

PCR-RFLP 方法测定 ras 癌基因点突变*

王俊茹** 邓国仁 刘为纹** 吕有勇 李文梅

(北京市肿瘤防治研究所, 北京 100034)

提 要

曾使用 PCR-RFLP 方法分析过 c-Ha-ras 癌基因第 12 密码子的点突变。因 N-ras 基因第 12 位密码子、K-ras 基因第 12 和 13 位密码子无已知的限制性内切酶的酶切位点, 不能使用 PCR-RFLP 方法分析这些位点的突变。在 PCR 引物的 3' 端引入一个误配的碱基使之正好成为某限制性内切酶的酶切位点, 这样便能使用 PCR-RFLP 技术分析 c-Ha-ras 基因第 61 位、N-ras 基因第 12 位、K-ras 基因第 12 和 13 位密码子的点突变。

关键词 ras 基因, 点突变, PCR, RFLP

目前已在多种人类肿瘤中发现有 ras 癌基因的激活, 激活的主要方式是点突变^[1,2]。点突变常发生在第 12 位、13 位或 61 位密码子^[3]。点突变的测定方法有多种^[4-9], 但均需要使用同位素。实验周期从数周到长达数月, 限制了人们对肿瘤组织中 ras 癌基因点突变的研究。我们已使用 PCR-RFLP (聚合酶链反应-限制性片段长度多态性) 法分析了 c-Ha-ras 癌基因第 12 位密码子的点突变^[10]。其它如 N-ras 癌基因第 12 密码子、K-ras 癌基因第 12 和 13 位密码子均无已知的限制性内切酶的酶切位点, 不能进行 PCR-RFLP 分析。本文在设计 PCR 引物时引入了一个误配的碱基, 使之成为某限制性内切酶的酶切位点, 使我们可以分析上述位点的点突变。

1 材料和方法

1.1 PCR 引物的设计

1.1.1 分析 c-Ha-ras 癌基因第 12 密码子点突变引物

c-Ha-ras 癌基因第 12 位密码子前两个核苷酸和第 11 位密码子的后两个核苷酸(CCGG)正好是限制性内切酶 Hpa II 或 Msp I 的酶

切位点。以第 12 位密码子为中心设计两个引物。PC1A 的序列为自 c-Ha-ras 基因第 12 密码子算起正链上游非编码区第 52—71 核苷酸之间的序列; PC2B 为负链第 12 密码子突变位点下游第 45—66 核苷酸之间的序列, 扩增的片

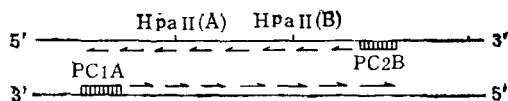


图 1 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变分析引物设计原理

HpaII (A) 是内对照酶切位点
HpaII (B) 是第 12 位密码子酶切位点

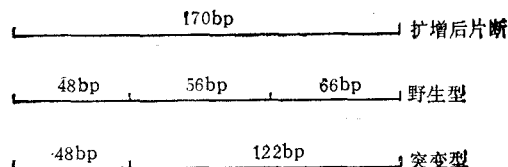


图 2 PCR-RFLP 法分析 c-Ha-ras 癌基因第 12 位密码子点突变原理

* 国家“863”高技术研究发展计划生物技术领域资助项目。

** 第三军医大学第一附属医院消化科, 重庆 630038。
收稿日期: 1991-12-29 修回日期: 1992-03-04

段中包括另一个 CCGG 的酶切位点, 作为内对照(图 1, 图 2)。

1.1.2 分析 c-Ha-ras 基因第 61 位密码子点突变引物

c-Ha-ras 基因第 61 位密码子和第 60 位密码子第三个核苷酸及第 62 位密码子第一个核苷酸 CCAGG 正好是限制性内切酶 Bst NI 的酶切位点, 以此位点为中心设计两个引物。PC3 为正链的引物; PC4 为负链的引物。

