

或者说增加 NCM 用量可提高回收率. NCM 带负电荷, 能以静电荷和疏水作用的方式吸附蛋白质, 我们用乙醇处理 NCM 后, 可提高 McAb 提取率近 40%, 这可能是由于乙醇增加了 NCM 的静电荷所至^[3]. 本法中的解离液需尽快用蒸馏水和 PBS 彻底透析, 以防蛋白质变性.

参 考 文 献

1 曾章新, 戚少然, 朱忠勇等. 硝酸纤维素膜免疫吸附一步法纯化人血清 IgG 的初步报告. 中华医学检验杂志, 1991, 14 (2): 96~ 98

2 徐 兵, 黄俏佳, 朱忠勇等. 批量渗滤斑点免疫结合法筛选杂交瘤培养上清. 单克隆抗体通讯, 1995, 11 (3~4): 94~ 96

3 Gunars E V, Richard B. Immunoconcentration: a new format for solid-phase immunoassay. Clin Chem, 1985, 31: 1427~ 1431

The Membrane Filtration Affinity Chromatography and Its Application in Purifying Monoclonal Antibody (McAb) in Ascites. XU Bing, ZHU Zhongyong, TANG Yuchai, LAN Xiaopeng (*Department of Laboratory, Fuzhou general hospital of PLA. Fuzhou 350025, China*).

Abstract A new way for affinity chromatography has been developed to purify the McAb in ascites. Using nitrocellulose membrane (NCM) as solid-phase to adsorb the antigen, filtrating the sample under negative pressure through the NCM which could bind the relevant antibody to the antigen adsorbed on, then dissociating the antibody from the NCM in the purified form, this is the process of the so called membrane filtration affinity chromatography (MFAC). The albumin (Alb) McAb in ascites has been purified with the MFAC. The purified McAb showed a single band in the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). While used in dot immunofiltration assay (DIFA) to detect Alb standard, the sensibility of the purified McAb was 20 times more than that of the ascites. The simple and effective MFAC can be used as a new affinity chromatography to purify antibodies in ascites.

Kew words nitrocellulose membrane, filtration, affinity chromatography, purify, monoclonal antibody

错配碱基 PCR-RFLP 检测
K-ras 癌基因点突变*

肖尚喜 吴 琳 王道斌¹⁾ 胡杰贵 刘华平 郑 冰 张 军
(安徽医科大学第一附属医院, 合肥 230022)

摘要 错配碱基套式 PCR-RFLP 检测 K-ras 癌基因第 12 位密码子点突变, 并与一步法 PCR-RFLP 作比较. 结果显示套式 PCR-RFLP 可检测出 500 细胞中的一个突变细胞, 比一步法 PCR-RFLP 分析的敏感性提高了 100 倍. 利用该方法检测纤维支气管镜收集的标本中的突变细胞, 结果发现 9 例肺腺癌中有 5 例发生了 K-ras 癌基因第 12 位密码子点突变. 提示该方法可行, 值得推广应用.

关键词 聚合酶链反应, Ras 基因, 突变

* 安徽省卫生厅医学科研基金资助项目 (94-04). ¹⁾ 安徽医科大学病理学教研室, 合肥 230022.
收稿日期: 1996-11-12, 修回日期: 1997-05-15

癌基因对细胞生长、分化起重要的调节作用,但其结构或功能发生异常改变时,就表现出致癌潜能^[1]. K-ras 癌基因点突变在胰腺癌、肺癌及结肠癌的发生、发展过程中扮演了重要角色, Sidransky 和 Kondo 报道,在粪便和纯胰液中检测 K-ras 癌基因第 12 位密码子点突变有助于结肠癌和胰腺癌的早期诊断^[2,3]. 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction PCR) 结合寡核苷酸探针杂交和 RNA 酶 A 错配清除法检测 K-ras 点突变,虽然提高了特异性和敏感性,但对低于 10% 的突变癌组织细胞标本,上述技术分析的结果不能令人满意^[4,5]. 为了解决上述问题,我们设计了 3 条错配碱基引物,利用半套式 PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 技术,检测 K-ras 基因第 12 位密码子点突变,进一步提高了检测敏感性. 现报道如下:

1 材料与方法

1.1 标本来源

9 例术后经病理证实为胰腺癌患者,术前均经纤维支气管镜的刮匙、活检钳获取标本,或取毛刷刷洗液离心沉淀标本,然后速冻、磨碎并溶于裂解液 (含 200 mg/L 蛋白酶 K, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.0), 55℃ 过夜,酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1) 抽提一次,乙醇沉淀后溶于 TE (10 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 1 mmol/L EDTA pH 8.0) 缓冲液中待用.

