

参 考 文 献

- 1 Centers for disease control. *Morbid Mortal Weekly Rep*, 1983; 32: 306
- 2 Durst M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1983; 80: 3812
- 3 Bedell M A *et al.* *J Virol*, 1987; 6(11): 3635
- 4 Smotkin D *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986; 83(13): 4680
- 5 Yasumoto S *et al.* *Cell Biol*, 1987; 7(6): 2165
- 6 Androphy E J *et al.* *EMBO J*, 1987; 6(4): 989
- 7 Dyson N *et al.* *Science*, 1989; 243: 934
- 8 Seedorf K *et al.* *Virology*, 1985; 145: 181
- 9 Kleid D G *et al.* *Science*, 1981; 214(4525): 1125
- 10 顾良银. 生命的化学, 1988; 18(1): 21
- 11 Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor, 1982
- 12 Amann E *et al.* *Gene*, 1984; 32: 203
- 13 Laemmli U K *et al.* *Nature*, 1970; 227: 680
- 14 Smotkin D *et al.* *J Virol*, 1987; 61(5): 1686
- 15 Sager R. *Science*, 1989; 246: 1406

SUBCLONING AND EXPRESSION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 E7 GENE IN *ESCHERICHIA COLI*

Qi Fengju Xu Qian

(Department of Biochemistry, The First Medical College of PLA, Canton 510515, P. R. China)

ABSTRACT

The E7 gene of human papillomavirus type 16 was expressed in *E. coli* with molecular cloning technique. A 191 bp fragment containing most of the E7 gene was cut out from the HPV 16 genome with the restriction enzyme Dde I. The plasmid pATH10 which contains the promoter of the tryptophane operon was chosen as the expression vector. The 191 bp fragment and the vector plasmid were ligated together later and the recombinant DNA formed was used to transform *E. coli* DH5 α . Restriction enzyme mapping and SDS-PAGE protein analysis were done on four transformants. The molecular weight of the newly expressed protein of the transformant was estimated and found to correspond well with that expected theoretically. We concluded that the expressed protein was a fusion protein of TrpE/E7₃₂₋₉₅aa.

Key words human papillomavirus, cell transformation, cloning and expression, recombinant DNA

应用 PCR 及寡核苷酸探针研究人原发性肺癌中 Ki-ras 点突变*

覃 扬 孙芝琳 赵建升 孙 宁
(华西医科大学生化教研室, 成都 610041)

步 宏 刘开凤
(华西医科大学病理教研室)

提 要

应用 PCR 及寡核苷酸探针杂交方法研究了 50 例人原发性肺癌石蜡切片标本

* 国家“七·五”攻关资助项目。

收稿日期: 1991-05-13 修回日期: 1991-10-07

中 Ki-ras 12(Val), Ki-ras 13(Cys) 点突变,发现 13 例为点突变阳性,突变率为 26%,其中 3 例同时兼有二种点突变 (Val/Cys); Ki-ras 12 位的点突变率(20%)比 Ki-ras 13 位的点突变率(12%)高。同时还发现 Ki-ras 基因的点突变存在于腺癌、鳞癌、小细胞肺癌以及各种分化程度的肺癌中。

关键词 人肺癌, Ki-ras 点突变, PCR

ras 癌基因点突变激活与肿瘤发生具有密切关系。常见的是三种 ras 基因 (H-ras, N-ras, Ki-ras) 的第 12, 13, 61 位密码激活^[1]。近年来国外报道人原发性肺癌中发现 Ki-ras 基因点突变^[1-3], 但国内尚未见报道。本文用 PCR 技术及寡核苷酸探针杂交研究了 50 例人原发性肺癌石蜡切片样品中 Ki-ras 基因的点突变, 并对点突变与肿瘤组织类型及与吸烟的关系进行了讨论。

1 材料与方 法

1.1 试剂

Taq 耐热 DNA 聚合酶、T₄ 寡核苷酸激酶购于华美公司。γ-³²PdCTP 购于北京福瑞公司。尼龙膜为 Bio-Rad 公司产品。引物及寡核苷酸探针由中国科学院微生物所合成。

1.2 标本及 DNA 提取方法

1986—1988 年保存于我校病理教研室的肺癌切除术后送检的石蜡包埋块共 50 例, 经修切至肿瘤组织, 用 HE 染色镜检证实将进行 PCR 扩增的切片为肿瘤组织。

DNA 提取方法: 置 1 张 6μ 厚切片于 Eppendorf 管, 依次用二甲苯、无水乙醇处理切片, 然后真空抽干, 加双蒸水, 置沸水浴煮沸 10 min 备用。

1.3 PCR 扩增反应

寡核苷酸引物序列^[4]:

5' GACTGAATATAAACTTGTGG3'

