

技术与方法

应用寡聚核苷酸检测 c-Ha-ras 癌基因点突变

史天良* 邓国仁 刘秀怀** 苗 晶 许 毅

(北京市肿瘤防治研究所生化室)

提 要

人工合成的寡聚核苷酸探针能够准确地检测出克隆的 c-Ha-ras 癌基因第 12 位密码子是否发生点突变。将多聚酶 DNA 链延伸反应 (PCR) 与寡聚核苷酸探针结合起来测定组织或细胞株中的单拷贝基因 c-Ha-ras 第 12 位密码子的点突变,获得满意的结果。此方法的建立,有助于肿瘤的早期诊断、分型等方面的研究。

基因中一个核苷酸发生改变(即点突变)是癌基因激活的重要途径之一。在膀胱癌、乳腺癌、胃癌等瘤组织或细胞株中都发现 c-Ha-ras 第 12 位密码子发生了点突变^[1-4]。因此,测定肿瘤组织及细胞株的总 DNA 中 c-Ha-ras 第 12 位密码子点突变是研究癌变机制、进行肿瘤早期诊断、分型的重要工作。测定基因的点突变除了 DNA 序列分析、限制性内切酶酶解片段长度多态性分析^[5]、RNA 酶错配断裂分析^[6]之外,还有比较简单、经济、快速的寡聚核苷酸探针分子杂交分析法^[7-9]。我们按照正常的原癌基因 c-Ha-ras 和胃癌中克隆出的第 12 位密码子由 GGC 突变为 GTC 的 Ha-ras 癌基因,合成两个以突变位点为中心的寡聚核苷酸,经 ³²P 标记后,作为探针与克隆的正常的 c-Ha-ras 和突变型 Ha-ras 进行分子杂交,可以准确地测出这个癌基因是否发生第 12 位密码子点突变。我们将正常胃组织与胃癌细胞株的总 DNA,经多聚酶 DNA 链延伸反应 (polymerase chain reaction, PCR) 扩增后^[10],与寡聚核苷酸探针进行分子杂交,同样可以判断出胃癌细胞株 BGC-823 DNA 中的 c-Ha-ras 第 12 位密码子发生了点突变。这个结果同 DNA

序列分析结果完全一致。

材 料 与 方 法

一、正常胃组织与细胞株 DNA

取正常胃组织标本 1g,剪碎后按 Shih 法制备高分子量 DNA^[11]。胃癌细胞株 MGC-803 (引自山东师范学院)、BGC-823 (引自北京医科大学附属人民医院) 培养至细胞数为 $3 \times 10^7 - 3 \times 10^8$ 后,也采用 Shih 法提取 DNA。

二、质粒 DNA

含原癌基因 c-Ha-ras 的质粒 pbc-NI 为美国国立癌研究所 Barbacid 赠送;含第 12 位密码子由 GGC 突变为 GTC 的 c-Ha-ras 质粒 pGC6.6 为本室从胃癌细胞株 BGC-823 DNA 中筛选出的次级克隆^[4]。DNA 的提取按文献 [12] 进行。

三、工具酶

耐热 Taq DNA 多聚酶为美国 Cetus 公司所赠;T₄ 多核苷酸激酶、DNA 聚合酶 I 大片段 (Klenow) 和限制性内切酶 Sac I 均购自华美生物工程公司。

* 山西省肿瘤研究所,太原。

** 中国康复研究中心,北京。

四、同位素

[γ - 32 P] ATP (6000Ci/mmol) 和 [α - 32 P] dCTP (3000Ci/mmol) 购自美国 NEN 公司。

五、探针

a) 寡聚核苷酸的设计

末端标记法使用的寡聚核苷酸是按照正常的原癌基因 c-Ha-ras 和胃癌细胞株 BGC-823 DNA 中克隆出的突变型 c-Ha-ras 癌基因的第 12 位密码子为中心的 19 个核苷酸序列, 人工合成的两个 19 聚体。它们的序列分别为 5'-TGGGCGCCGGCGGTGTGGG-3' (简称 Ha19-35G) 和 5'-TGGGCGCCGTCGGTGTGGG-3' (简称 Ha19-35T)。引物延伸法使用的模板是在 Ha19-35G 和 Ha19-35T 的 3' 末端再延长一段 5'-AGCTCAA-3' 序列, 所得到的 26 聚体。引物为这段延长序列的互补序列 5'-TTGAGCT-3'。这样模板与引物复性后, 即可形成一个 Sac I 的切割位点。

