测序结果如图 4 所示，图中所示序列的第一个碱基“C”来自于 DNA 适配器 2，代表脑癌组织中 P53 基因的表达量 A1；第二个碱基“G”来自于 DNA 适配器 1，代表正常组织中 P53 基因的表达量 A2；第三个碱基“A”来自于 DNA 适配器 3，代表肝癌组织中 P53 基因的表达量 A3，这三个碱基序列的峰高比代表着 P53 基因在这三种来源中的表达量差异，两次测定结果 (A1: A2: A3) 分别为：28.20 : 24.9 : 46.9 和 28.1 : 22.4 : 49.5，平均比值 (A1: A2: A3) 为：28.15 : 23.65 : 48.2。

【实施例 2】 人肝癌细胞和膀胱癌细胞中 P53 基因表达量差异的测定。

本实施例主要是采用反转录引物标记法测定 P53 基因在人肝癌细胞和膀胱癌细胞中的表达量差异，即用序列不同的引物分别反转录不同来源的 mRNA，使各来源的 cDNA 标记上序列不同的 DNA 片段。并与 RT-PCR 的测定结果作对比。

1. 测定样品的制备

按【实施例 1】的方法，分别从人肝癌细胞和膀胱癌细胞中提取总 RNA，经电泳检定质量完好后，紫外测定其浓度，然后用 DEPC-H₂O 调节终浓度为 1 μ g/ μ l。分别用反转录引物 P-1 和 P-2 将人肝癌细胞和膀胱癌细胞中的 mRNA 反转录成 cDNA。反转录引物 P-1 和 P-2 的序列为，P-1：5' - ccc cac ttc ttg ttc tct cat cag ttt ttt ttt ttt ttt-3' ； P-2：5' - ccc cac ttc ttg ttc tct cat gac ttt ttt ttt ttt ttt-3' 。

反应步骤为：取引物 P-1 或 P-2 (10 pmol/L) 3 μ l 和总 RNA (1 μ g/ μ l) 3 μ l，70 $^{\circ}$ C 10 min 后，置于冰上，加入 5 倍浓度的第一链缓冲液 4 μ l，0.1 mol/L DTT 2 μ l，Rnase 抑制剂 (40 U/ μ l) 1 μ l，dNTP 混合物 (2.5 mmol/L each) 4 μ l，DEPC-H₂O 2 μ l，37 $^{\circ}$ C 2 min，加入 SuperScript[™] II RNase H⁻ 反转录酶 1 μ l，于 42 $^{\circ}$ C 1 h，70 $^{\circ}$ C 10 min，冰上冷却。将其纯化后，取等体积混合，作为 PCR 反应的模板。

2. PCR 扩增及单链的制备

按照【实施例 1】的方法进行 PCR 扩增及制备单链，其中共用引物 CP 与基因特异性引物均与【实施例 1】相同。

3. 碱基序列测定法比较同一基因在不同来源组织中的相对表达量

取上述单链 DNA 样品制备成含有 25 mM Mg²⁺ 和 5 mM Tris (pH 7.7) 的溶液，并分别加入 5 pmol 的共用引物 CP，70 $^{\circ}$ C 加热 10min 后自然冷却至室温。取 1~5 μ l 加入到 100 μ l 的序列测定标准混合液中，然后依次加入 dNTP，进行测序反应。

由于反转录引物 P-1 和 P-2 分别用于标记人肝癌细胞和膀胱癌细胞中 P53 基因，因此当加入 dCTP 时所得信号强度代表来源于人肝癌细胞的基因表达量；当加入 dGTP 时所得信号强度代表来源于人膀胱癌细胞的基因表达量。

4. 测定结果

测序结果如图 5 所示，图中所示序列的第一个碱基“C”来自于反转

录引物 P-1, 代表人肝癌细胞的基因表达量 A1; 第二个碱基“G”来自于反转录引物 P-2, 代表人膀胱癌细胞的基因表达量 A2。这两个碱基序列的峰高比代表着 P53 基因在这三种来源中的表达量差异, 两次测定结果 (A1: A2) 分别为: 82.9:17.1, 87.4:12.6, 84.2:15.8, 89.5:10.5, 平均值为: $86:14=6.14:1$, 测定标准偏差为 3.0:3.0。

