

# 人谷胱甘肽硫转移酶 M1 基因在 CHO 细胞中的表达

陈萍萍<sup>1</sup>, 张朝武<sup>2</sup>, 谢东<sup>3</sup>, 吴逸明<sup>1</sup>, 韩良峰<sup>4</sup>

(1. 郑州大学医学院公共卫生学院, 河南 郑州 450052; 2. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041; 3. 中国科学院上海生命科学研究院营养科学研究所, 上海 200031; 4. 河南省卫生监督所, 河南 郑州 450003)

**摘要:**目的 构建人谷胱甘肽硫转移酶 M1(GSTM1)的 CHO 细胞表达体系。方法 重组质粒 pcDNA3.1-GSTM1 用 Lipofectamine<sup>TM</sup>2000 转染 CHO 细胞, 用 G418 筛选细胞的阳性克隆, 并用 PCR、RT-PCR 和 Western blot 进行鉴定, 测定 GSTM1 酶活性。结果 GSTM1 基因已转染到 CHO 细胞的基因组, 并转录表达, 生成 GSTM1 蛋白, 经测定活性达到 28mmol/(min·mg prot)。结论 通过 CHO-GSTM1 细胞表达, 为基因工程生产具有完整功能 GSTM1 的进一步纯化提供了材料, 为研究化学致癌物在真核细胞中的代谢, 作为遗传药理学、毒理学的候选细胞株奠定了基础。

**关键词:** GSTM1; 序列测定; CHO 细胞; 细胞转染; 表达

中图分类号: R382.31 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)05-0289-05

## Expression of human glutathione-S-transferase M1 gene in CHO cells

CHEN Ping-ping<sup>1</sup>, ZHANG Chao-wu<sup>2</sup>, XIE Dong<sup>3</sup>, WU Yi-ming<sup>1</sup>, HAN Liang-feng<sup>4</sup>

(1. School of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Huaxi School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 3. Institute for Nutritional Sciences, Chinese Academy of Science, Shanghai, 200031, China; 4. Henan Provincial Institute for Health Inspection, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract:** **Objective** To establish an expression system for the human glutathione-S-transferase M1 (GSTM1) gene in the Chinese Hamster Ovary (CHO) cells. **Method** The CHO cells were transfected with recombinant plasmid vector pcDNA 3.1-GSTM1 by Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000. The expression of secreted CHO-GSTM1 in G418-resistant clones was assayed by polymerase chain reaction (PCR), reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot to measure the activity of GSTM1. CHO-GSTM1 highly-expressed clone was cultured to collect supernatant and activity was assayed by U-2001 ultraviolet spectrophotometer. **Result** CHO-GSTM1 transfected was screened by G418 and assayed by PCR, RT-PCR and Western blot. Results showed that the GSTM1 gene has been transfected into the genome of the CHO cells and transcribed and expressed as protein of GSTM1 with biological activity of 28 mmol/(min·mg protein). **Conclusion** Expression of GSTM1 in CHO cells provided materials for further purification of GSTM1 with complete functions and laid a foundation for candidate strains used in the studies on metabolism of chemical carcinogen in eukaryotic cells, and genetic pharmacology and toxicology.

**Key words:** Glutathione-S-transferase M1 gene; Chinese Hamster Ovary (CHO) cells; Transfection; Expression

谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 是一组具有多种生理功能的蛋白质, 参与机体解毒作用的超级基因家族酶系<sup>[1]</sup>。GSTs 是参与代谢外来化学物质 (包括致癌、致突变剂) 的重要酶系, 在抗诱变和抗肿瘤中具有重要作用。研究发现, 细胞对 7, 8-氧化苯乙烯的敏感性受 GSTM1 浓度的影响, 含有重组 GSTM1 阳性的细胞系, 能有效解毒 7, 8-氧化苯乙烯的毒性<sup>[2]</sup>。通过移民流行病学研究表明, 中国 Hmo<sub>ng</sub> 人同白人相比, 显著地缺乏 GSTM1 和 GSTT1 基因 (分别是 82% vs 54% 和 61% vs 18%)<sup>[3]</sup>。GSTM1

