

DNA 是在 S 期合成, S 期除了有 DNA 的合成外, 还伴有 RNA 合成, 当细胞进入 G₁ 期, DNA 的合成已很少, 而 RNA 的合成仍在进行。据文献[4]介绍, 细胞在进入 M 期后即不再合成新的 DNA, 而 M 期的末期 RNA 的合成又开始。在 G₁ 期主要是 RNA 和蛋白质的合成, 直到 G₁ 期的后期开始发出 DNA 合成的信号, 为 DNA 的合成作准备。细胞在 S 期, 主要的特征是 DNA 合成, 此时细胞原有的遗传信息 DNA 的量增加一倍。在 S 期, 除了 DNA 合成, 还伴有 RNA 和蛋白质的合成, 因 DNA 合成的连续性亦依赖于 RNA 的合成^[5], G₁ 期 RNA 和蛋白质合成是为细胞进入有丝分裂做准备^[6,7], 而此时已不再合成 DNA。这与我们所得结果基本一致。我们采用同位素双标记技术, 其优点是在同一个样品中同时给出 ³H 和 ¹⁴C 两种参数, 这是单标记法无法做到的。

根据文献[8]介绍, 也根据我们对 CHO 细胞各时相中 cAMP 水平的测量数据^[9]分析, cAMP 在 M 期水平最低, G₁ 早期增长约三倍, G₁ 晚期及 S 期处于

中等水平。而到 G₂ 期, cAMP 水平较其它各期均高。我们考虑它们之间可能存在着一定的相互依赖和协调的关系, 这需进一步探讨和证实。

参 考 文 献

- 1 Howard A, Pelc S R. *Heredity Suppl*, 1953; 6: 261
- 2 张鸿卿, 吴同乐. 北京师范大学学报, 1981; 4: 89
- 3 Barranco S C *et al. Cell Tissue Kinetic*, 1977; 10: 335
- 4 Prescott D M. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1964; 3: 33
- 5 Seki S, Mueller G C. *Biochem Biophys Acta*, 1975; 378: 354
- 6 Donnelly G M, Siskin J E. *Exp Cell Res*, 1967; 46: 93
- 7 Kishimoto S, Liberman I. *Exp Cell Res*, 1964; 36: 92
- 8 Sheppard J R, Prescott D M. *Exp Cell Res*, 1972; 75: 293
- 9 吴同乐, 张鸿卿. 生物化学与生物物理进展, 1983; 5: 58

裸鼠人体原发性肝癌移植模型 ras 族基因的表达

屠华成 沈兆忠* 许凯黎* 于尔辛

(上海医科大学肿瘤医院, 上海 200032)

关键词 裸鼠人体原发性肝癌移植模型, ras 族基因, 基因表达

人体原发性肝癌癌基因谱的研究已经证明, N-ras 基因是人体原发性肝癌的主要转化基因之一^[1]。另外, 在大多数人体原发性肝癌组织中 N-ras 基因转录的 mRNA 有过量表达, 且癌组织表达高于癌旁组织^[2]。但应用裸鼠人体肝癌模型作癌基因表达的研究, 少有报道。为此, 本文选用一株裸鼠人体原发性肝癌移植模型, 用 Northern 印迹杂交和斑点杂交方法对 ras 族基因的表达进行了研究, 初步观察到除 N-ras 以外, Ha-ras 和 Ki-ras 基因均有不同程度的表达。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雌性 BALB/C 裸鼠 (nu/nu), 4 至 6 周龄, 由上海市肿瘤研究所动物房提供, 饲养于具有合格证书符合 SPF 条件的该动物房裸鼠室内。裸鼠人体肝癌移植模型 (已通过鉴定) 由第二军医大学病解教研室陶文照教授提供, 本动物房已皮下接种传代

二年、10 代以上。每次传代用 4 至 5 只裸鼠, 每只裸鼠两腋侧皮下接种肿瘤组织。当肿瘤长至一定体积时, 摘除裸鼠一侧眼球取血后脱颈处死, 取出瘤块, 留取少许作接种传代, 其余立即液氮冷冻备用。每次实验采用 4 至 5 只裸鼠人体肝癌组织提取 RNA。

