DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.02.001

论著

ras 癌基因点突变的研究

王俊茹 邓国仁* 刘为纹 吕有勇* 王 冰* (第三军医大学西南医院消化科)630038

提 要 N-ras 基因第 12 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。我们在 PCR 引物的 3'端引入了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,因而能使用 PCR-RFLP 方法分析上述位点的突变。本文使用 PCR-RFLP 方法分析了 c-Ha-ras 基因第 12 和 61 位、N-ras 基因第 12 位、K-ras 基因第 12 位和 13 位密码子的点突变。

关键词 致癌基因;点突变;PCR-RFLP 方法

ras 基因家族是由 c-Ha-ras、N-ras、K-ras 基因组成。目前已在多种人类肿瘤发现 ras 基因的点突变。点突变常发生在第 12 位、13 位和 61 位密码子[1,2]。我们已使用 DNA 多聚酶链式反应(PCR)—限制性片断长度多态性(RFLP)法分析了 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子的点突变,此次在设计 PCR 引物时设立了内对照;此外,N-ras 基因第 12 位密码子、K-ras 基因第 12 位和 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。这样使我们可以分析 c-Ha-ras 基因第 12 位和 61 位、N-ras 基因第 12 位、K-ras 基因第 12 位和 13 位密码子的点突变。

1 材料及方法

1.1 PCR 引物的设计

1.1.1 分析 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变引物:c-Ha-ras 基因第 12 位密码子前两个核苷 GG 和第 11 位密码子的后两个核苷酸 CC 构成了 CCGG—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 位密码子算起正链上游非编码区第 52～71 个核苷酸之间的序列;PC2B 为负链第 12 位密码子突变位点下游第 45～66 个核苷酸之间的序列。使用此对引物扩增片断为 170bp、扩增的片断中存在着另一个 CCGG 的酶切位点作为内对照。如果第 12 位密码子无点突变,被酶切成 66bp、56bp 和 48bp 三个片断;如果有点突变,切成 122bp 和 48bp 两个片断(图 1、图 2)。

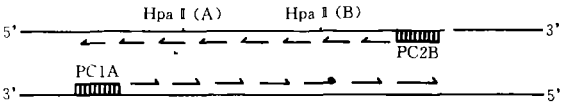


图 1 c-Ha-ras 基因第 12 密码子点突变分析引物设计原理

Fig 1 Schematic diagram of designing the primers for analysing the point mutation at codon 12 of c-Ha-ras gene

Hpa Ⅱ (A) is the control cleavage site; Hpa Ⅱ (B) is the position of codon 12

* 北京市肿瘤研究所

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

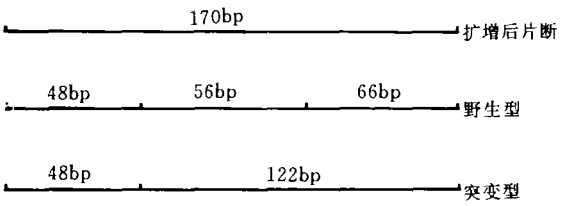


图 2 PCR-RFLP 法分析 c-Ha-ras 基因第 12 位点突变原理

Fig 2 Schematic diagram of analysing the point mutation at codon 12 of c-Ha-ras

The amplified region spanned 157 nucleotides. Amplified normal codon 12 fragments were cleaved twice with the restriction endonuclease Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ. The amplified fragments mutant at either of the first two nucieotides of codon 12 were cleaved only once with Hpa Ⅱ/Msp Ⅰ at control cleavage site

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 CAG 和第 60 位密码子最后一个核苷酸 C 以及第 62 位密码子第一个核苷酸 G 构成 CCAGG—限制性内切酶 BstN Ⅰ的酶切位点。PC3 的序列为自第 61 位密码子算起正链上游第 15～34 个核苷酸之间的序列；PC4 为负链第 61 位下游 40～60 个核苷酸之间的序列。扩增的片断中有一个内对照。如无突变被酶解为 60bp、20bp 和 15bp；如有突变形成 75bp 和 20bp。