5' CTCTATTGTTGGATCATATT3'

按华美公司药盒指导的条件进行, 反应总体积为 50μl, 含引物各 0.2μg, 每次循环: 93℃, 30s; 45℃, 45s; 68℃, 45s; 共 30 次循环。然后取 10μl PCR 产物, 在 8% PAGE 上电泳 2h, 溴乙锭染色, 紫外光下观察结果。

1.4 寡核苷酸探针打点杂交

寡核苷酸探针序列^[4]:

Ki-ras 12 正常:

5'CCTACGCCACCAGCTCCAAC3'

Ki-ras 12 突变为 Val:

5'CCTACGCCAACAGCTCCAAC3'

Ki-ras 13 突变为 Cys:

5'CCTACGCAACCAGCTCCAAC3'

尼龙膜经双蒸水浸湿、10×SSC(10×SSC: 1.5mol/LNaCl, 0.15mol/L柠檬酸钠)浸湿备用。20μl PCR 产物经变性液(变性液终浓度: 0.4 mol/LNaOH, 25mmol/L EDTA)处理后, 点样于尼龙膜, 80℃烤 2h。按《Molecular cloning》^[5]的方法末端标记寡核苷酸探针。点样的膜在预杂交液(3mol/L 四甲基氯化铵, 50mmol/L Tris-HCl pH8.0, 2mmol/L EDTA, 5×Denhardt's 液, 0.1%SDS, 100μg/ml 变性蛙鱼精 DNA)中, 58℃预杂交 2h, 然后在预杂交液中加入 50—100ng 标记探针, 58℃杂交 2—4h。杂交完毕后, 依次用 2×SSPE(1×SSPE: 0.18 mol/L NaCl, 10mmol/LNaH₂PO₄ pH 7.4, 1 mmol/L EDTA pH7.4), 0.1%SDS, 室温洗膜 2 次, 5×SSPE, 0.1%SDS, 64℃洗膜 5min, 在无 Denhardt's 液和变性蛙鱼精 DNA 的预杂交液中, 60℃保温 1h, -70℃曝光过夜。

2 结 果

2.1 扩增结果 电泳检查 PCR 扩增产物, 可见明显的 DNA 扩增区带, 其大小为 110 个碱基对(见图 1)与理论值(110bp)相符, 无非特异性区带, 在引物对照和不加引物的 DNA 对照中均无扩增的区带。

2.2 杂交结果 在 50 例经 PCR 扩增的肺癌样品与 Ki-ras 12 位正常探针杂交中, 除

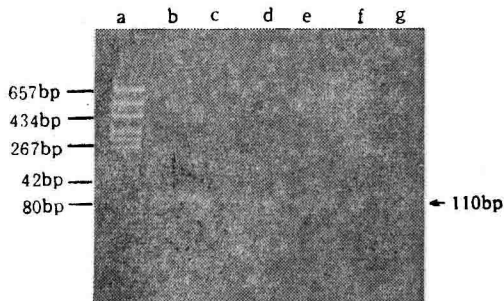


图1 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物
Fig.1 Detection of PCR products by 8% PAGE

a: PGEM-7zf-HaeIII DNA 分子量标准,
b-e: 4例标本经 PCR 扩增的产物,
f: 引物对照, g: DNA 对照
a: PGEM-7zf-HaeIII DNA marker,
b-e: Amplified specimens of lung cancer,
f: Primer control, g: DNA control

2例(No23, No50)扩增较弱外,均为强阳性,表明扩增产物为靶 DNA 序列。50例肺癌样品与 Ki-ras 12 密码突变为 GTT (编码 Val) 的探针杂交中,有 10 例为阳性(No 8, 11, 13, 14, 19, 20, 22, 29, 31, 38, 见图 3);而在与 Ki-ras 13 位密码突变为 CGT (编码 Cys) 的探针杂交图中,可见 6 例阳性 (No 6, 11, 14, 16, 37, 38, 见图 4)。

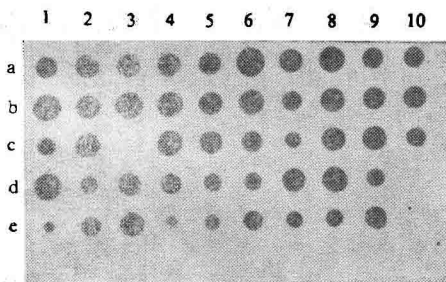


图2 PCR 产物与正常 Ki-ras 12 探针杂交
Fig.2 Hybridization of PCR products with the normal Ki-ras 12 probe

50 例人肺癌标本,经 PCR 扩增,点样于尼龙膜上,与 Ki-ras 12 位正常密码的寡核苷酸探针杂交, -70℃曝光 2.5h

Fifty lung cancer samples are amplified with PCR, spotted onto nylon filter and hybridized to the oligonucleotide probe specific for Ki-ras 12 normal sequence GGT, exposed at -70°C for 2.5 hours