1.2 RNA 提取 按 Chomczynski 法进行^[3], RNA 样品用适量经 0.1% DEPC 处理的双蒸水溶解, 岛津 UV-300 型紫外分光光度计测 A 值, $A_{260}/A_{280} = 1.87 \pm 0.05$ 。

1.3 Northern 吸印膜制备 取 RNA 样品 40 μ g 在 1.0% 琼脂糖甲醛凝胶上加样电泳, 电泳结束, 经紫外灯观察, 见清晰的 28S、18S 条带。然后, 在浸湿 20×SSC 的滤纸桥上, 迭加硝酸纤维素膜, 将 RNA 转移至硝酸纤维素膜上。膜片经 80℃ 烘干 2h, -20℃ 贮

* 上海市肿瘤研究所, 上海 200032

收稿日期: 1991-01-07 修回日期: 1991-04-16

存备杂交。

1.4 斑点杂交膜制备 用多孔点样器在膜片上点样,每个样品点六个样, RNA 浓度分别为 40 μ g、20 μ g、10 μ g、5 μ g、2.5 μ g、1.25 μ g。膜片经 80 $^{\circ}$ C 烘干 2h, -20 $^{\circ}$ C 贮存备杂交。

1.5 DNA 探针标记 N-ras 基因探针片段长 2.3 kb, 由中科院细胞所赠送。Ha-ras 探针长 6.6 kb, Ki-ras 探针长 1.0 kb, 由上海第二医科大学生物教研室赠送。装有上述探针片段的质粒, 用氯化钙法转入大肠杆菌, 扩增后, 用碱裂法^[4]抽提质粒 DNA, 再经酶切, 纯化所需探针片段。用随机引物寡核苷酸标记法^[5] α -³²PdCTP 标记探针 DNA, Sephadex-G 50 柱分离备用。比放射性 $>1 \times 10^5$ cpm/ng。

1.6 分子杂交 将硝酸纤维素膜放入塑料袋, 加预杂交液, 42 $^{\circ}$ C 预杂交 4h 以上, 再加入同位素标记的 DNA 探针(煮沸 5 min, 冰浴骤冷), 探针同位素终浓度 $>1 \times 10^6$ cpm/ml, 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜, 杂交结束, 膜片经 $2 \times$ SSC, 0.5% SDS, 42 $^{\circ}$ C 15 min 洗二次, $2 \times$ SSC, 0.1% SDS, 42 $^{\circ}$ C 15 min 洗二次, $0.1 \times$ SSC, 0.5% SDS, 42 $^{\circ}$ C 15 min 洗一次, 室温晾干, X 光底片暗盒加增感屏, -40 $^{\circ}$ C 放射自显影。已杂交显影的膜片, 经 $0.1 \times$ SSC, 0.1% SDS, 90 $^{\circ}$ C 洗涤 15 min, 晾干, 用其他探针再行杂交。

2 结 果

2.1 Northern 印迹杂交法 放射自显影结果显示 N-ras 基因有较强表达(图 1a)。在 28S 以上的表达区带, 估计为不均一核 RNA (HnRNA)。同一膜片经洗涤后, 再分别与 Ha-ras, Ki-ras 基因探针杂交, 结果显示 Ha-ras 基因亦有明显表达, 且区带位置形状与 N-ras 表达截然不同(图 1b), Ki-ras 基因表达则

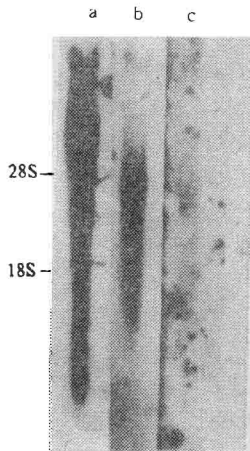


图 1 裸鼠人体原发性肝癌移植模型 ras 族基因表达的 Northern blot 分析结果(总 RNA 40 μ g)
a. N-ras; b. Ha-ras; c. Ki-ras