缺失型的哮喘儿童小气道可能对臭氧的有害作用更敏感, 补充抗氧化剂维生素 C 和维生素 E 后, 获得很好的效果<sup>[4]</sup>。GSTP1 多态性和 GSTM1 缺失型与食管癌的发生相关, 而 CYP2A6、CYP2E1、SOD2 和 GSTT1 多态性与食管癌的发生不相关<sup>[5]</sup>。在调整了吸烟和人乳头瘤病毒等因素后发现, GSTM1 纯合缺失型与 GSTM1 阳性个体与宫颈癌的发生呈显著相关, 危险性增加 3.4 倍<sup>[6]</sup>。本研究通过 GSTM1 在 CHO 细胞中的表达, 为其解毒酶的机制研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒来源 本研究所用细胞株和质粒主要特征及来源见表 1。

收稿日期: 2004-03-31; 修回日期: 2004-07-05

基金项目: 河南省自然科学基金资助 (004025600)

作者简介: 陈萍萍 (1964-), 女, 河南郑州人, 博士, 副教授,

研究方向: 营养分子生物学。

表 1 细胞株基本情况

细胞株和质粒名称	特 点	来 源
CHO	成纤维细胞型, 贴壁生长	上海细胞生物学研究所细胞库
pcDNA3.1-GSTM1	Amp <sup>r</sup> , Neo <sup>r</sup> , expression vector of GSTM1	本研究构建
CHO-GSTM1	Neo <sup>+</sup> , cell strain of GSTM1	本研究构建

1.1.2 主要试剂 DMEM 液体培养基、CHO 细胞无血清培养基 (SH30100.02)、胎牛血清均购于 Hyclone 公司, L-谷氨酰胺 (L-glutamine) 购于 Gibco 公司, Lipofectamine™ 2000 购于 Invitrogen 公司, 胰蛋白酶、还原型谷胱甘肽 (GSH)、G418 购于 Sigma 公司, DNA 提取试剂盒购于 Vitagen 公司, AMV Reverse Transcriptase 购于 Promega 公司, RNeasy® Mini Kit、Qiaquick® plasmid extract Kit 购于 Qiagen 公司, Glutathione S-Transferase Mu Ab-1 购于 Neomark 公司, 2, 4-二氯

1-硝基苯 (CDNB) 购于 Fluka 公司, 二氨联苯胺 (DAB) 购于 Roche 公司。

1.2 引物的设计与合成

根据 Genbank 中的 GSTM1 (GI: 183668) 基因 cDNA 序列, 结合克隆质粒 pNEB193 和 pcDNA3.1 上多克隆位点, 在上游加上 Hind III 酶切位点, 下游加上 BamHI 酶切位点, 酶切位点前加 2~3 个保护碱基, 运用 oligo 软件自行设计引物, 由上海 Sangon 合成, 见表 2。

表 2 GSTM1 引物一览表

引物名称	引物长度	引物序列	酶切位点	产物长度
P1	27base	5'TGC AAGCTT ATGCCCATGATACTGGG 3'	Hind III	654bp
P2	27base	5'ACC GGATCC CTA CTCTGTG CCCAGAC 3'	Bam HI	
P3	20base	5'GAATCCGCACCAACCAGCAC 3'		
P4	23base	5'CTCACTCCACCACCTCTGGCC 3'		

1.3 重组质粒 pcDNA3.1-GSTM1 的提取

按照 Qiaquick® plasmid extract Kit 方法进行, 并经 U-2001 紫外分光光度计测定浓度, 调整至 1.0 μg/μl。

1.4 转染筛选

1.4.1 G418 效应的测定 将 CHO 细胞用胰酶消化, 制成细胞悬液, 接种入每孔细胞数为 5×10<sup>5</sup>; 每组作 4 个复孔, 按 500、550、600、650、700、750、800、850、900 mg/ml 梯度浓度向每孔中加入不同量的 G418; 计算在 10 d 内能全部杀死 CHO 细胞的最低浓度为 750 mg/ml。

