

人癌基因N-ras的限制性片段长度多态性

南京铁道医学院 高翼之 张丽珊 张 芹 黄 鹰 王世浚

【摘要】应用3种人癌基因N-ras探针分别与经5种限制酶消化的肝癌组织与正常组织DNA作分子杂交,发现11种未见报告的杂交片段。它们可作为遗传标记,在探查致癌的家族素因以及肿瘤的遗传易感性等研究中发挥作用。

关键词: 癌基因; 限制性片段长度多态性

人癌基因的研究已日益成为当今肿瘤分子生物学研究的主要潮流。1985年,顾健人等更证明N-ras是人原发性肝癌、肝癌细胞系7402和髓细胞白血病细胞系K562的转化基因之一^[1]。

70年代末建立的基因研究重要工具——限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP),即经限制酶消化后所呈现的DNA片段长度多态性——在80年代已充分展示出它作为遗传标记的广阔应用范围。在肿瘤研究中,RFLP已提供了探查许多基本问题,包括致癌的家族素因与肿瘤的遗传易感性、癌基因定位、肿瘤流行病学等的新颖手段。c-abl等的RFLP研究已见报告。本文报告人癌基因N-ras的RFLP,为进一步研究N-ras基因及其与家族性肿瘤的关系提供基础。

材料和方法

一、标本来源

1. 江苏省启东肝癌防治所提供的当地肝癌患者手术切除的肝癌组织以及肝癌患者的外周血。

2. 启东肝癌所提供的当地肝癌高发家系成员的外周血。

3. 启东肝癌所提供的当地连续两代无肝癌家系成员的外周血。

4. 南京铁道医学院附属医院提供的人工流产胎儿的绒毛组织。

二、限制性核酸内切酶

1. Eco RI

2. Hind III

3. Bam HI

4. Pst I

5. Msp I

以上限制酶均为中国医学科学院基础医学研究所产品。

三、N-ras探针

1. 5'-0.9kb Hind III-Hind III探针(Wigler L段)。

2. 5'-0.9kb Pvu II-Pvu II探针。

上述两种探针系与质粒pBR322构建成重组DNA后转入大肠杆菌HB101菌株。

3. 3'-1.5kb Pvu II-Pvu II探针p52C-0该探针系与质粒pUC9构建成重组DNA后转入大肠杆菌HB101菌株。

三种探针均为上海市肿瘤研究所转赠。

四、DNA分子杂交的过程

用常规方法提取肝癌组织、外周血或绒毛组织的DNA,分别用选定的限制性核酸内切酶消化;每份样品取10ug DNA,酶用量为4-6 U/ug DNA。然后,用0.8%琼脂糖凝胶电泳分离(25V, TBE缓冲系,过夜)。凝胶经变性后,用Southern吸印法将单链DNA转移到混合纤维素酯微孔滤膜(上海新亚净化器件厂产品)上,60℃烘干4小时,固定。

将带有N-ras片段的重组质粒转化到大肠杆菌中,在LB培养液中扩增,经提取、纯化,获得大量重组质粒DNA。然后,用相应的限制性核酸内切酶消化,分离出探针DNA。用电洗脱入透析袋的方法或用低熔点琼脂糖凝胶的方法回收探针DNA片段,经纯化后溶于TE溶液中。在DNA分子杂交前,用切口转移(nick translation)法以 α -³²P-dCTP(Amersham产品)标记上放射性同位素³²P,用Sephadex G-50柱分离除去未参入的 α -³²P-dCTP和其它单核苷酸,收集已标记的DNA探针,用液体闪烁测定比放射活性为 $0.5-1 \times 10^6$ cpm/ug。

将转移后的滤膜装入塑料袋中,加入预杂交液(5xSSC, 5xDenhardt's液, 100ug/ml变性处理后的鲑精DNA),于68℃水浴中振摇预杂交4小时以上;吸出预杂交液,加入杂交液(在预杂

交液的基础上添加 ^{32}P 标记的变性探针DNA ($0.5-1 \times 10^6 \text{cpm/ml}$), 于 68°C 水浴中振摇杂交48小时。杂交后的膜用 $2 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$, $0.1 \times \text{SSC}/0.1\% \text{SDS}$, $0.1 \times \text{SSC}$ 分别洗涤后放入有增感屏的X光暗盒内于 -70°C 放射自显影4—8日。用入DNA/Hind III作为标准, 测定杂交片段长度。