b) 末端标记法

按文献方法^[13]略加修改进行。10 μ l 反应液中包含 50ng 19 聚体、1 μ l 10 $\times$ 缓冲液 (500mmol/L Tris-HCl, pH7.6、100mmol/L MgCl₂、50mmol/L β -巯基乙醇和 1mmol/L EDTA)、50 μ Ci [γ - 32 P] ATP 和 2U T₄ 多聚核苷酸激酶。在 37 $^{\circ}$ C 反应 70 分钟, 用含 7mol/L 尿素的 12% 聚丙烯酰胺凝胶分离, 收集产物部分。比放射性为 1×10^9 dpm/ μ g。

c) 引物延伸法

参照文献 [14] 并加以改进。10 μ l 的反应液中含有 6mmol/L Tris-HCl (pH7.6)、6mmol/L MgCl₂、6mmol/L β -巯基乙醇、50mmol/L NaCl、50 μ Ci [α - 32 P] dCTP、0.1mmol/L dATP、0.1mmol/L dGTP、0.1mmol/L TTP、40ng 模板、11 ng 引物和 3U DNA 聚合酶 I 大片段。在 0 $^{\circ}$ C 反应 1 小时后, 置 70 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟。加入 1 μ l SacI (10U/ μ l), 于 37 $^{\circ}$ C 保温 2 小时。最后沸水浴热变性, 经含 7mol/L 尿素的 12% 聚丙烯酰胺凝胶分离, 收集产物部分。比放射性为 5×10^9 dpm/ μ g。

本实验使用的探针是采用上述两种方法制

备的。

六、多聚酶 DNA 链延伸反应 (PCR)

引物 PC1 和 PC2 均为人工合成的 20 聚体。PC1 的序列为 c-Ha-ras 第 12 位密码子突变位点算起正链的上游第 31 至第 50 个核苷酸序列; PC2 则为负链的突变位点下游第 31 至 50 个核苷酸序列。

PCR 按 Saiki 法^[15,16]稍加改进后进行。取 1 μ g 组织或细胞株 DNA, 溶于 50 μ l 缓冲液中。缓冲液含 10mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 50mmol/L KCl, 1.5mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L dATP, 0.2mmol/L dGTP, 0.2mmol/L dCTP, 0.2mmol/L TTP, 1 μ mol/L PC1, 1 μ mol/L PC2 和 1 U Taq 多聚酶。溶液上层加 50 μ l 液体石蜡。将试管先后置于 95 $^{\circ}$ C 水浴 1 分钟, 54 $^{\circ}$ C 水浴 2 分钟, 72 $^{\circ}$ C 水浴 5 分钟。重复以上循环 35 次。去液体石蜡。

七、斑点杂交

热变性后的 DNA 溶液点于硝酸纤维素膜上。80 $^{\circ}$ C 烘烤 2 小时。杂交是在 42 $^{\circ}$ C 水浴中进行的。杂交液的组成是 50% 甲酰胺, 6 $\times$ SSC, 0.5% SDS, 5 $\times$ Denhard's, 100 μ g/ml 变性鲑精 DNA 和探针。杂交后, 先用 2 $\times$ SSC、0.1% SDS 洗液, 在室温浸洗 2 次, 每次 20 分钟; 再用 0.2 $\times$ SSC、0.1% SDS 洗液于 56 $^{\circ}$ C 水浴中浸洗 10 分钟, 在 68 $^{\circ}$ C 水浴浸洗 10 分钟。室温晾干后, 置 -70 $^{\circ}$ C 自显影 5—7 天。

结果与讨论

人工合成的特定寡聚核苷酸探针对于分析基因点突变是一种很有用的工具。我们采用 Ha19-35G (野生型) 和 Ha19-35T (突变型) 的放射性探针, 分别与 pGC6.6 和 pbc-NI 同时杂交, 经较严格的浸洗条件下处理, Ha19-35T 放射性探针与 pGC6.6 杂交匹配牢固, 放射自显影后, 呈现出较好的影象; 而与 pbc-NI 杂交匹配差, 没有呈现出影象。Ha19-35G 放射性探针的杂交结果正好与此相反。我们以 500ng、250ng、125ng、63ng、31ng、16ng、8ng、4ng 和 2ng 的梯度浓度的 pGC6.6 和 pbc-NI