1.2 细胞株

A₅₄₉ 胰腺癌细胞株 (含有 K-ras 癌基因第 12 位密码子 GGT → AGT 即甘氨酸 → 丝氨酸点突变)^[6] 和 HFL 人胚肺细胞株 (均购于中科院上海细胞所), 在 RPMI1640 (含 5%~10% 的小牛血清) 营养液中培养成单层,胰酶消化,收集细胞,溶于上述裂解液,55℃ 过夜,酚-氯仿-异戊醇抽提,冷乙醇沉淀,TE 溶解,紫外分光光度计测定 DNA 含量.

1.3 PCR-RFLP

寡核苷酸引物由中科院上海细胞所协助合成. 引物 A: 5'-ACT GAA TAT AAA CTT

GTA GTG GTT GGA CCT-3'; 引物 B: 5'-TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC; 引物 C: 5'-TAA TAT GTC GAC TAA AAC AAG ATT TAC CTC-3'. 下划“—”为错配碱基,为限制性内切酶引入酶切位点. PCR-RFLP 检测分两轮进行, A、B 为首轮 PCR 引物, 100 μl 反应体系中, 含 2 U 的 Taq 酶 (Promega 公司产品), 引物各 50 pmol, 4 种 dNTP 各 0.2 mmol/L, 500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl (pH 9.0), 1% Triton X100, 2.0 mmol/L Mg²⁺, 模板 DNA 10 μl. 95℃ 变性 5 min 后, 经 95℃ 60 s、55℃ 60 s、73℃ 30 s 循环扩增 30 次, 73℃ 延长 5 min. 取首轮 PCR 产物 10 μl、2 μl 10× 缓冲液 (Promega 提供, 内含 500 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 100 mmol/L MgCl₂, 500 mmol/L NaCl 等), 4 U Bst NI 内切酶及 4 μl 无菌去离子水, 60℃ 保温 4 h. 首轮 PCR 产物为 157 bp, 野生型 K-ras 基因酶切产物为 116 bp, 突变型 K-ras 基因酶切产物为 143 bp. 取首轮酶切产物 2 μl, 稀释 1 000 倍, 取 10 μl 作为第二轮 PCR 的 DNA 模板, 引物为 A、C, 扩增条件和循环数以及限制性位点酶切过程同首轮. 第二轮 PCR 产物为 143 bp, 野生型 K-ras 基因酶切产物为 106 bp, 突变型 K-ras 基因酶切产物为 135 bp. 两轮酶切产物经 3.5% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色后观察结果并比较.

2 结果与讨论

A₅₄₉ 细胞株与 HFL 细胞株 DNA 按不同比例混合, 首轮 PCR-RFLP 结果显示如图 1, A₅₄₉ DNA/HFL DNA 为 10:1 时, 就能看到 116 bp 的野生型泳带; 比例为 1:5 时, 仅能看到较弱的 143 bp 的突变型电泳带. 若经两轮 PCR-RFLP, 结果显示图 2, A₅₄₉ DNA/HFL DNA 为 1:128 时, 才能看到 106 bp 的野生型电泳带, 比例 1:512 时, 仍能看到 135 bp 的野生型电泳带. 比一步法 PCR-RFLP 的敏感性高 100 倍.

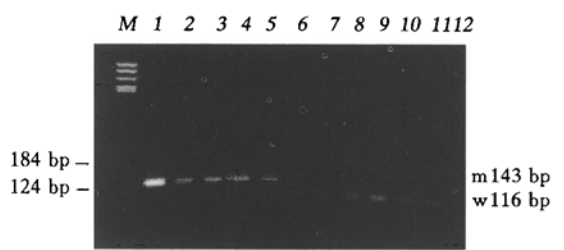


图1 首轮 PCR-RFLP 3.5%琼脂糖凝胶电泳结果
M: 核酸分子质量标准 (pBR322/Hae III); 1: 未经酶切的 PCR 产物泳动带; 2~ 11: 分别为 A₅₄₉细胞株纯化 DNA 与 HLF 细胞株纯化 DNA 按 1: 0、10: 1、5: 1、2: 1、1: 1、1: 2、1: 5、1: 10、1: 15、1: 0 的比例混合, 经首轮 PCR-RFLP 后的酶切产物泳动带; 12: H₂O 空白对照; m143 bp 为突变型泳动带; w116 bp 为野生型泳动带.