结果

一、15例绒毛组织和4例肝癌组织DNA经Eco RI消化后与Wigler L段杂交, 其杂交片段见表1。

表1. Eco RI消化后与Wigler L段杂交的结果

DNA来源 (例数)	杂交片段长度(kb)
绒毛 (8)	7.8
绒毛 (6)	12.0
绒毛 (1)	7.8; 4.0
肝癌组织 (4)	7.8

二、7例绒毛组织、14例肝癌组织、8例外周血白细胞DNA经Eco RI消化后与p52C—杂交, 其杂交片段见表2。

表2. Eco RI消化后与p52C—杂交的结果

DNA来源 (例数)	杂交片段长度(kb)
绒毛 (6)	7.0; 12.8
绒毛 (1)	7.0
肝癌组织 (14)	7.0
患者外周血 (3)	7.0
亲属外周血 (3)	7.0
对照组外周血 (2)	7.0

三、11例绒毛组织、15例肝癌组织DNA经Hind III消化后与p52C—杂交, 其杂交片段见表3。

表3. Hind III消化后与p52C—杂交的结果

DNA来源 (例数)	杂交片段长度(kb)
绒毛 (6)	8.6
绒毛 (5)	8.6; 5.2
肝癌组织 (9)	8.6; 5.2
肝癌组织 (6)	8.6; 6.5

四、6例绒毛组织、10例肝癌组织DNA经Bam HI消化后与p52C—杂交, 只出现8.4kb的杂交片段。

五、2例绒毛组织、6例肝癌组织DNA经Pst I消化后与5'—0.9kb Pvu II—Pvu II探针杂交, 只出现3.4kb的杂交片段。

六、2例绒毛组织、6例肝癌组织DNA经Msp I和Bam HI消化后与p52C—杂交, 均出现2.6kb和2.4kb的杂交片段。

讨论

1983年, 美国冷泉港实验室Wigler小组报告了人神经母细胞瘤细胞系SK—N—SH转化基因N—ras的限制性图谱(见图1, 注意上方图中5'与3'的走向与下方图即习惯表述方式不同)^[2]。同年, 美国麻省理工学院Weinberg小组报告3人早幼粒细胞白血病细胞系HL—60转化基因N—ras的限制性图谱(见图2, 注意图中p52C—探针的位置)^[4]。1984年, 英国癌症研究中心的Hall小组报告了人纤维肉瘤细胞系HT1080转化基因N—ras

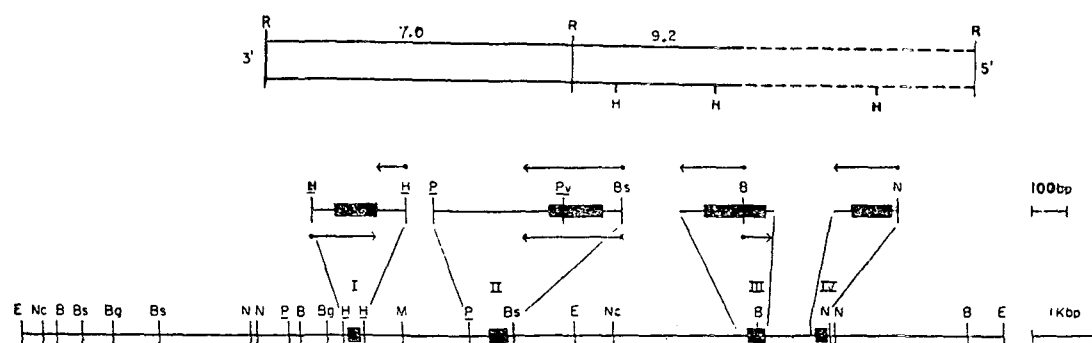


图1. SK—N—SH转化基因N—ras的限制性图谱。B, Bal I; Bg, Bgl II; Bs, BstE II; H, Hind III; M, Mst II; N, Nde I; Nc, Nco I; P, Pst I; Pv, Pvu II; E, Eco RI; R, Eco RI。图中凡下有横线的限制酶, 其切点是不完全的(仿Shimizu等⁽⁸⁾以及Taparowsky等⁽⁵⁾)

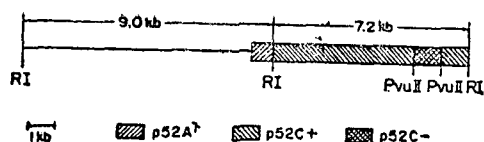


图2 HL-60转化基因N-ras的限制性图谱。

RI, Eco RI (仿Murray等) (4)

