

专论与综述

人类基因定位的进展及在肿瘤研究中的应用

徐宁志 邓国仁

(北京市肿瘤防治研究所)

提 要

八十年代以来,由于分子生物学技术和方法的不断发展和应用,使得人类基因定位的数目急剧增加。据 HGM9 报道,已经定位的人类基因,加上克隆的 DNA 片段、标记和脆性部位等,总数已超过 2000 个。细胞遗传学和分子生物学相互交融,基因定位在肿瘤研究中的应用,使得人们对一些特异的染色体易位或缺失与某些恶性肿瘤的关系有了深入的了解。

一、导 言

人类基因组 DNA 约有 3×10^9 碱基对(bp),一般认为约有 50,000—100,000 个结构基因。人们一直希冀将人类基因组的每个结构基因都一定位到染色体的某一特定位置点。但工程浩大,任务艰巨。1973 年,在美国 New Haven 召开第一次国际人类基因定位工作会议(The Human Gene Map, HGM1),当时定位的人类基因不到 300 个,其中常染色体基因,包括肯定的、暂定的和不肯定的仅 64 个;X 染色体基因,肯定的 88 个和不肯定的 67 个。八十年代以来,分子生物学技术和方法的日益发展和应用,使得人类基因定位的数目急剧增加。1987 年 9 月在巴黎召开了 HGM9。已经定位的常染色体基因有 826 个,X 染色体基因达 301 个,加上克隆的 DNA 片段、标记及脆性部位等,总数已超过 2000。人类基因定位的研究对于了解基因及不同类型的 DNA 顺序在染色体上的分布,绘制人类基因组的细胞遗传学图谱,进而了解人类的进化过程等方面都具

有重要意义。本文仅就近几年人类基因定位在肿瘤研究中的应用作一扼要叙述。

二、人癌基因的染色体定位

HGM9 正式以癌基因(oncogene)命名定位的位点达 54 个(表 1)。虽不以癌基因命名,但与肿瘤密切相关的基因位点见表 2。尽管近三年来肿瘤分子生物学的重点在于研究各类癌基因的结构和功能;癌基因在细胞生长与分化过程中的作用,并不再局限于去发现新的癌基因。但还是不断有新的癌基因被发现、克隆和定位。笔者根据 1987 年 7 月美国第三届癌基因年会(Third Annual Meeting on Oncogenes)的资料进行不完全统计,近几年新发现的癌基因(定位或尚未定位)有 23 个(表 3)。已有报道的人癌基因可达 92 个之多。

三、染色体易位与肿瘤

人类许多恶性肿瘤存在非随机性的染色体畸变,使人们注意到染色体结构异常可能与恶性肿瘤有着内在的联系。1981 年,Carins^[1],

表 1 HGM9 定位的人癌基因

癌基因	位 点	癌基因	位 点	癌基因	位 点
fgr	1p36.2—p36.1	yes-2	chr. 6	akt-1	14q32.3
Blym-1	1p32	erb-B-1	7p14—p12	tcl-1	14q32.3
L-myc	1p32	A-raf-2	7p11.4—q21	fes	15q25—q26
N-ras-1	1p22	pks-1	7p11—q11.2	erb-A-1	17q11.2
ski	1q22—q24	met	7q22.3—q23.1	erb-B-2	17q21
arg	1q24—q25	mos	8q22	neu	17q21—q22
trk	1q31—q41	myc	8q24	erb-A-2	17q21.3
N-myc	2p24	abl	9q34.1	bcl-2	18q21.3
rel	2p13—cen	tcl-3	10q24	yes-1	18q21.3
raf-1	3p25	tcl-2	11p15	erv-1	18q22—q23
raf-2	4pter—p15	H-ras-1	11p15.5	mel	19p13.2—q13.2
kit	chr.4	int-2	11q13	src	20q12—q13
fms	5q33.2—q33.3	bcl-1	11q13.3	ets-2	21q22.1—q22.3
pim-1	6pter—q12	ets-1	11q23.3	bcr-1	22q11.21
K-ras-1	6p12—p11	int-1	12pter—q14	sis	22q12.3—q13.1
mcf-3	6q16—q22	K-ras-2	12p12.1	A-raf-1	Xp13—p11
myb	6q22	gli	12q13—q14.3	pks-2	Xp11.4
syn	chr.6	fos	14q21—q31	mcf-2	Xq27