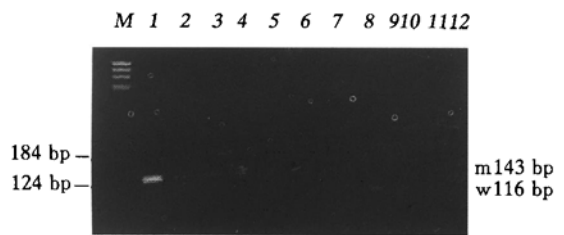


图2 两轮 PCR-RFLP 3.5%琼脂糖凝胶电泳结果
M: 核酸分子质量标准 (pBR322/Hae III); 1: 未经酶切的 PCR 产物泳动带; 2~ 11: 分别为 A₅₄₉细胞株纯化 DNA 与 HLF 细胞株纯化 DNA 按 1: 16、1: 32、1: 64、1: 128、1: 256、1: 512、1: 1024、1: 2048、1: 4096、0: 1 的比例混合, 经两轮 PCR-RFLP 后的酶切产物泳动带; 12: H₂O 空白对照; m135 bp 为突变型泳动带; w116 bp 为野生型泳动带.

9 例经纤维支气管镜收集的肺腺癌标本, 经两轮 PCR-RFLP 后, 结果如图 3 的 2、3、4、7、9 为阳性即在第 12 位密码子发生了突变, 而 1、5、6、8 为阴性, 没有发生突变.

肿瘤发生是个多阶段的病理过程, 可能存在于多种癌基因及抑癌基因的协同作用^[7]. K-ras 基因突变导致其表达产物 p21 蛋白功能异常, 使细胞内有关细胞分化的信号传导通路发生障碍, 可能是早期造成细胞恶性转化的重要原因之一^[8]. Levi 等^[4]报道壶腹部癌的 K-ras

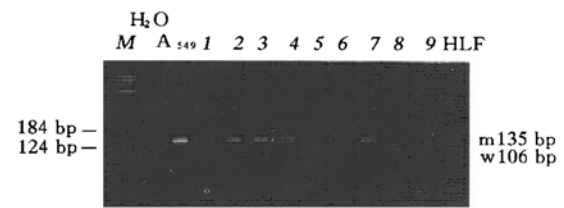


图3 9 例肺腺癌标本 PCR-RFLP 3.5%琼脂糖凝胶电泳结果
M: 核酸分子质量标准 (pBR322/Hae III); H₂O: 空白对照; A₅₄₉: 突变型阳性对照; HLF: 野生型阴性对照; 1~ 9: 肺腺癌细胞 DNA 经两轮 PCR 扩增, 产物用 Bst NI 消化后, 再经 3.5% 琼脂糖凝胶电泳观察结果. 其中 2、3、4、7、9 为突变型, 1、5、6、8 为野生型.

癌基因第 12 位密码子突变率几乎 100%, 但在癌的早期阶段, 癌组织中突变细胞所占比例往往低于 10%, 一步法 PCR-RFLP 分析常造成假阴性. 我们用纤维气管镜收集标本时, 特别是癌症早期, 常取刷洗物或灌注液, 标本中常混有大量的正常细胞. 从混有少量突变细胞的正常组织细胞中检出突变基因, 对于早期诊断至关重要. 我们设计的两轮 PCR-RFLP 的原理是: 首轮以 A、B 为引物的 PCR 同时扩增正常的野生型 K-ras 基因和异常的突变型 K-ras 基因. 经 Bst NI 消化后, 野生型 K-ras 基因被切断, 失去了与引物 A 的结合能力. 因此, 首轮 Bst NI 消化产物中, 能与引物 A 结合的突变型 K-ras 基因 DNA 含量及纯度相对地大为提高, 增加了以该消化产物为模板、以 A、C 为引物的第二轮 PCR-RFLP 分析的敏感性. 我们的实验结果显示, 该方法能检测出 500 个细胞中的 1 个突变细胞. 利用该方法检测纤维支气管镜收集的标本, 9 例肺腺癌中发现有 5 例发生 K-ras 癌基因点突变. 另外, 该方法可用 3.5% 琼脂糖凝胶电泳分析结果, 不需同位素及其他复杂技术, 便于向各个层次医院推广. 至于 K-ras 癌基因点突变如何与其他癌基因及抑癌基因协同作用并在哪个阶段促使正常细胞发生恶性转化值得进一步深入研究.