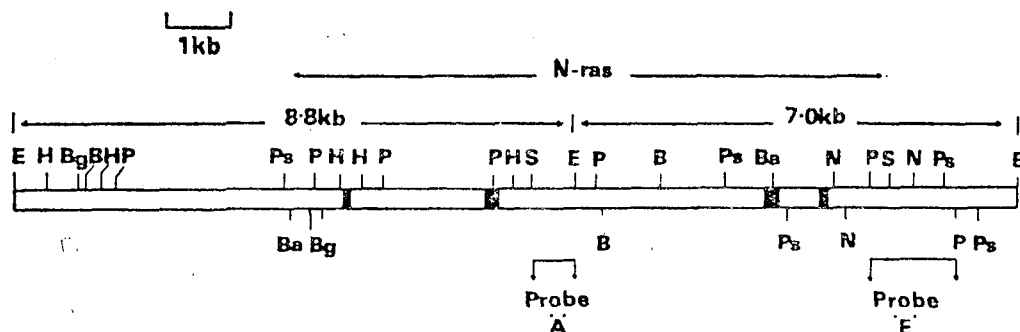


图3 从HT1080分离所得N-ras的限制性图谱。B, Bam HI; Ba, Bal I; Bg, Bgl II; E, Eco RI; H, Hind III; N, Nde I; P, Pvu II; Ps, Pst I; S, Sst I; Sa, Sal I。除8.8kb段的Pst I, Nde I与Bal I以及7.0kb段的Bal I以外,该图谱是完全的。实心块表示4个外显子。(仿Brown等) (6)

9.2kb和7.0kb; 9.0kb和7.2kb; 8.8kb和7.0kb。可是,我们用Wigler L段探针(其相应位置在N-ras的左段,包括第1个外显子在内的区段)探查N-ras左段的RFLPs,在19例不同来源的DNA标本中获得的杂交片段,竟无1例出现上述9.2kb或9.0kb或8.8kb长度的片段,而出现了7.8kb、12.0kb、4.0kb等3个未见报告的特异等位片段;用p52C-探针(其相应位置在N-ras的右段)探查N-ras右段的RFLPs,在29例不同来源的DNA标本中,虽然都出现上述7.0kb的片段,但有6例来自胎儿绒毛DNA的实验结果显示为杂合子,出现了未见报告的12.8kb长度的等位片段。显然,单个核苷酸对的置换和一段序列的丢失或插入,都有可能导致Eco RI切点的丢失或增加,从而出现我们首报的左段7.8kb、12.0kb、4.0kb和右段12.8kb等N-ras对Eco RI的等位片段。

二、三个图谱中关于Hind III在N-ras上的切点,只有图3宣称是完全的,即5个切点。我们使用的p52C-探针,其相应位置已在第5个即最后一个Hind III切点的下游。因此,用p52C-与经Hind III消化的人DNA杂交,其杂交片段长度不能从限制性图谱中看出。幸而,Brown等在报告该图谱时说明:“7.0kb的Eco RI片段是分离

的限制性图谱(见图3) [6]。这三个限制性图谱可作为我们讨论的对照。

一、Eco RI在N-ras上的切点,三个限制性图谱是一致的,即:Eco RI在N-ras的中部有1个切点,在其5'端与3'端的侧翼序列中各有1个切点,从而将N-ras分为5'侧的左段和3'侧的右段;各实验室报告长度大致相同,分别为:

自一段11kb的Hind III片段。” [6] 这就意味着该图谱中最后一个Hind III切点与3'端N-ras基因边界之外的一个Hind III切点之间的长度为11kb,亦即我们应当获得11kb长度的杂交片段。可是,事实上我们的实验结果是8.6kb、5.2kb、6.5kb等三个等位片段。

全部标本无一例外地出现8.6kb的杂交片段,按图3所示限制性图谱可以推断,或是在N-ras基因3'端Eco RI位点的下游0.6kb左右处因核苷酸对的置换而出现一个Hind III切点,或是在该处插入一段含Hind III切点的片段,或是丢失一段2.4kb的片段,都可能产生8.6kb的片段。

5.2kb和6.5kb片段的出现,最大的可能性是在图3中N-ras基因3'端Eco RI位点的上游分别约4.6kb处和5.9kb处因单个核苷酸对的置换而导致新的Hind III识别序列和切点的产生,新切点距上述推定的3'端Eco RI位点下游0.6kb左右处那个Hind III切点的距离恰好分别为5.2kb和6.5kb。基本上可以排除片段插入或片段丢失的可能性。因为,在这段范围内发生片段的插入或丢失,必将引起N-ras基因经Eco RI消化后杂交片段长度的变化,而事实上我们用p52C-探针与经Eco RI消化的人DNA杂交,全部稳定地出现