注: 1. H-ras-2 已定位在 Xq26—q28^[3], 但 HGM9 缺。2. mcf-1 尚未定位。

表 2 HGM9 定位 的与人类肿瘤相关的基因

名称	位 点	来 源
NB	1pter—p31	Neuroblastoma
SCCL	3p23—p14	Small-cell cancer of lung
RCC	3p14.2	Renal cell carcinoma
LALL	9p22—p21	Lymphomatous acute lympho- blastic leukemia
WAGR	11p13	Wilms tumor
ANC	11q22—qter	Anal canal carcinoma
LIPO	12q13—q14	Lipoma
RB-1	13q14.1	Retinoblastoma-1
OSRC	13q14.1	Osteosarcoma
CBT-1	13q34	Carotid body tumor
TP53	17p13.105— p12	Tumor protein p53
ES	22q12	Ewing sarcoma
ACN	chr.22	Acoustic neuroma
MGM	chr.22	Meningioma
SSRC	Xp11.2	Sarcoma

注: 总计 15 个。

表 3 新发现的癌基因(定位或未定位)

癌基因	位 点	来源或相关的癌基因
ral	7p15—p22	Simian B-cell line, c-ras related gene
rab-1, 2, 3, 4	未定	rat brain library, c-ras related gene
frit	chr.13	fms-related tyrosine kinase gene
cea-1	chr.17	c-erb-A related gene
cea-7	chr.17	
cea-2	chr.19	
cea-3	未定	
erg	chr.21	c-ets related gene
B-raf	未定	c-raf related gene
dbl	未定	diffuse B-cell lymphoma
hst	未定	human stomach cancer gene
ST-1	未定	human stomach cancer gene
oncF	未定	human esophageal cancer gene
jun	未定	Avian sarcoma virus 17
R-myc	未定	Rhabdomyosarcoma cell line
ztk	未定	novel gene of tyrosine kinase
lck	未定	Lstra cell line, tyrosine kinase gene
tkl	未定	tyrosine kinase gene related to lck
ret	未定	tyrosine kinase gene
sic	未定	tyrosine kinase gene related to ret

注: 总计 23 个。

Klein^[2]等相继提出人类大多数恶性肿瘤是由于遗传转座即染色体重排引起的假说。但只有在分子生物学和细胞遗传学相互交融及癌基因在人类染色体上定位的基础上,人们才有可能深入了解染色体畸变在癌变过程中的意义,并在分子水平阐明染色体的某些改变(如易位)与癌基因激活的关系。在这方面,最引人注目并已经取得重大进展的是:①慢性粒细胞白血病(CML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)中 Ph¹染色体与 c-abl;②Burkitt's 淋巴瘤与 c-myc;③B细胞(T细胞)白血病、淋巴瘤与 c-bcl₂、c-tcl 等。②、③已有专文^[3],故不赘述。