1.4.2 转染 转染前 24 h 胰酶消化收集细胞, 分至 24 孔板加无血清培养液, CO<sub>2</sub> 温箱培养 24 h; 待细胞生长至 90 % 左右时, 取 48 μl DMEM 培养基, 加 2 μl 重组质粒 pcDNA3.1-GSTM1 混匀; 另取 48 μl DMEM 培养液, 2 μl lipofectamine™ 2000 混匀后, 加入上述液体混匀, 室温放置 20 min, 加入 24 孔板, 混匀, 室温放置 10 min; 加 400 μl 无血清培养液至 37 °C、CO<sub>2</sub> 温箱培养, 同时做 CHO、CHO-pcDNA 3.1 对照。

1.4.3 CHO-GSTM1 阳性细胞株筛选 取转染 36 h 细胞, 胰酶消化, 制成单个细胞悬液, 取少量细胞液, 用台盼蓝染色并计数活细胞, 将细胞悬液连续倍数稀释 (有限稀释法), 配成浓度分别为 10 cell/ml 的

细胞悬液, 将稀释好的细胞悬液分别接种于 96 孔板中, 每孔加 100 μl (G418 750 mg/ml), 置 CO<sub>2</sub> 温箱 37 °C 培养; 标注于细胞接种后 12 h, 在倒置显微镜下观察培养各孔细胞数, 挑选只含一个细胞的孔, 做好标记并补加 100 μl 培养液进行培养, 加入 G418 两周左右, 换至 350 mg/ml 作维持培养, 分离单克隆转种至 24 孔板扩大培养。

1.4.4 CHO-GSTM1 重组细胞 DNA 制备及 PCR 扩增

按照 Vitagen 公司 DNA 提取试剂盒说明书方法进行, 以 DNA 为模板, 外引物 P3、P4 作第一轮 PCR, 以内引物 P1、P2 作第二轮 PCR。PCR 反应条件均为: 94 °C 3min 预变性, 94 °C 1min 变性, 60 °C 1min 退火, 72 °C 1min 延伸, 扩增反应 30 个循环, 72 °C 10min 延伸。扩增产物用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。同时做 CHO、CHO-pcDNA 3.1 对照。

1.4.5 CHO-GSTM1 重组细胞总 RNA 制备及 RT-PCR 扩增

按照 Qiagen 公司 RNeasy® Mini Kit 方法进行。RNA 溶于 20 μl DEPC 处理的 ddH<sub>2</sub>O 中, 用 AMV 以 random primer 作 30 μl 逆转录体系, 42 °C 1 h, 70 °C 10 min 灭活。以 cDNA 为模板, 扩增条件同 1.4.4。同时做 CHO、CHO-pcDNA 3.1 对照。

1.5 CHO-GSTM1 重组细胞的蛋白质的制备及 West-

## em blot 测定

收集 CHO-*GSTM1* 重组细胞培养上清, 经浓缩进行 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳后转 PVDF 膜, 用 1% 脱脂奶粉封闭液 4 °C 封闭过夜后, 与兔抗人 *GSTM1* Ab-1 的多克隆抗体反应 4 h 后, 与第二抗体反应 2 h, 用 DAB 显色后观察目的条带。同时作 CHO、CHO-pcDNA 3.1 对照。

1.6 CHO-*GSTM1* 重组细胞酶活性的测定

1.6.1 蛋白标准曲线制备 取不同体积的 5 mg/ml 蛋白标准液加入显色液 2.5 ml, 加磷酸盐缓冲液至等体积各管充分混匀, 放置 2 min, 之后于 1 h 内测定在 595nm 波长下的吸光度, 计算蛋白质含量, 同时作样品测定, 公式如下:

蛋白质浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) = 由  $A_{595}$  值查标准曲线所得蛋白质浓度 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) / [ 测试样品的用量 (ml)  $\times$  样品稀释倍数 ]