2.3 各种肺癌组织类型、分化程度与 Ki-ras 点突变的关系 见表 1 及表 2。

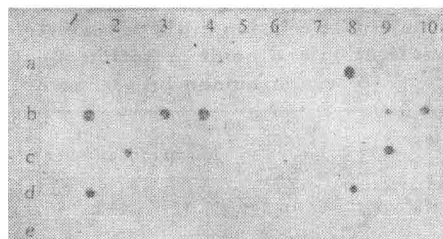


图3 PCR 产物与突变的 Ki-ras 12(Val)探针杂交
Fig.3 Hybridization of PCR products with the mutated Ki-ras 12(Val) probe

50 例人肺癌样品与 Ki-ras 12 突变为 GTT(Val) 的寡核苷酸探针杂交, -70℃曝光 15h
Fifty amplified lung cancer samples are hybridized to the oligonucleotide probe specific for Ki-ras 12 mutation sequence GTT (Val), exposed at -70°C for 15 hours

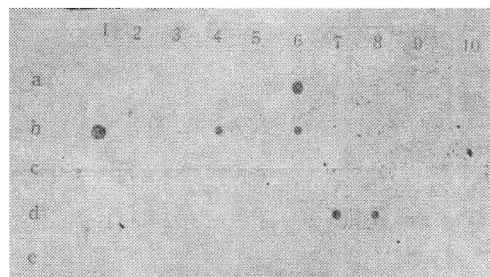


图4 PCR 产物与突变的 Ki-ras 13 (Cys)探针杂交
Fig.4 Hybridization of PCR products with the mutated Ki-ras 13 (Cys) probe

50 例人肺癌样品与 Ki-ras13位突变为 CGT(Cys) 的寡核苷酸探针杂交, -70℃曝光 15h
Fifty amplified lung cancer samples are hybridized to the oligonucleotide probe specific for Ki-ras13 mutation sequence CGT (Cys), exposed at -70°C for 15 hours

2.4 肺癌病人的吸烟与 Ki-ras 点突变的关系 我们对 50 例肺癌病例中吸烟情况清楚的 46 例进行了分析,结果表明吸烟者 30 例,其中点突变者 8 例,突变率为 27%;不吸烟者 16 例,点突变者 3 例,突变率为 19%,统计学检验差异无显著性(P > 0.05)。

3 讨论

ras 基因家族(H-ras, N-ras, Ki-ras)编码 P21 蛋白,它具有结合 GTP 和 GTPase 的功能,起着传递生长因子信息的作用。当 ras 基因的 12, 13 或 61 位密码的碱基点突变引起氨基酸改变时,导致 ras 基因激活,使之具有转化细胞的功能。原因是这些氨基酸的改变使 P21 蛋白

表 1 肺癌组织类型与 Ki-ras 点突变的关系
Table 1 The relationship between histological classification and point mutation of oncogene Ki-ras of human lung cancer

肿瘤类型 Histological classification of tumors	例数 Case number	突变例数 Mutation number			突变率 Mutation rate %
		Ki-12	Ki-13	重复 Repeat	
腺癌 Adenocarcinoma	27	6	3	2	26
鳞癌 Squamous cell carcinoma	13	3	1	0	31
大细胞癌 Large cell carcinoma	2	0	0	0	0
小细胞癌 Small cell carcinoma	8	1	2	1	25
合计 Total number	50 ¹⁾	9	6	3	26
显著性差异 Significant difference					P>0.05

1) 50 例中有 13 例未统计分化程度。
The differentiation of 13 in 50 cases is not analysed with statistics.

表 2 肺癌分化程度与 Ki-ras 点突变的关系
Table 2 The relationship between differentiation degree and point mutation of Ki-ras of human lung cancer

分化程度 Differentiation degree	例数 Case number	突变例数 Mutation number			突变率 Mutation rate %
		Ki-12	Ki-13	重复 Repeat	
低分化 Poor differentiation	14	3	0	0	21
中分化 Moderate differentiation	13	3	2	1	31
高分化 Well differentiation	10	2	2	1	30
显著性差异 Significant difference					P>0.05

的 GTPase 活性丧失。这类突变多为致癌物或放射线引起的结果。ras 基因的激活可发生于肿瘤发展的各个阶段,但更多的报道认为发生于起始阶段^[1,7]。因此,ras 基因点突变的检测很有希望成为肿瘤早期诊断的手段。