7.0kb片段(见表2)。

三、三个图谱中只有图3的图谱标明Bam HI在N-ras上的切点,在近5'端与近3'端各有1个。由于第2个Bam HI切点的下游再也没有另一个切点,因此不能从图谱中看出与p52C-探针杂交后应有的杂交片段长度,迄今也未见文献报告。所以,我们虽然没有发现N-ras对Bam HI的限制性片段长度多态性,但也获得了首报的8.4kb杂交片段长度,并推定在3'端Eco RI位点下游2.8kb处有-Bam HI切点。

四、图1和图3两个限制性图谱中Pst I的切点都被宣称是不完全的,但图1比图3更接近完全,因为它在Eco RI切成的N-ras左段中有两个相距2.6kb的切点。我们的实验结果只获得了3.4kb长度的杂交片段,与2.6kb不符。更令人困惑的是我们用Wigler L段探针与经Eco RI消化的人DNA杂交,已经探查到N-ras基因的5'侧序列歧异较大;但用5'-0.9kb Pvu II-Pvu II探针(其位置在第1外显子上游和下游2个Pvu II切点范围内)与经Pst I消化的人DNA杂交,却稳定地出现3.4kb的杂交片段。

五、三个图谱中都没有标明Msp I的切点。从我们的实验结果可以推断:N-ras基因3'侧相应于p52C-探针位置5kb左右的范围内有3个Msp I切点,将这段包括p52C-探针位置在内的5kb片段切成2.6kb和2.4kb两段。

六、总计我们获得的未见报告的等位片段有:对Eco RI的左段7.8kb、12.0kb、4.0kb,右段12.8kb;对Hind III的3'侧8.6kb、5.2kb、6.5kb;对Bam HI的3'侧8.4kb;对Pst I的5'侧3.4kb;对Msp I的3'侧2.6kb、2.4kb。由于我们制备的人DNA均取自中国汉族人的肝癌

组织或正常组织而非国外实验室采用的肿瘤细胞系,所以,这些特异的等位片段是否反映了组织细胞DNA与细胞系细胞DNA的差异,或者,它们是否可能为中国汉族人乃至黄种人所特有,需待扩大标本数量才能得出结论。尽管如此,这些特异的等位片段作为遗传标记,结合家系分析,仍然能在用RFLP连锁分析探查肿瘤易感性以及肿瘤分子生物学的其它研究中发挥作用。

(本研究得到江苏省卫生厅的资助,特此致谢)

参考文献

1. 顾健人,等.人原发性肝癌及7402细胞株和髓细胞白血病细胞株(K562)的癌基因(转化基因)的共同属性——N-ras基因.中国科学B辑,1985,452—457
2. Shimizu K, et al. Isolation and preliminary characterization of the transforming gene of a human neuroblastoma cell line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80:383—387
3. Shimizu K, et al. Three human transforming genes are related to the viral ras oncogenes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1983, 80:2112—2116
4. Murray MJ, et al. The HL-60 transforming sequence: A ras oncogene coexisting with altered myc gene in hematopoietic tumors. Cell, 1983, 33:749—757
5. Taparowsky E, et al. Structure and activation of the human N-ras gene. Cell, 1983, 34:581—586
6. Brown R, et al. Mechanism of activation of an N-ras gene in the human fibrosarcoma cell line HT1080. The EMBO J, 1984, 3:1321—1326

颅内原发性恶性淋巴瘤1例

临沂地区医院神经外科

蒋洪涛 费 昶

患者男,38岁。因头痛呕吐,双目视物不清一个月于1985年11月30日收住院。查体:神志清,双眼眼底水肿,视盘边界不清,生理凹陷消失,静脉充盈。并有渗出。余颅神经正常。四肢感觉肌力均正常。脑血管造影示右额占位性病变。1985年12月9日行右额开颅,见肿瘤位于右额极近中线处,暗红色,质地稀软如烂酱状不能成形,部分有囊变,约

7×7×6公分大小,并经大脑镰下侵入对侧。术中切除右额肿瘤,镰下对侧肿瘤因位置过深仅做部分切除。术后切口一期愈合,出院时病人生活能自理。病理报告:原发性恶性淋巴瘤。术后未做化疗及放疗,随访一年后死亡。

(注:该患者病理切片经沈阳军区总医院病理科黄文清教授会诊,诊断:原发性恶性淋巴瘤。特此致谢。)