1.6.2 酶促反应 CHO-*GSTM1* 上清 (同时作样品对照管), 于 37 °C 保温 2 min 后, 分别向两管中加入 0.1ml 10 mmol/L CDNB, 对照管同时加入 0.6 ml 质量分数 20% 三氯醋酸, 终止 CDNB-GSH 复合物的生成; 将两管置于 37 °C 温浴 5 min 后, 向样品管中加入 0.6 ml 20% 三氯醋酸, 终止 CDNB-GSH 复合物的生成。同时作 CHO、CHO-pcDNA 3.1 对照。

1.6.3 酶促反应产物的测定 取各管上清液 0.5 ml, 加双蒸水稀释至 5 ml, 每份样品和对照在 37 °C 下, 于 347 nm 波长处, 以空白管调零, 测其吸光度值  $A_s$ 、 $A_n$ , 记录结果并计算每分钟吸光度值的变化量 ( $\Delta A$ )。

1.6.4 *GSTM1* 酶活性测定 公式如下:

$$\Delta OD = \frac{\sum (A_s - A_n)}{5}$$

根据公式 *GSTM1* 活性  $\text{mmol}/(\text{min} \cdot \text{mg prot}) = \Delta A / (8.5 \times \text{蛋白浓度})$ , 计算各样品 *GSTM1* 活性。

## 2 结果

2.1 CHO-*GSTM1* 转染效果评价

人 CHO-pcDNA 3.1、CHO-*GSTM1*, 在含 750  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 的培养液中培养, 约 2 周长出阳性克隆; 而未转染的 CHO 逐渐从瓶壁脱落, 胞质回缩成圆形, 胞浆颗粒增多, 甚至发生裂解, 称死亡状态。CHO-pcDNA 3.1、CHO-*GSTM1* 细胞同转染前 CHO 细胞, 在外观形态上无变化。

2.2 PCR 扩增检测 pcDNA 3.1-*GSTM1* 在 CHO 细胞基因组中的整合

为了解转染细胞外源基因整合的情况, 分别提取连续传代的 CHO-*GSTM1* 和 CHO-pcDNA 3.1 细胞基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳分析表明, 从 CHO-*GSTM1* 基因组中扩增出约 654bp 大小的特异片段, 未能从 CHO-pcDNA 3.1 基因组 DNA 中扩增出此片段, 见图 1。提示 CHO-*GSTM1* 重组细胞株已稳定整合了 *GSTM1* 基因。



1: Gene Ruler 100bp DNA Ladder plus; 2, 3: PCR 产物 (654bp)

图 1 CHO-*GSTM1* PCR 产物 1.7% 琼脂糖凝胶电泳  
2.3 RT-PCR 扩增检测 pcDNA 3.1-*GSTM1* 在 CHO 细胞的转录

为了解外源基因转染 CHO 细胞的转录情况, 分别提取连续传代的 CHO-*GSTM1* 和 CHO-pcDNA 3.1 细胞总 RNA, 进行 RT-PCR 扩增, 扩增产物用 1.7% 琼脂糖凝胶电泳分析表明, 从 CHO-*GSTM1* 的 RT-PCR 中扩增出约 654 bp 大小的特异片段, 未能从 CHO-pcDNA 3.1 基因组 DNA 中扩增出此片段, 见图 2。提示从转录水平证实 CHO-*GSTM1* 重组细胞株表达了 *GSTM1* 基因。



1: 1kb DNA ladder; 2, 3: 不同样本的 RT-PCR 产物 (654bp)

图 2 CHO-*GSTM1* RT-PCR 产物 1.7% 琼脂糖凝胶电泳  
2.4 Western blot 检测 pcDNA 3.1-*GSTM1* 在 CHO 细胞的蛋白表达