1960年,Nowell等发现CML病人有一特别短小的22号染色体,这就是著名的费城染色体(Ph¹)。它的发现使得人们第一次把一个特异的染色体畸变与某一特定的肿瘤联系起来。1973年,Rowley等证明Ph¹是由于9号与22号染色体相互易位而形成的。基因定位的结果表明,在涉及或邻近这一相互易位的染色体区域内,存在人细胞癌基因:与病毒癌基因v-abl同源的c-abl基因位于9q34;与v-sis同源的c-sis位于22q12.3~q13.1。CML Ph¹阳性病人,c-abl从9q34易位至22q11,c-sis从22q12.3~q13.1易位至9q^[4]。进一步的研究表明,c-sis基因虽与Ph¹的形成有关,但与CML病变似无联系。CML Ph¹阳性病人,9q34断裂点位于c-abl基因5'端上游区14—100kb内^[5],22q11发生断裂的区域较为恒定,约为5.8kb,称作断裂点密集区(breakpoint cluster region, bcr)^[6]。后来发现,bcr是一个具有表达活性的结构基因。它至少有13个外显子,分布于大约45kb的范围内。在5.8kb断裂点密集区内,有4个外显子(b1—b4)。CML Ph¹阳性的断裂点几乎都在b2—b3或b3—b4式间的内含子内^[5]。正常c-abl基因转录的mRNA为6kb和7kb,正常bcr基因转录的mRNA分别为4.5kb和6.7kb^[7]。CML Ph¹阳性病人由于其c-abl易位至bcr 3'端,形成c-abl与bcr基因头尾相接,能转录一个新的融合的8.5kb左右的mRNA。5'端约3.2kb由

bcr基因一部分外显子转录而成,3'端约5.3kb是c-abl基因缺失了氨基端第一外显子后转录的^[7]。bcr-abl融合后编码一分子量为210000(Mr, 210k)的蛋白质——p210^{bcr-abl}。正常c-abl的蛋白质为p145^{c-abl}(正常bcr的蛋白质产物及功能尚未确定)。病毒v-abl的蛋白质为p160^{gag-abl}。这三种蛋白质都有酪氨酸蛋白激酶活性。但是,p210^{bcr-abl}和p160^{gag-abl}具有自身磷酸化作用,而且酪氨酸蛋白激酶活性远远高于p145^{c-abl}^[8]。所以,有学者认为这一新的融合蛋白p210^{bcr-abl}很可能与CML的发生、发展有关系^[7]。但是,实际情况要复杂得多。虽有报道,CML Ph¹阳性病人急性变(blast crisis)细胞的8.5kb mRNA转录水平要比非急变细胞和非白血病细胞高出8倍;p210^{bcr-abl}只有在Ph¹阳性急变细胞(与发生急变细胞的种类无关)中才有酪氨酸蛋白激酶活性,而在Ph¹阴性急变细胞、急性粒细胞白血病细胞以及前粒细胞白血病细胞株HL-60中均未能检出酪氨酸蛋白激酶活性^[9]。但是,p210^{bcr-abl}单独不能使NIH 3T3细胞恶性转化;而p160^{gag-abl}可使其恶性转化。并且,如果p210^{bcr-abl}氨基端加上v-abl中gag基因编码的氨基酸,则可使NIH 3T3细胞恶性转化^[10]。利用逆病毒转染系统,使得p210^{bcr-abl}在鼠骨髓细胞中表达后,可以刺激细胞生长并形成集落,但是不足以使得细胞完全恶性转化^[11]。亦有报道,虽然CML Ph¹阳性病人急变细胞中bcr-abl融合mRNA比同一病人终末分化的粒细胞要高出8—16倍;但在DNA水平,这两种细胞bcr-abl基因扩增(gene amplification)的程度却是相同的。Shtivelman等^[12]最近的研究表明,bcr-abl融合的mRNA转录水平在不同CML Ph¹阳性病人之间差别甚大,但与是否急变无关。而且令人惊讶的是在所检查的21位CML Ph¹阳性病人中,有8个病人同时具有b2—b3和b3—b4间断裂,即在体内能产生两种不同的mRNA(有或者无b3外显子)。2/21的断裂点既不在b2—b3间亦不在b3—b4之间。b3外显子仅编码25