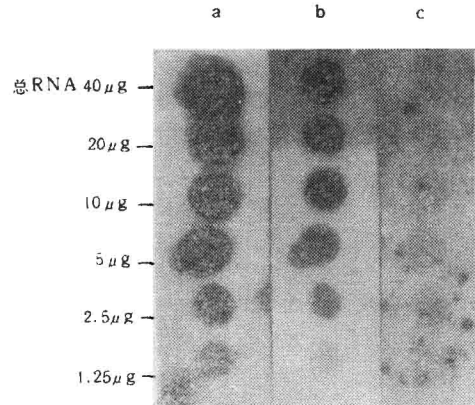


图 2 裸鼠人体原发性肝癌移植模型 ras 族基因表达的斑点杂交结果
a. N-ras; b. Ha-ras; c. Ki-ras

很弱,但仍达到本实验系统的检出水平(图 1c)。

2.2 斑点杂交法 显示了不同种类 ras 基因表达水平的差异。其中 N-ras 表达最强, Ha-ras 基因表达次之, Ki-ras 最弱(图 2a, b, c)。密度测定显示 N-ras 基因表达的强度至少是 Ha-ras 的 4 倍。以上斑点杂交结果均出自同一张硝酸纤维素膜。

3 讨 论

文献报道,用人原发性肝癌 DNA 转染 NIH3T3 细胞建立的转化细胞株 DNA 中检测到 N-ras 基因的放大和重排,证明 N-ras 基因是人原发性肝癌的主要转化基因之一^[6]。在大多数原发性肝癌中 N-ras 基因转录的 mRNA 表达增强^[7]。本文观察到在裸鼠人体肝癌模型中 N-ras 基因有较强表达,这一结果证实了裸鼠人体肝癌 N-ras 基因表达与人体肝癌手术标本相似。顾健人等曾报道 7402 肝癌细胞株 DNA 的转化细胞 DNA 中出现 Ha-ras 基因的特征性片段^[6]。但人原发性肝癌手术标本中 Ha-ras, Ki-ras 基因 mRNA 的杂交检测均呈阴性结果^[7]。然而,本实验初步观察到的结果表明,裸鼠人体肝癌中 Ha-ras 基因有较明显表达, Ki-ras 基因表达很弱,提示裸鼠人体肝癌与人原发性肝癌手术标本似乎存在着某种差异。

由于本实验仅选用一株裸鼠人体肝癌模型,该株模型中 ras 族基因表达的情况,是否与其他不同手术来源肝癌标本建立的裸鼠肝癌模型相一致,尚难定论。顾健人等在人原发性肝癌基因谱的研究中曾表明,即使是同一种癌肿的不同来源标本,其癌基因谱也可以有所差异^[8]。至于人原发性肝癌标本在移植入裸鼠前及在多次传代过程中癌基因表达是否存在变化,以及裸鼠人体肝癌在多次传代过程中是否由于某种人为的原因激活了 ras 族癌基因,导致其出现协同表达的

现象,上述问题均有待进一步深入研究。

应用裸鼠人体肝癌移植模型,国内外曾进行不少研究,主要涉及肝癌病理形态、酶学、生化及生长动力学等方面的内容。本文结果提示,裸鼠人原发性肝癌移植模型,也可作为肝癌分子生物学研究的一个可行的模型。

本实验过程曾受到上海市肿瘤研究所国家癌基因中心实验室及上海第二医科大学生生化教研室的帮助,特此致谢。

参 考 文 献

1 Gu. Jian-ren *Carcinogenesis*, 1988; 9(5):697

- 2 顾健人等. 肿瘤, 1988; 8(6): 289
- 3 Chomczynski P *et al. Anal Biochem*, 1987; 162:156
- 4 Maniatis T *et al. Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: Chapt. 1, p. 38
- 5 Maniatis T *et al. Molecular cloning a laboratory manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989: Chapt. 10, p. 13
- 6 顾健人等. 中国科学 B 辑, 1985; (5): 452
- 7 胡利富等. 中国科学 B 辑, 1985; (5): 458