参 考 文 献

- 1 Bishop J M. The molecular genetics of cancer. *Science*, 1987, **235**: 305~ 309
- 2 Sidransky D, Tokino T, Hamilton S R *et al.* Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science*, 1992, **256** (5053): 102~ 105
- 3 Kondo H, Sugano K, Fukayama N *et al.* Detection of point mutations in the K-ras oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer*, 1994, **73** (6): 1589~ 1594
- 4 Levi S, Urbarr Ispizua A, Gill R *et al.* Multiple K-ras codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res*, 1991, **51**: 3497~ 3502
- 5 王志永, 刘彤华, 陈 杰等. 结肠粘膜、腺瘤和腺癌组织中 K-ras 癌基因突变的检测. *中华病理学杂志*, 1993, **22** (6): 333~ 336
- 6 Kashii T, Mizushima Y, Monno S *et al.* Gene analysis of K-, H-ras, p53, and retinoblastoma susceptibility genes in human lung cancer cell lines by the polymerase reaction/single-strand conformation polymorphism method. *J Cancer Res, Clin Oncol*, 1994, **120**: 143~ 148
- 7 鲁润龙. 细胞生成、死亡与癌变. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1996. 242~ 247
- 8 Rodenhuis S, Slebos R J. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res*, 1992, **52**: 2665s~ 2669s

Detection of K-ras Mutated at Codon 12 with a Modified PCR-RFLP Technique.

XIAO Shangxi, WU Lin, WANG Daobin¹⁾, HU Jiegui, LIU Huaping, ZHENG Bing, ZHANG Jun (*The First Affiliated Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230022, China*; ¹⁾*Department of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China*).

Abstract An approach to detect K-ras oncogene mutated at codon 12 was devised by using a nested polymerase chain reaction strategy based on mismatched primers. A titration experiment showed that the sensitivity obtained by use of the nested PCR was 1/512. This represented the ability to detect one cell heterozygous for K-ras codon 12 mutation over 500 normal cells and was 100-fold greater than that obtained after one-step PCR. Application of this assay to 9 patients with adenocarcinoma of the lung showed 5 cases containing one or more K-ras mutation at codon 12. It is suggested that the method was practicable and worthy of application and dissemination.

Key words polymerase chain reaction, ras gene, mutation

欢迎订阅

欢迎供稿

《应用与环境生物学报》是中国科学院成都生物研究所主办、科学出版社出版的全国性学术刊物。主要报道我国应用生物学、环境生物学及相关科学领域的基础研究、应用基础研究和应用研究的成果、包括研究论文、研究简报和本刊特约的综述或述评。是我国生物学及环境科学工作者、大专院校生物及环境专业师生进行学术交流的良好园地。本刊为季刊、季末月 25 日出版、每期 96 页、1998 年每期定价 11.00 元。全国各地邮局均可订阅，邮发代号 62-15。如补订 1995~ 1997 年各卷（卷价分别为 32.00 元、44.00 元和 44.00 元），可汇款至本编辑部邮购。地址：610041 成都市人民南路：中国科学院成都生物研究所学报编辑部，电话：(028) 5229903，联系人：刘东渝。

《遗传》杂志（双月刊）是中国科学院遗传研究所和中国遗传学会共同主办的全国性学术期刊，国内外公开发行，中国百种自然科学核心期刊之一，在我国生物学界拥有良好的声誉和广泛的读者与作者队伍，所刊登的高水平论文已被国内外多家情报检索期刊收录。内容涉及动物遗传学、植物遗传学、分子与微生物遗传学、人类遗传学、医学遗传学及遗传工程等方面，主要栏目有：遗传快报、研究报告、实验技术与方法、综述、学术讨论及学会动态等。读者对象为农林牧渔业、基础医学、动物学、植物学、细胞学、生物化学等方面的科研、教学、管理人员及图书情报人员等。1998 年每期定价 5.80 元，邮发代号：2-810。《遗传》编辑部办理订阅事宜，免费邮寄。地址：100101 北京市安定门外大电路 917 大楼中国科学院遗传研究所，电话：(010) 64919944-2563，电传：(010) 64914896，联系人：李绍武。