个氨基酸^[43],所以有人认为有或无 b3 外显子,可能并不影响 p210^{bcr-abl} 分子量的大小^[43]。

CML 中,大约 90—95% Ph⁺ 阳性。Ph⁺ 阳性的临床治疗和预后与 Ph⁺ 阳性完全不同。但是,在相当一部分 Ph⁺ 阴性病人中,尽管没有可见的细胞遗传学改变,但却有 bcr 基因的重排或 bcr-abl 基因的融合^[44]。这种融合虽然没有 bcr 基因 3' 端易位至 9 号染色体,但 22 号染色体断裂点亦在 bcr 区域内, c-abl 基因插入在 bcr 5' 与 3' 之间,形成与 Ph⁺ 阳性相类似的 bcr-abl 基因融合^[44]。不过, Ph⁺ 阴性虽有 bcr 基因重排时,却可以没有转录与 c-abl 融合的 8.5kb mRNA 活性。所以, Ph⁺ 阴性在分子水平与 Ph⁺ 阳性的区别仍有待进一步的研究。

ALL 是和 CML 完全不同的一类白血病。但约有 25—30% 成人 ALL 和 2—10% 儿童 ALL 同样表现为 Ph⁺ 阳性。对这部分病人的 Ph⁺ 染色体的断裂位点以及重接位点的研究,无疑将有助于人们进一步从分子水平认识癌基因活化与白血病的内在联系。1987 年初,三个不同的实验室几乎同时发现^[45], ALL Ph⁺ 阳性时, 22 号染色体的断裂点大部分不在 5.8kb 的 bcr 区域,而是在 bcr 的 5' 端上游区。由此转录的 mRNA 为 7.0—7.4kb, 蛋白质为 190k, p190^{c-abl}。但 p190^{c-abl} 和 p210^{bcr-abl} 具有相似的酪蛋白激酶活性^[45]。最近的研究结果表明, bcr 是一个至少有 18 个外显子的结构基因,分布在大约 90kb 的区域内 5.8kb 内的 b1~b4 其实位于 bcr 基因的中部。ALL Ph⁺ 阳性的大部分断裂点位于 bcr 基因 5' 端的第一和第二外显子之间的内含子内^[46]。这一发现具有一定的临床意义。因为 CML 阳性病人约有 30% 会发生淋巴细胞急性变,这部分病人和真正的 ALL Ph⁺ 阳性病人在临床上用现有的一些诊断指标极难鉴别。而现在根据 22 号染色体断裂发生的位点就能大致区分了。但也有例外,如 ALL Ph⁺ 阴性也可发生 bcr 5' 端第一和第二外显子之间的断裂^[46]; ALL Ph⁺ 阳性但表达 p210^{bcr-abl} 而不是 p190^{c-abl} 蛋白质^[46]; CML Ph⁺ 阳性但断裂点既不在 b2—b3 间也不

在 b3—b4 之间^[42]。

bcr-abl 基因融合的研究虽取得重大进展,但融合的意义以及与 CML、ALL 的关系仍有待深入研究。现已证实,正常 bcr 基因在人体许多不同类型的细胞中均有表达。bcr 在进化上是一个相对保守的基因,在鸡的不同组织中亦有表达。鸡脑表达最高,鸡肝最低。而且,在 CML Ph⁺ 阳性细胞中,亦可检出正常 bcr 基因的转录产物。在一个 CML Ph⁺ 阳性病人的不同细胞中, bcr-abl 及正常 bcr 转录水平可以不同,但正常 bcr/bcr-abl 转录之相对比值却是一致的。这些结果提示,在 CML 的不同细胞中, bcr-abl 融合基因和正常 bcr 基因的转录表达受相类似的细胞机制所调控^[47]。