将聚丙烯酰胺凝胶电泳后的胶转印 PVDF 膜, 与兔抗人 GSTMu Ab-1 的多克隆抗体反应后, 与第二抗体反应 2 h, DAB 显色后, 分别可见分子质量约 28 000 u 特异性条带, 即 GSTM1 蛋白。提示 *GSTM1* 编码基因在所转染的 CHO 中获得了表达, 见图 3。



1. CHO-pcDNA 3.1; 2. CHO-GSTM1

图 3 CHO-GSTM1 的 Western blot 分析

## 2.5 CHO-GSTM1 重组细胞酶活性的测定

蛋白含量标准曲线的回归方程  $\hat{y}(\mu\text{g}) = 0.1421 + 0.0019x$  (吸光度  $A$ ), 相关系数  $r = 0.983$ , 经假设检验,  $P < 0.01$ 。GSTM1 活性为 28 mmol/(min·mg prot)。

## 3 讨论

据报道, *GSTM1* 纯合缺失型是土耳其人发生肺癌的一个独立危险因素<sup>[7]</sup>。每年吸烟大于 20 包的男性与非吸烟者相比, 患直肠癌的危险性增加, 并受 *GSTM1* 基因型的影响<sup>[8]</sup>。单独或联合具有 *GSTM1* 和 *CYP1A1* 多态性的智利人和日本人对前列腺癌均很敏感<sup>[9,10]</sup>。病例-对照研究发现, *CYP2E1*rsal 同源性变异与肺腺癌的危险性降低有关, 具有 *GSTM1* 纯合缺失型和 *CYP2E1*rsal 野生型的人增加了患肺腺癌易感性<sup>[11,12]</sup>。*GSTM1* 纯合缺失型和 *GSTP1* I/I 基因型增加了汽车尾气引起的过敏反应<sup>[13]</sup>。*GSTM1* 纯合缺失型是重度吸烟者患肺癌的中度危险因子, *GSTT1* 则无作用, 而 *GSTP1* 需要进一步研究<sup>[14]</sup>。联合 *CYP1A1* IIe (246) Val 同源性变异和 *GSTM1* 纯合缺失型可能是非吸烟者患肺癌的重要作用<sup>[15]</sup>。韩国 *GSTM1* 纯合缺失型胃腺癌病人与预后不良有关<sup>[16]</sup>。

与原核表达系统相比, 哺乳动物表达系统具有明显的优点。CHO 细胞是目前公认的一种哺乳动物较理想的表达系统, 具有准确的转录后修饰功能, 表达的蛋白质在分子结构、理化特性和生物学功能方面最接近于天然蛋白分子; 具有产物胞外分泌功能, 便于下游产物分离纯化; 具有重组基因的高效扩增和表达能力; 具有贴壁生长特性, 且有较高的耐受剪切力和渗透压能力, 可以进行悬浮培养, 表达水平较高; CHO 细胞属于成纤维细胞, 很少分泌自身的内源蛋

白, 利于外源蛋白的后分离。但 CHO 细胞培养成本高, 条件难以掌握, 易污染, 在一定程度上影响了它的广泛应用。

*GSTM1* 基因已转染 V79、人宫颈癌上皮细胞和人卵巢癌细胞株 A2780<sup>[17~19]</sup>, 但尚未见到 *GSTM1* 转染 CHO 的报道。结果提示 CHO 细胞和 pcDNA 3.1 载体是一对良好的重组蛋白表达系统, pcDNA 3.1-*GSTM1* 成功转染 CHO 细胞, CHO-*GSTM1* 重组细胞株的构建, 为研究毒物代谢的机制, 特别是模拟多环芳烃类环境污染物的代谢, 具有重要的应用价值, 可能成为基因预防和治疗的首选细胞株。