1.1.3 分析 K-ras 癌基因第 12 位和 13 位密码子点突变的引物

K-ras 基因第 12 位密码子无限制性内切酶的酶切位点, 不能进行 PCR-RFLP 分析。我们根据在引物的 3' 端有错配的碱基仍可进行 PCR 扩增的原理^[11], 在设计正链引物 PC7 时, 将第 11 位密码子 GCT 中的 G 改为 C, 这样第 11 位和第 12 位密码子构成了 CCTGG——Bst NI 的酶切位点。在负链 PC8 引物的 3' 端也设计了一个错配的碱基, 使之成为 BstNI 的酶切位点, 将此点作为内对照。

K-ras 基因第 13 位密码子的突变常发生在第 2 个碱基由 G→T 转换^[12], 这样 K-ras 基因第 12 位和第 13 位的前两个核苷酸构成 GGTGT——HphI 的酶切位点。用 PC 7 和 PC8 引物扩增后 HphI 酶消化, 如无突变不能被酶切; 如有突变形成 114bp 和 43bp 两个片

段(图 3, 图 4)。

1.1.4 分析 N-ras 基因第 12 位密码子点突变的引物

N-ras 基因第 12 位密码子也无限制性内切酶的识别位点, 在设计引物时我们引入了一个错配的碱基, 使第 11 和 12 位密码子构成 CCAGG——Bst NI 的识别位点。PC9 的序列为 N-ras 基因第 12 位密码子正链上游第 1 至 20 核苷酸之间的序列; PC10 为第 12 位密码子负链下游第 59 至 78 核苷酸之间的序列。

1.2 PCR 引物的合成

PCR 引物由北京大学生命科学中心合成。

1.3 PCR-RFLP 方法

PCR 方法参照 Saiki 法^[13,14]进行。将 PCR 扩增的产物用相应的限制性内切酶消化, 酶解产物用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离分析。

1.4 组织 DNA 的提取

新鲜胃癌组织 DNA 按 Shih 法^[15]进行; 血液中白细胞 DNA 按 Maniatis 法^[16]提取; 石蜡包埋组织 DNA 按 Dubeau^[17]和 Roger^[18]方法提取。

1.5 含 c-Ha-ras 基因的质粒

含原癌基因的质粒 pbcN1 为美国国立癌症研究所 Barbacid 博士赠送; 含第 12 位密码子点突变的 c-Ha-ras 基因质粒 pGC 6.6 为邓国仁等从 BGC 823 胃癌细胞 DNA 克隆出的重组质粒^[19]。

1.6 DNA 聚合酶及限制性内切酶

Taq DNA 聚合酶, 限制性内切酶 HpaII, MspI, BstNI, HphI 购于美国 BRL 公司和中國医学科学院友谊公司。

2 结 果

2.1 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变分析

2.1.1 PCR-RFLP 方法可靠性分析

2.1.1.1 内对照的设立 以往用于分析 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变的引物其扩增片段中无内对照^[10]。使用本实验设计的引物扩增的片段中有一个内对照, 如果第 12 位密码

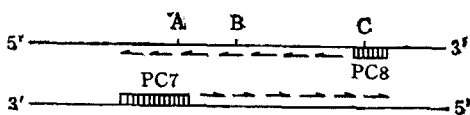


图 3 K-ras 基因第 12 和 13 位密码子点突变分析引物设计原理

A. 第 12 位密码子酶切位点; B. 第 12 位密码子内对照位点; C. 第 13 位密码子酶切位点

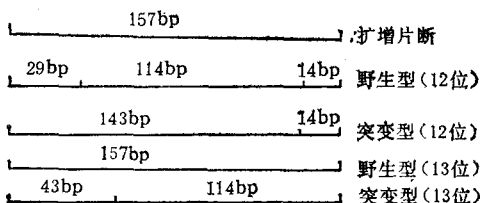


图 4 PCR-RFLP 法分析 K-ras 基因第 12 和 13 位密码子点突变原理

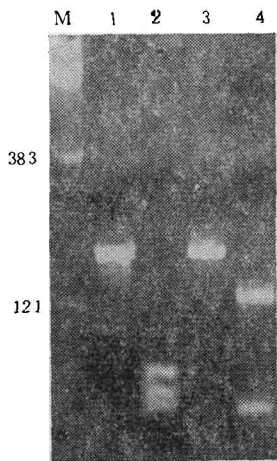


图 5 含 c-Ha-ras 基因质粒的 PCR-RFLP 分析

M: pBR322 用 BstNI 酶切后片段;
1: pbc N1 扩增后片段;
2: pbc N1 扩增后酶切片段;
3: pGC 6.6 扩增后片段;
4: pGC 6.6 扩增后酶切片段