四 染色体缺失与肿瘤

染色体特异位点的缺失与某些肿瘤的联系开拓了人们研究肿瘤的另一个崭新领域。即刚刚兴起的抗癌基因 (anti-oncogene)、或叫肿瘤抑制基因 (tumour suppressor gene)、隐性致癌基因 (recessive gene) 的研究。视网膜母细胞瘤 (retinoblastoma, Rb) 由于其特殊的临床特征备受人们青睐。它不仅能用来研究肿瘤与遗传的关系,而且成为研究抗癌基因的典型生物学模型。Rb 是好发于儿童的一种眼科恶性肿瘤。分遗传性和散发性两大类,遗传方式为染色体显性遗传。1971 年, Knudson 以 Rb 为研究模型,提出了著名的两次突变假说。假说认为,不论是遗传型或散发型 Rb,都是由于同源染色体的某一特定位置发生两次突变后形成的。遗传型 Rb 则因为子代可携带亲代的一次突变,发病风险比普通人群高出 100000 倍^[48]。细胞遗传学的研究不仅证实 Rb 基因位于 13q14,而且表明,正是这一位点的缺失与 Rb 发病密切相关^[49]。进入八十年代,人们运用限制性内切酶长度多态性 (restriction fragment length polymorphisms, RFLPs) 的方法结合细胞遗传学方法,从 DNA 水平证实了 13q14 部分 DNA 片段的缺失,使得 Rb 基因位点成为纯合子 (homozygosity) 或半合子 (hemi-

zygosity), 从而诱发 Rb^[18,19]。用 RFLPs 的分析, 还能在 Rb 家族成员中, 于发病之前成功地检测出 Rb 位点缺失的携带者^[20]。

1986 年, 美国两个实验室分别克隆、分离得到 Rb-1 基因^[21]。Rb-1 基因至少有 12 个外显子, 分布于 13q14 位点约 100kb 的范围内。转录的 mRNA 约 4.7kb 左右。约 30% 的 Rb 和成骨肉瘤(继发于 Rb 最常见的恶性肿瘤)病人有 Rb 基因不同程度的缺失^[21]。即使是 DNA 水平未能检出缺失, mRNA 转录水平亦可有质或量的改变^[21]。Lee 等^[22]最近报道, Rb 基因编码一分子量为 110k, p110^{Rb} 的蛋白质。在有 Rb mRNA 表达的细胞系中, 都可检出 p110^{Rb}。而在 5 个 Rb 细胞系中, 无一表达 p110^{Rb}。p110^{Rb} 可以磷酸化, 并且绝大部分在细胞核内, 这提示它是一种与 DNA 结合的蛋白质, 具有调节其他基因活性的功能。今后重要的任务是确定 p110^{Rb} 结合的靶基因(target gene)以及调节 p110^{Rb} 活性的其他因子^[22]。

美国洛杉矶儿童医院的 Dr. YK, Fung 1987 年 12 月来华讲学时指出, Rb 基因不仅在 Rb 和成骨肉瘤中有不同程度的缺失, 而且在人类乳癌和纤维肉瘤中亦可见部分缺失。在乳癌中, 还可出现 Rb 基因扩增。无疑, 这为我们研究 Rb 基因与其他恶性肿瘤的关系提供了新的线索。

应用经典的细胞遗传学方法研究抗癌基因也十分活跃。HeLa 细胞与人类正常纤维母细胞杂交, 融合细胞为非恶性表型。但如果这种融合细胞丢失正常细胞的 11 号染色体, 则又成为恶性细胞^[23]。继之, 如果直接将人类 11 号染色体导入 HeLa 细胞, 也能抑制其恶性表型, 说明人类 11 号染色体上存在抑癌基因^[23]。将人类上皮来源的角质细胞与 HeLa 细胞杂交, 同样可表现为非恶性细胞。如果融合细胞回复恶性则是由于丢失 1 号或 4 号染色体, 这似乎说明, 不同胚胎来源的细胞表达不同染色体位点的抑癌基因^[23]。除此之外, 人类正常纤维母细胞还能抑制黑色素瘤、淋巴瘤以及 Ha-ras 基因转化的 NIH 3T3 等细胞的恶性表型。