我们的结果表明,在人肺癌中 Ki-ras 12 位

的突变率(20%)比 Ki-ras13 位的突变率(12%)高,这与 Rodenhuis 的报道一致,其原因不清楚^[3]。我们还发现 Ki-ras12、13 位的点突变存在于腺癌、鳞癌、小细胞癌及高、中、低分化程度的肺癌中,而且有 3 例肺癌同时兼有 Ki-ras12、13 位点突变, Rodenhuis 发现肺腺癌中约有 30% 发生 Ki-ras 点突变,而在肺癌的其它组织类型未发现 Ki-ras 点突变,这与我们的结果不完全相同^[3]。Stower 在用四硝基甲烷(TNM)诱导大鼠肺癌时,发现所有诱导的肺腺癌、鳞癌、腺鳞癌中均有 Ki-ras 12 位密码的第二个碱基点突变(G → T),使甘氨酸变为缬氨酸^[8]。由于人类接触的致癌物种类较多,因此可能在肺癌各种组织类型发生 Ki-ras 基因的点突变。Nowell 曾提出“肿瘤克隆进化”学说,即肿瘤的演变是由高分化向低分化发展,而且肿瘤为多克隆肿瘤细胞组成^[9],因此 Ki-ras 点突变标志有可能存在于由 Ki-ras 点突变的早期克隆细胞演变的高、中、低分化程度的肿瘤细胞中。由于肿瘤细胞是多克隆的,因此同一例肺癌组织中可能同时存在二种 Ki-ras 点突变,这与 Farr 的报道一致^[10]。

我们对吸烟与 Ki-ras 点突变关系的分析结果表明,吸烟者的 Ki-ras 点突变率比不吸烟者高,虽然可能因病例数不够多而无统计学意义,可扩大病例进一步研究。Rodenhuis^[3]分析了 86 例肺癌的 Ki-ras 点突变与吸烟的关系,认为二者相关。目前虽然已证明吸烟是肺癌主要的致癌因素之一,但纸烟中的致癌物是否直接引起 Ki-ras 点突变而导致肿瘤,尚不清楚。

致谢: 本研究论文中的寡核苷酸探针杂交实验部分是在北京中日友好医院临床医学研究所范慕贞教授实验室完成,并得到许开明同志的大力协助,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- 1 Bos J L, *Mutation Res*, 1988; 195: 255
- 2 Rodenhuis S, van de Wetering M L, Mooi W J *et al.* *New Engl J Med*, 1987; 317(15): 929
- 3 Rodenhuis S, Slebos R J C, Boot A J M *et al.* *Cancer*

- Res, 1988; 48: 5738
- 4 Verlaan-de Vries M, Bogaard M E, van den Elst H *et al. Gene*, 1986; 50: 313
- 5 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J, *Molecular Cloning*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982: 123—124
- 6 McGrath J P, Capon D J, Smith D H *et al. Nature*, 1983; 304(11): 501
- 7 Burmer G C, Rabinovitch P S, Loeb L A, *Cancer Res*, 1989; 49: 2141
- 8 Stowers S J, Glover P L, Reynolds S H *et al. Cancer Res*, 1987; 47: 3212
- 9 俞孝庭著. 肿瘤病理学基础. 上海: 上海科学技术出版社, 1986: 121—124
- 10 Farr C J, Saiki R K, Erlich H A *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 1629

MUTATION OF Ki-ras ONCOGENE IN HUMAN LUNG CANCER DETECTED BY POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR) AND OLIGONUCLEOTIDE HYBRIDIZATION

Qin Yang Sun Zhilin Zhao Jiansheng Sun Ning
(Dept. of Biochemistry, West China University of Medical Sciences)

Bu Hong Liu Kaifeng
(Dept. of Pathology, West China University of Medical Sciences)

ABSTRACT

The frequency of oncogene Ki-ras12 (Val), Ki-ras13 (Cys) mutation was studied in paraffin embedded sections obtained from 50 human lung cancer by *in vitro* amplification of target sequences via polymerase chain reaction (PCR) and selective oligonucleotide hybridization. 13 samples (26%) contained Ki-ras mutation. 3 carcinomas exhibited 2 distinct Ki-ras mutation. The Ki-ras mutation was present in adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, adenosquamous carcinoma, well differentiated, moderately differentiated, poorly differentiated human lung cancers.

Key words Human lung cancer, Ki-ras mutation, PCR

不吸水链霉菌葡萄糖异构酶的物化表征*

李小平 黄友梅

张峰 苏普

(中国科学院兰州化学物理研究所, 兰州 730000)

(中国农业科学院兰州中兽医研究所, 兰州 730050)

提 要

葡萄糖异构酶是一种催化葡萄糖异构为果糖的酶。本文用紫外吸收光谱、红外光谱、氨基酸组分分析、聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、超薄

* 国家自然科学基金资助课题。

收稿日期: 1991-06-04 修回日期: 1991-09-19