子没有被酶切,而内对照的位点被切了,证实有突变;如第 12 位没被切、而内对照的位点也没被切,说明酶或酶切体系有问题,这样防止过高估计突变率的可能性。

2.1.1.2 含 c-Ha-ras 基因质粒的 PCR-RFLP 分析 质粒 pbcN1 中的 c-Ha-ras 基因是正常 ras 基因,可被 Hpa II 或 Msp I 酶解,故作为点突变分析的阴性对照;PGC 6.6 中的 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子是突变型的,不能被 Hpa II 或 Msp I 酶切,作为点突变的阳性对照(图 5)。

2.1.1.3 正常人白细胞 DNA 的 PCR-RFLP 分析 10 例正常人白细胞 DNA 使用 PC1A 和 PC2B 扩增后, HpaII/MspI 酶切,

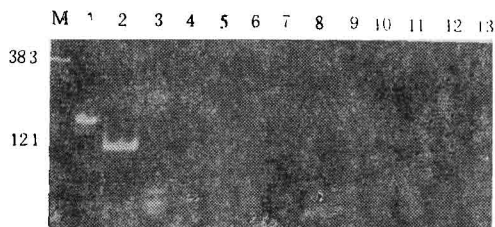


图 6 正常人白细胞 DNA 使用 PCR-RFLP 方法分析 c-Hr-ras 第 12 密码子

M: pBR322 用 BstNI 酶切产物; 1: 扩增后片段;
2: pGC 6.6 酶切后; 3: pbc N1 酶切后; 4-12:
正常人白细胞 DNA 扩增片段酶切后

内对照和第 12 位密码子位点全被切开, 形成 66bp, 56bp 和 48bp 三个片段(图 6)。

2.1.2 胃癌组织中 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变分析

使用 PCR-RFLP 方法分析了 42 例石蜡包裹的胃癌组织 DNA, 发现 14 例有 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子的点突变(图 7)。

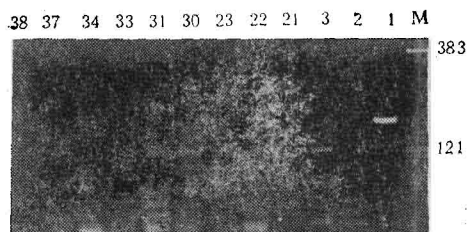


图 7 胃癌组织中 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变分析

M: pBR 322 用 BstNI 酶切产物; 1: PCR 扩增产物; 2: pbc N1 酶切产物; 3: pGC 6.6 酶切产物;
21,23,33,37,38 为野生型; 22,30,31,34 为突变型

2.2 c-Ha-ras 基因第 61 位密码子的 PCR-RFLP 分析

使用 PC 3 和 PC 4 扩增的片段为 95bp, Bst NI 酶切后, 全部形成 60bp, 20bp, 15bp 三个片段。

2.3 K-ras 基因第 12 和 13 位密码子点突变的 PCR-RFLP 分析

用 PC7 和 PC8 扩增的片段长 157bp, 经 BstNI 酶切后, 野生型形成 114bp, 29bp, 14bp 三个片段, 突变型形成 143bp 和 14bp 两个片段。42 例胃癌组织中两例有 K-ras 基因第 12 位密码子的突变, 未发现第 13 位密码子的点突变。

2.4 N-ras 基因第 12 位密码子点突变的 PCR-PFLP 分析

使用 PC9 和 PC10 扩增的片段为 98bp, 野生型酶切后形成 79bp 和 19 bp 两个片段; 突变型为 98bp。42 例胃癌组织中未见有点突变。