## 参考文献:

- [1] Ambrosone CB, Freudenheim JL, Graham S, et al. P4501A1 and glutathione-S-transferase M1 genetic polymorphism and postmenopausal breast cancer risk [J]. *Cancer Res*, 1995, 55 (16): 348
- [2] Shield AJ, Sanderson BJ A. recombinant model for assessing the role of GSTM1 in styrene-7, 8-oxide toxicity and mutagenicity [J]. *Toxicology*, 2004, 25, 195 (1): 61-68.
- [3] Kuffneyer WR, Langer E, Davies SM, et al. Genetic polymorphisms in the Hmong population; implications for cancer etiology and survival [J]. *Cancer*, 2004, 15, 100 (2): 411-417.
- [4] Romieu I, Sierra-Monge JJ, Ramirez-Aguilar M, et al. Genetic polymorphism of GSTM1 and antioxidant supplementation influence lung function in relation to ozone exposure in asthmatic children in Mexico City [J]. *Thorax*, 2004, 59 (1): 8-10.
- [5] Ribeiro Pinto LF, Teixeira Rossini AM, Albano RM, et al. Mechanisms of esophageal cancer development in Brazilians [J]. *Mutat Res*, 2003, 544 (2-3): 365-373.
- [6] Au WW, Sierra-Torres CH, Tyring SK. Acquired and genetic susceptibility to cervical cancer [J]. *Mutat Res*, 2003, 544 (2-3): 361-364
- [7] Pinarbasi H, Silig Y, Cetinkaya O, et al. Strong association between the GSTM1-null genotype and lung cancer in a Turkish population [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2003, 15, 146 (2): 125-129.
- [8] Slattery ML, Edwards S, Curtin K, et al. Associations between smoking, passive smoking, GSTM-1, NAT2, and rectal cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003, 12 (9): 882-889.
- [9] Acevedo C, Opazo JL, Huidobro C, et al. Positive correlation between single or combined genotypes of CYP1A1 and GSTM1 in relation to prostate cancer in Chilean people [J]. *Prostate*, 2003, 57 (2): 111-117.
- [10] Nakazato H, Suzuki K, Matsui H, et al. Association of genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) with familial prostate cancer risk in a Japanese population [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23 (3C): 2897-2902.
- [11] Wang J, Deng Y, Li L, Kuriki K, et al. Association of GSTM1, CYP1A1 and CYP2E1 genetic polymorphisms with susceptibility to lung adenocarcinoma; a case-control study in Chinese population [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94 (5): 448-452.

(下转第 296 页)

时, 由于目的片段酶切后相邻片段大小相差较少, 为达到较好的检测效果, 一方面可以增加常用的琼脂糖凝胶的浓度 (3.0% ~ 3.5%) 和电泳时间, 另一方面也可以选择高分辨率的凝胶 (如聚丙烯酰胺) 进行电泳。

本次研究结果表明, CRS-RFLP 是检测基因 SNP 的一种简便易行的有效方法, 国外最早曾应用该方法进行 Kirsten 鼠癌基因的突变检测<sup>[1]</sup>, 以后又用于苯丙酮尿症及地中海贫血等疾病的基因突变检测。该方法大大拓宽了 RFLP 的适用范围, 在实际应用中具有很大的灵活性, 同时又很好地保持了 RFLP 方法的一些优点, 具有较好的应用前景, 特别适合于基层单位开展已知位点 SNP 的检测。应用高通量检测技术对已知位点的 SNP 进行检测时, 如果样本量过少 (检测成本将增加), 也可以考虑应用该方法。随着人们对疾病认识的不断深入, 对发病群体和易感人群进行基因多态性的检测也日益广泛。在公共卫生领域, 通过检测相关基因如毒物代谢酶基因、DNA 损伤修复基因以及细胞周期调控基因、免疫因子基因等的多态性, 一方面可以深入研究有关环境暴露因素所致疾病的具体发病机制, 另一方面也可筛检易感人群来开展有效的健康监护工作。而对其他一些与遗传关系密切的疾病, 如果能明确基因突变的具体情况, 则也可应用该方法进行疾病的检测及辅助诊断工作。在开展这些工作的基层单位, 一些高通量的现代检测技术由于仪器以及检测成本昂贵, 需要相应的技术平台支持等原因还较少推广应用, 此时, 仅需要 PCR 扩增仪、电泳仪和成像仪等设备就可开展工作的 RFLP 技术仍然具有较强的实际应用意义, 利用 CRS-RFLP 技术进