肾 Wilm's 瘤是另一种与染色体特异位点缺失密切相关的恶性肿瘤。缺失位点为 11p13。如果将人类正常 11 号染色体导入 Wilm's 瘤细胞内, 虽然该细胞表型与瘤细胞并无区别, 但是完全失去致癌性^[24]。而且, 设法去除导入的 11 号染色体, 细胞又恢复致癌性。如果导入的是人类正常 13 号染色体或者 X 染色体则不能使瘤细胞失去致癌性。这结果说明, Wilm's 瘤的抑癌基因位于 11 号染色体且具有一定的特异性, 即 Rb 基因或 X 染色体上其他基因不能抑制 Wilm's 瘤细胞的致癌性。还有, 抑癌基因作用于 Wilm's 瘤形成的最后阶段, 仅仅抑制瘤细胞的致癌性^[24]。更有趣的是, Wilm's 瘤细胞和 HeLa 细胞杂交, 融合细胞居然也可表现为非恶性, 这似乎说明, 11 号染色体有不同的抑癌基因。抑癌基因可能作用于肿瘤形成的较后阶段还可得到其他实验的支持。如以 v-Ha-ras 和 v-myc 共同转染叙利亚地鼠胚胎细胞(SHE)后, 将恶性 SHE 和正常 SHE 杂交、融合细胞呈现非恶性表型, 但 p21^{ras} 蛋白表达程度与恶性 SHE 一样, 并不降低^[23]。

其他一些肿瘤与特定染色体位点缺失明显相关亦有不少报道。如乳腺导管癌与 13 号染色体某些位点缺失并纯合化相关。小细胞肺癌(SCLC)可见 3p14-p21 缺失。在 9 个 SCLC 病人瘤组织和各自的正常组织中, 应用位于 3p 的多种探针发现, 瘤组织都可见 3p14-p21 间不同位点的缺失, 而正常组织没有缺失^[25]。至少 20% 的结肠癌有位于 5q21-q22 的 FAP(familial adenomatous polyposis, FAP, 家族性多发性腺瘤样息肉症)基因的缺失和纯合化^[26]。双侧性听神经纤维瘤与 22q11-q13.1 的部分缺失相关。应用体细胞有丝重组基因定位法(somatic mitotic recombination mapping)发现, 横纹肌肉瘤有 11p15.5-pter 的染色体缺失^[27]。从一例恶性 T 细胞淋巴瘤衍生的三个细胞系都可见位于 11q23-q24 的 Hu-ets-1 基因的缺失^[28]。这与发现涉及 ets-1 基因的急性白血病病人和细胞株中, ets-1 基因转录活性明显降低的结果^[3]极为吻合。应用 61 个常

染色体、7个X染色体的DNA标记,分析从一个黑色素瘤衍生的6个细胞系后发现,某些染色体位点从杂合子变为纯合子与肿瘤演进(tumour progression)和转移有关^[29]。40个脑膜瘤病人中,17个病人的瘤组织在22号染色体长臂的某些基因位点有缺失,而他们的正常组织未见缺失。并且,缺失与脑膜瘤的恶性程度有明显相关性^[30]。

诚然,不能夸大细胞遗传学方法所能发现的染色体缺失对指明基因位置所起的作用。但是,它们确实能帮助人们确定基因的位置,而且有助于富集特异的基因组片段,同时可用来在染色体某些区域中挑选探针。若结合分子生物学方法,必将能更深入、更广泛地研究染色体缺失与恶性肿瘤的关系。

参 考 文 献

- [1] Cairns, J.: *Nature*, 1981, 289, 353.
- [2] Klein, G.: *Nature*, 1981, 294, 313.
- [3] 徐宁志,邓国仁:《国外医学分子生物学分册》,1987,9, 261。
- [4] Groffen, J. et al.: *J. exp. Med.*, 1983, 158, 9.
- [5] Heisterkamp, N. et al.: *Nature*, 1985, 315, 758.