3 讨 论

最初测定 ras 癌基因点突变的方法是根据

ras 基因转化 NIH/3T3 细胞株的能力^[4,5]。这种方法需提取肿瘤细胞 DNA, 转染 3T3 细胞。作为从肿瘤细胞中鉴别、分离活化的 ras 基因这种方法是必需的, 但费时、不适合数量较大样品的检测; 寡聚核苷酸探针杂交的方法需合成十几种以 ras 基因突变位点为中心的 19 或 20 个核苷酸序列, 并以此为探针和琼脂糖所分离的 DNA 或 PCR 扩增的 DNA 进行杂交^[6,7]; 限制性片断长度多态性分析是根据 ras 基因的点突变可引起某一区域的限制性内切酶识别位点的改变, 用适当的酶切时, 突变的等位基因产生与正常等位基因不同长度的片段^[8]。但不是所有 ras 基因点突变都改变了限制性内切酶的识别位点, 故有很大的局限性; 此外还有 RNA 酶 A 错配清除法^[9]、DNA 序列分析等。这些方法均需使用同位素, 实验周期较长, 因而限制了人们对肿瘤组织中 ras 基因点突变的研究。PCR-RFLP 方法不需使用同位素, 可在 2—3d 内得到结果。

使用 PCR-RFLP 方法可测定 c-Ha-ras 基因第 12 位和 61 位密码子的点突变。在设计 N-ras 基因第 12 位、K-ras 基因第 12 和 13 位密码子正、负链引物时引入了一个误配的碱基, 使之正好成为 Bst NI 的识别位点。这样可以通过 PCR-RFLP 方法检测上述位点的突变。

PCR-RFLP 方法使用的试剂价格低廉以及较短的实验周期使我们可对数量较大的样品进行检测, 以探索 ras 基因点突变和肿瘤发生、发展的关系。这对基础理论研究和临床研究均有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Barbacid M. ras Genes. *Ann Rev Biochem.* 1987; **56**: 779
- 2 Barbacid M. ras Oncogene: their role neoplasia. *European J Clin Invest*, 1990; **20**: 225
- 3 Bos J L. ras Oncogenes in human cancer. *Cancer Res*, 1989; **49**: 4682
- 4 Krontiris T, Cooper G M. Transforming activity in

- human tumor DNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; **78**: 1181
- 5 Perucho M, Goldfarb N, Shimizir K *et al.* Human tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes. *Cell*, 1981; **27**: 467
- 6 Bos J L, Wies M V, Janson A M *et al.* Three different mutation in codon 61 of human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotides hybridization *Nucleic Acid Res*, 1984; **12**: 9155
- 7 Vertlaan-de Vries M, Bogaard M E, Elst H V T *et al.* A dot blot screening procedure for mutated ras gene using synthetic oligo-deoxynucleotides. *Gene*, 1986; **50**: 313
- 8 Muchel R J, Khoury G, Lebowitz P *et al.* The human c-Ha-ras-1 oncogene: a mutation in normal and neoplastic tissue from the same patient. *Science*, 1983; **219**: 853
- 9 Winter E. A method to detect and characterise point mutation in transcribed genes amplification and overexpression of the mutant c-Ki-ras allele in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; **84**: 4974
- 10 Deng Guoren. A sensitive non-radioactive PCR-RFLP analysis for detecting point mutations at 12th codon of oncogene c-Ha-ras in DNA of gastric cancer. *Nucleic Acid Res*, 1988; **16**: 6231
- 11 Cohen J, Levinson A. A point mutation in the last intron responsible for increased expression and transforming activity of the c-Ha-ras oncogene. *Nature*, 1988; **334**: 119
- 12 Bos J L. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Res*, 1988; **195**: 225
- 13 Saiki R K, Sharf S, Faloaa F *et al.* Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985; **230**: 1350
- 13 Saiki R K, Sharf S, Faloaa F *et al.* Enzymatic amplification of DNA polymerase. *Science*, 1988; **239**: 487
- 15 Shih C, Weinderg R A. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. *Cell*, 1982; **29**: 161
- 16 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Isolation of DNA from mammalian cell. *Molecular cloning*. Second edition, New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; 9.16—9.19
- 17 Dubean L, Chandler L A, Gralow J R *et al.* Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res*, 1985; **46**: 2964
- 18 Roger B B, Alpert L C, Hine E A S *et al.* Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. *Am J Pathology*, 1990; **136**: 541
- 19 Deng G, lu Y, Shen S *et al.* Activated c-Ha-ras oncogene with a guanine to thymine transversion at the twelfth codon in a human stomach cancer cell line. *Cancer Res*, 1987; **47**: 3195