用 RT-PCR 法测定 P53 基因在肝癌细胞和膀胱癌细胞的表达量分别为 126359 拷贝/ μl 和 22093/ μl , 比值为 5.72:1。

比较两种方法的测定结果, 相对平均偏差小于 2%, 说明本发明的方法测定结果比较准确。

文中标引:

1. Bentley, D. R. 2000. The Human Genome Project--an overview. *Medicinal Research Reviews* 20: 189-96.
2. Zhang, L., W. Zhou, V. E. Velculescu, S. E. Kern, R. H. Hruban, S. R. Hamilton, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1997. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 276: 1268-72.
3. Debouck, C., and P. N. Goodfellow. 1999. DNA microarrays in drug discovery and development. *Nature Genetics* 21: 48-50.
4. Velculescu, V. E., L. Zhang, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-7.
5. Karet, F. E., D. S. Charnock_Jones, M. L. Harrison_Woolrych, G. O_Reilly, A. P. Davenport, and S. K. Smith. 1994. Quantification of mRNA in human tissue using fluorescent nested reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 220: 384-90.
6. Schena, M., D. Shalon, R. W. Davis, and P. O. Brown. 1995.

Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-70.

7. Ronaghi, M., M. Uhlen, and P. Nyren, A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*, 1998. 281(5375): p. 363, 365.
8. 周国华, 古卓良, 章杰兵. 生物发光分析法检测 P53 基因上的突变点. *药学学报*, 2002;37(1):41-45.
9. Guo-Hua Zhou, Masao Kamahori, Kazunori Okano, Kunio Harada, and Hideki Kambara. Miniaturized pyrosequencer for DNA analysis with capillaries to deliver deoxynucleotides. *Electrophoresis*, 2001, 22, 3497-3504.