同时与 Ha19-35T 放射性探针杂交。结果可知,凡是大于 2ng 剂量的 pGC6.6 与 Ha19-35T 放射性探针杂交后,都有明显的影象;而且影象的强弱与样品的剂量有密切的关系。然而上述任何剂量的 pbc-NI 都没有呈现出影象。1 μ l 的正常胃组织或胃癌细胞株的总 DNA,经 PCR 扩增后,同探针杂交,能够识别出胃癌细胞株 BGC-823 总 DNA 中发生了 c-Ha-ras 癌基因第 12 位密码子点突变。这个结果同 DNA 序列分析的结果完全一致。

引物延伸法标记合成探针是一种比较理想的方法。当模板与引物复性后,在引物 3' 端开始依次掺入包括 [α - 32 P] dCTP 在内的四种 dNTP 底物。合成具有放射性的探针链。这样,可以由低比放射性强度的前体,获得高比放射性的寡聚核苷酸探针。若模板的 3' 末端延长一个限制性内切酶识别位点的序列,并用这段延长序列的互补序列为引物,如本实验中的探针是在 19 聚体 3' 末端延长了一段 5'-AGCTCAA-3' 序列,由 5'-TTGAGCT-3' 的序列做引物。当模板与引物复性后,就形成了限制性内切酶 SacI 切割位点序列。酶促延伸合成后,用 SacI 酶解。由于 SacI 对 DNA 双链切割后形成 5' 突出末端,经 SacI 酶解后,大片段的两条链长短不同(分别为 19 和 23 个碱基),所以经含 7mol/L 尿素的 12% 聚丙烯酰胺凝胶分离,可获得单链的放射性探针。采用这些步骤可以大

大地提高放射性探针的有效浓度。

PCR 是最近发展起来的新技术。采用这项技术,只要取少量的样品 DNA,经 25—35 次扩增,可使 PC1 与 PC2 之间的 DNA 扩增几十万至几百万倍。将 PCR 与寡聚核苷酸探针结合起来,测定组织与细胞株的单拷贝基因是否发生点突变,可以获得较满意的结果。此方法的建立,为测定肿瘤组织及细胞株中的基因点突变,以及进行肿瘤早期诊断、分型提供了新的途径。

参 考 文 献

- [1] Tabin, C. J. et al.: *Nature*, 1982, **300**, 143.
- [2] Reddy, E. P. et al.: *Nature*, 1982, **300**, 149.
- [3] Kraus, M. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, **81**, 5384.
- [4] Deng, G. et al.: *Cancer Res.*, 1987, **47**, 3195.
- [5] Fujita, J. et al.: *Nature*, 1984, **309**, 464.
- [6] Myers, R. M. et al.: *Science*, 1985, **230**, 1242.
- [7] Bos, J. L. et al.: *Blood*, 1987, **69**, 1237.
- [8] Zarbl, H. et al.: *Nature*, 1985, **315**, 382.
- [9] Youssoufian, H. et al.: *Nature*, 1986, **324**, 380.
- [10] Deng, G.: *Nucl. Acids Res.*, 1988, **16**, 6231.
- [11] Shih, C. and Weinberg, R. A.: *Cell*, 1982, **29**, 161.
- [12] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, 86.
- [13] Johanncs, W. G. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1987, **15**, 5669.
- [14] Bos, J. L. et al.: *Nucl. Acids Res.*, 1984, **12**, 9155.
- [15] Saiki, R. K. et al.: *Science*, 1985, **230**, 1350.
- [16] Saiki, R. K. et al.: *Science*, 1988, **239**, 487.

[本文于 1988 年 9 月 19 日收到]

植酸钙及植酸的制法

植酸广泛用于食品、化工、医药、石油轻纺等工业领域。在农业上可做生产激素使用。过去依赖进口,现我国已组织出口,国内市场价每吨 14—21 万元。生产植酸钙及植酸的主要原料是米糠、麸皮糠饼以及其它农产品等。每 100 公斤原料可生产植酸钙 5—6 公斤(植酸 2—3 公斤)其下脚渣料仍为禽畜优质饲料。生产植酸钙工艺简单,投资约 300—1000 元即可生产办厂,植酸钙除可制肌醇外,大量用于制植酸,设备投资约 2 万元左右。培训收费,植酸钙面授:单位 300 元,个人 250 元。函授:单位 150 元,个人 100 元。学习植酸时面授:单位 1200 元,个人 1000 元。函授:单位 500 元,个人 400 元。另外,学习植酸化验技术外加 100 元。每月 8、18、28 日三天开班学习,每次三天(B58 号)。北京市星火技术研究所提供,通信处:北京市 867 信箱 20816 组,邮政编码:100024。