氢磷酸法手工合成寡聚硫代磷酸脱氧核苷*

宗建超 倪爱国 刘福森 俞耀庭

(南开大学分子生物学研究所, 天津)

关键词 DNA 化学合成, 寡聚硫代磷酸脱氧核苷, 修饰 DNA

虽然寡聚核苷酸化学合成自动化发展迅速,但在某些场合,如一种新方法的初步试验,人们还是偏爱手工操作方法。以注射器^[1]、磨砂玻璃漏斗^[2]和柱^[3]为反应器的手工操作已有不少文献报道,这里我们想介绍一种新颖的以特氟隆(Teflon)柱为反应器的手工操作方法。特氟隆柱制作容易,结构类似于 ABI 或 Biosearch DNA 合成仪的反应柱,柱盖与柱腔之间隔以经过处理的滤纸^[4],这样一方面可防载体漏失,另一方面稍许加压,溶剂和试剂就能自由通过。

作者试验室采用下列合成方案,用衍生的控制孔径玻璃珠(CPG)载体和 3'-氢磷酸脱氧核苷单体^[5],合成了 6 个链长为 14 个碱基的寡聚脱氧核苷酸的硫代磷酸型类似物(合成的类似物均表现出强烈的反义抑制病毒的细胞致病作用,详情另文发表)。根据二甲氧基三苯甲基(DMT)测试,平均每步缩合产率不低于 96%,合成方案见表 1。

操作: 给反应柱装填适量的 CPG 载体,加盖后,在柱一端接一支活塞全部插入的空注射器(1 ml)为宜,如 Atkinson^[6]等介绍的那样制备缩合反应混合物,然后将缩合反应混合物快速吸入专用的注射器(一种碱基一个),脱去针头,将该注射器接到反应柱的另一端,缓慢地把反应物推过反应柱到另一端的空注射器,30s 后,再把反应物推回,如此来回推几次进行缩合。对于分次缩合来说,缩合分两、三次进行,每次使

表 1 硫代磷酸型 DNA 片段手工合成方案¹⁾

步骤	操 作
1. 脱 DMT	3%(二氯乙酸)DCA/CH ₂ Cl ₂ 通 20s, 等 10s; 重复 5 次
2. 洗涤	CH ₂ Cl ₂ 通 40s
3. 洗涤	CH ₃ CN/吡啶(1:1)通 20s, 等 10s, 重复 3 次
4. 干燥	通氮气 1min
5. 缩合	10—13 倍当量单体(0.133mol/L) ^[6] 和 40—52 倍当量三甲基乙酰氯(1.6mol/L), 反应 3min
6. 封闭	30 倍当量异丙醇亚磷酸酯(0.2mol/L) ^[7,8] 和 60 倍当量三甲基乙酰氯(1.6mol/L), 反应 1 min
7. 洗涤	CH ₃ CN/吡啶(1:1)通 20s, 等 10s; 重复 2 次
8. 洗涤	CH ₂ Cl ₂ 通 20s, 等 10s; 重复 5 次, 然后开始下一轮循环,直到合成结束
9. 硫化	与 0.2 mol/L 硫的 CS ₂ /吡啶/三乙胺(12:12:1)溶液室温反应 2h

1) 单体、三甲基乙酰氯、异丙醇亚磷酸酯均为 CH₃CN/吡啶(1:1)溶液; 合成规模: 3—4 μmol; 溶剂或试剂流速: 4ml/min

用 5—7 倍的过量单体(相对于载体上脱氧核苷的 5'-羟基而言)。封闭步骤操作类似。其它试剂以“流动→停→流动”的方式,通过氮气压送。在单体消耗相同的

* 国家自然科学基金资助项目。

收稿日期: 1991-01-07 修回日期: 1991-02-11