行已知位点 SNP 检测方法的应用, 无疑将对基层的疾病预防控制工作产生良好的促进作用。

参考文献:

[1] 张志彬, 夏昭林. 基因多态性与化学物致病风险 [J]. 卫生研究, 2003, 32 (4): 402-405.  
 [2] 杨卫华, 李稻. 扩增基础上的已知点突变的检测 [J]. 国外医学分子生物学分册, 2002, 24 (2): 121-125.  
 [3] 赵春江, 李宁, 邓雪梅. 应用创造酶切位点法检测单碱基突变 [J]. 遗传, 2003, 25 (3): 327-329.  
 [4] Liu W, Smith DI, Reetzige KJ, et al. Denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) used in the detection of germline and somatic mutations [J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26 (6): 1396-1400.  
 [5] Howell WM, Jobs M, Gyllenstein U, et al. Dynamic allele-specific hybridization. A new method for scoring single nucleotide polymorphisms [J]. Nat Biotechnol, 1999, 17 (1): 87-88.  
 [6] Livak KJ. Allelic discrimination using fluorogenic probes and the 5' nuclease assay [J]. Genet Anal, 1999, 14 (5-6): 143-149.  
 [7] Nassal M, Rieger A. PCR-based site-directed mutagenesis using primers with mismatched 3'-ends [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (10): 3077-3078.  
 [8] Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, et al. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18 (4): 999-1005.  
 [9] Lien S, Alestrom P, Klungland H, et al. Detection of multiple beta-casein (CASB) alleles by amplification created restriction sites (ACRS) [J]. Anim Genet, 1992, 23 (4): 333-338.  
 [10] Matullo G, Palli D, Peluso M, et al. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects [J]. Carcinogenesis, 2001, 22 (9): 1437-1445.  
 [11] Haliassos A, Chomel JC, Tesson L, et al. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17 (9): 3606.

(上接第 292 页)

[12] Sweeney G, Nazar-Stewart V, Stapleton PL, et al. Glutathione S-transferase M1, T1, and P1 polymorphisms and survival among lung cancer patients [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2003, 12 (6): 527-533.  
 [13] Gilliland FD, Li YF, Saxon A, Diaz-Sanchez D. Effect of glutathione-S-transferase M1 and P1 genotypes on xenobiotic enhancement of allergic responses: randomised, placebo-controlled crossover study [J]. Lancet, 2004, 10, 363(9403): 119-125.  
 [14] Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Stapleton P, et al. A population-based study of glutathione S-transferase M1, T1 and P1 genotypes and risk for lung cancer [J]. Lung Cancer, 2003, 40(3): 247-258.  
 [15] Hung RJ, Boffetta P, Brockmoller J, et al. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a

pooled analysis [J]. Carcinogenesis, 2003, 24(5): 875-882.  
 [16] Choi SC, Yun KJ, Kim TH, et al. Prognostic potential of glutathione S-transferase M1 and T1 null genotypes for gastric cancer progression [J]. Cancer Lett, 2003, 10, 195(2): 169-175.  
 [17] Chen C, Nirunskun W. Decreased expression of glutathione S-transferase M1 in HPV16-transfected human cervical keratinocytes in culture [J]. Carcinogenesis, 1999, 20(4): 699-703.  
 [18] Sundberg K, Dreij K, Seidel A, et al. Glutathione conjugation and DNA adduct formation of dibenz[*a,h*]pyrene and benz[*a*]pyrene diol epoxides in V79 cells stably expressing different human glutathione transferases [J]. Chem Res Toxicol, 2002, 15(2): 170-179.  
 [19] Geroni C, Marchini S, Cozzi P, et al. Brostallicin, a novel anticancer agent whose activity is enhanced upon binding to glutathione [J]. Cancer Res, 2002, 15, 62(8): 2332-2336.