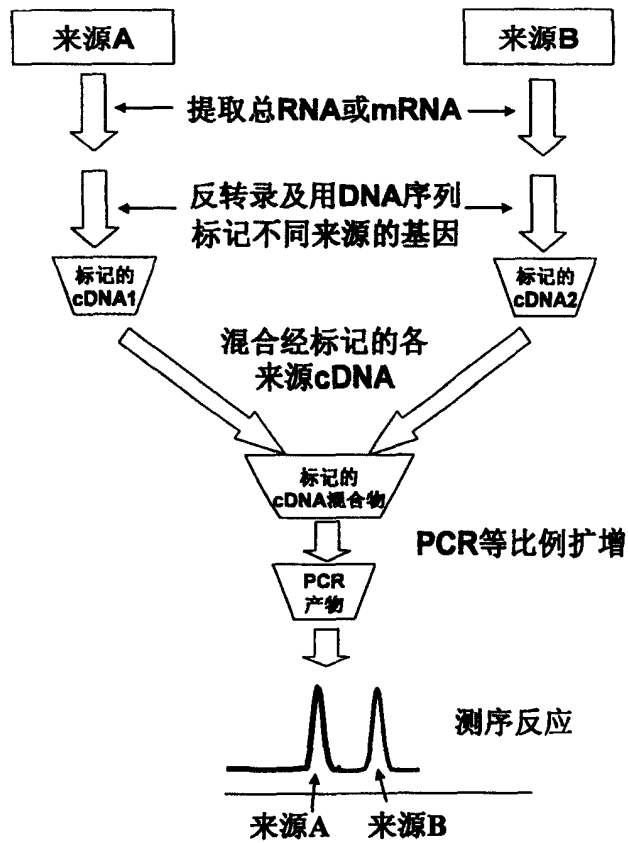


图 1

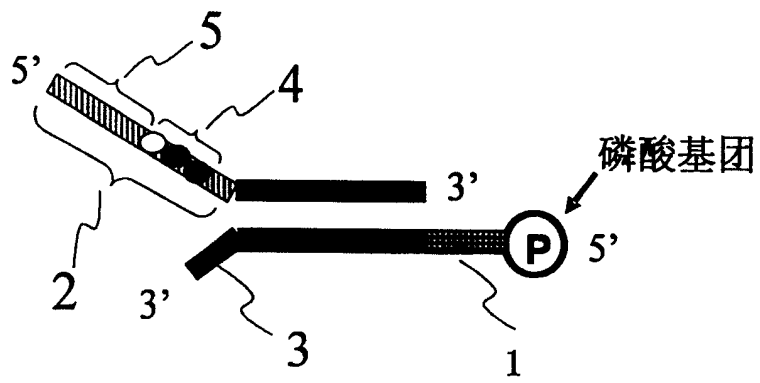


图 2

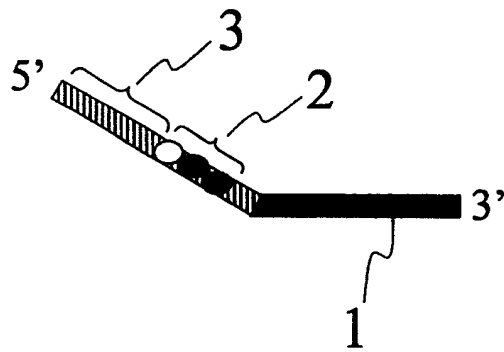


图 3

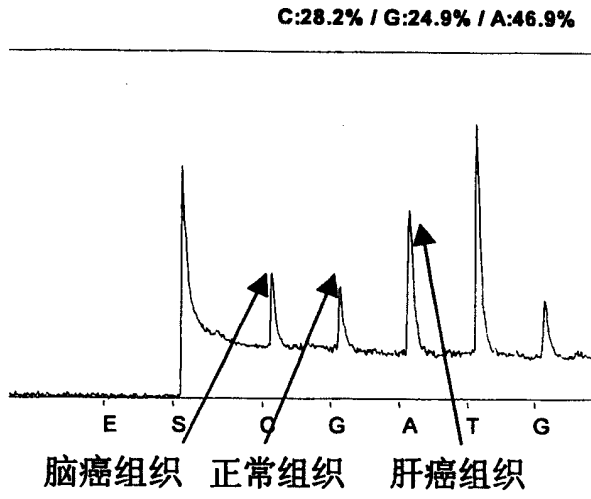


图 4

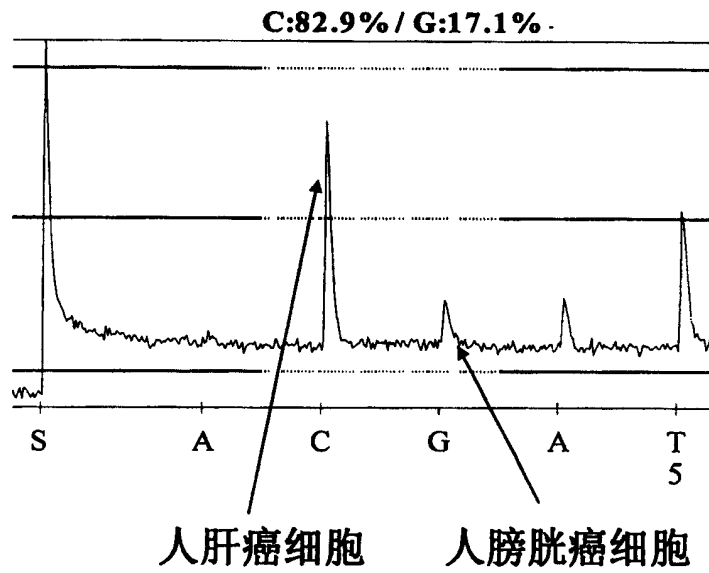


图 5