- [6] Groffen, J. et al.: *Cell*, 1984, 36, 93.
- [7] Shtivelman, E. et al.: *Nature*, 1985, 315, 550.
- [8] Konopka, J. B. et al.: *Mol. Cell Biol.*, 1985, 5, 3116.
- [9] Maxwell, S. A. et al.: *Cancer Res.*, 1987, 47, 1731.
- [10] Daley, G. Q. et al.: *Science*, 1987, 237, 532.
- [11] McLaughlin, J. et al.: *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 6558.
- [12] Shtivelman, E. et al.: *Blood*, 1987, 69, 971.
- [13] Kurzrock, R. et al.: *Blood*, 1987, 70, 233.
- [14] Morris, C. M. et al.: *Nature*, 1986, 320, 281.
- [15] Kurzrock, R. et al.: *Nature*, 1987, 325, 631.
- [16] Hermans, A. et al.: *Cell*, 1987, 51, 33.
- [17] Collins, S. et al.: *Mol. Cell Biol.* 1987, 7, 2870.
- [18] Knudson, A. G.: *Cancer Res.*, 1985, 45, 1437.
- [19] Cavenee, W. K. et al.: *Nature*, 1983, 305, 779.
- [20] Cavenee, W. K. et al.: *New Engl. J. Med.*, 1986, 314, 1201.
- [21] Friend, S. H. et al.: *Nature*, 1986, 323, 643.
- Lee, W. H. et al.: *Science*, 1987, 235, 1394.
- [22] Lee, W. H. et al.: *Nature*, 1987, 329, 642.
- [23] Hunter, T.: *Nature*, 1986, 322, 14.
- [24] Weissman, B. E. et al.: *Science*, 1987, 236, 175.
- [25] Naylor, S. L. et al.: *Nature*, 1987, 329, 451.
- [26] Solomon, E. et al.: *Nature*, 1987, 328, 616.
- [27] Scrable, H. J. et al.: *Nature*, 1987, 329, 645.
- [28] Ohyashiki, K. et al.: *Cancer Res.*, 1987, 47, 3842.
- [29] Dracopoli, N. C. et al.: *Cancer Res.*, 1987, 47, 3995.
- [30] Seizinger, B. R. et al.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA*, 1987, 84, 5419.

[本文于1988年1月18日收到]

(上接第198页)

碱性抽提法^[10]提取质粒,用乙酸铵沉淀去除高分子量RNA,最后用Ultrogel A2柱层析去除小分子的RNA,获得纯一的无RNA污染的质粒DNA。廉价、快速、制备的质粒保持了较高的生物学活性。

通过反相高效液相层析(RP-HPLC)分析和制备纯化质粒^[7] S. Colote等应用反相HPLC技术分离大量不同的核酸分子,比通常的电泳技术更灵敏、简便、快速,且不需添加其他试剂(这些试剂可能会造成cccDNA的缺刻)。质粒DNA上柱量可达10毫克以上,是快速、有效地纯化大量质粒DNA的最佳方法之一。他们同时也指出,该方法也可作为质粒DNA的分析之用,比有关的电泳方法更灵敏,分辨率更高。得到的高度纯化质粒DNA具有很高的生物学活性。研究表明,质粒DNA或

其他核酸分子在反相HPLC柱上的滞留时间不依赖于核酸链长度而是取决于核酸的碱基组成及其二级结构,超螺旋DNA比松弛状或线状DNA具有更长的滞留时间。虽然HPLC技术具有上述优点,但需要较昂贵的仪器。

参 考 文 献

- [1] Thompson, J. A. et al.: *Methods in Enzymol.*, 1983, 100, 368.
- [2] Pearson, R. L. et al.: *Biochem. Biophys. Acta*, 1971, 228, 770.
- [3] Hirt, B. et al.: *J. Mol. Biol.*, 1967, 26, 365.
- [4] Zasloff, M. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1978, 5, 1139.
- [5] Hediger, M. A. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, 159, 280.
- [6] Micard, D.: *Anal. Biochem.*, 1985, 148, 121.
- [7] Colote, S. et al.: *Anal. Biochem.*, 1986, 154, 15.

[本文于1987年11月6日收到]