1.1.3 分析 K-ras 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。根据在引物的 3' 端有误配的碱基仍可进行 PCR 扩增的原理[3]，我们在设计引物时将第 11 位密码子第一个碱基引入了一个误配的碱基 C，这样第 11 位和第 12 位密码子构成 CCTGG—BstN Ⅰ的酶切位点。同理在负链 PC8 引物的 3' 端也引入了一个误配的碱基，使之正成为 BstN Ⅰ的酶切位点。如 12 位密码子无突变，扩增的片段被酶切为 114bp、29bp 和 14bp 三个片段；如有突变形成 143bp 和 14bp 两个片段。

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，这样 K-ras 基因第 12 位的 3 个核苷酸和第 13 位的前两个核苷酸构成 GGTGA—Hph Ⅰ的酶切位点。用 PC7 和 PC8 扩增后，Hph Ⅰ酶消化，如无突变仍是 157bp；如有突变形成 114bp 和 43bp 两个片段。

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酶切位点，在设计引物时将 11 位密码子的第一个碱基引入一个误配的碱基 C，使第 11 位和 12 位密码子构成了 CCAGG—限制性内切酶 BstNI 的酶切位点。

1.2 PCR 引物的合成

由北京大学生命科学中心合成。

1.3 PCR-RFLP 分析

PCR 方法参照 Saiki 法[4,5]稍加改进。取约 1μg 的组织 DNA，溶于 60μl PCR 缓冲液（10mM Tris-HCl，50mM KCl，1.5mM MgCl，0.2mM dATP、dGTP、dCTP、dTTP 1μm 引物，1～3μTaq DNA 多聚酶）中，溶液上层加液体石蜡，将试管置于 PCR 扩增仪上，95℃变性 70 s、57℃复性 70 s、72℃延伸 70 s。重复以上循环 30 次。取 10μl 扩增产物用 4%聚丙烯酰胺电泳进行鉴别。如是所需片断，用相应的限制性内切酶消化扩增产物。酶解产物用 4%聚丙烯酰胺电泳分离。

1.4 组织 DNA 的提取

1.4.1 新鲜胃癌组织 DNA 的提取：将 0.5～1g 的组织剪碎，按 Shih 法[6]提取 DNA。

1.4.2 血液中白细胞 DNA 的提取：按 Maniatis 法[7]进行。

1.4.3 石蜡包埋组织中 DNA 的提取[8,9]

1.5 限制性内切酶 Hpa Ⅱ、Msp Ⅰ、BstN Ⅰ、Hph Ⅰ

购于美国 BRL 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 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断长 100bp，其内无内对照。使用本实验设计的引物扩增的片断中有一个内对照，如果第 12 位密码子没有被切动，而内对照的位点被切动了，证实有突变；如第

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

12 位没被切动，而内对照的位点作也没被切动，说明酶或酶切体系有问题. 这样防止过高估计突变的可能性。

2.1.1.2 含 c-Ha-ras 基因质粒的 PCR-RFLP 分析：质粒 pbcNI 中的 c-Ha-ras 基因是正常的 ras 基因，可被 Hpa Ⅱ 或 Msp Ⅰ 酶解，可作为点突变的阴性对照；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 酶解，作为点突变的阳性对照。

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，Hpa Ⅱ /Msp Ⅰ 酶切，内对照和第 12 位密码子位点全被切开，未发现有点突变。

以上这些结果证实 PCR-RFLP 方法的可靠性。

2.1.2 胃癌组织中 c-Ha-ras 基因第 12 位密码子点突变分析：42 例福尔马林固定、石蜡包埋组织 DNA 中，发现 14 例有点突变。

2.2 c-Ha-ras 基因第 61 位密码子点突变分析

使用 PC3 和 PC4 扩增的片段为 95bp，经 BstNI 酶消化后全部形成 66bp、20bp 和 15bp 三个片段，未见有点突变。

2.3 K-ras 基因第 12 位和 13 位密码子点突变分析

用 PC7 和 PC8 扩增的片段长 157bp，经 BstN Ⅰ 酶切后，野生型形成 114bp、29bp 和 14bp 三个片段；突变型形成 143 和 14 个两片段。42 例胃癌组织中两例有 K-ras 基因第 12 位密码子的点突变。第 13 位密码子未发现有点突变。

2.4 N-ras 基因第 12 位密码子点突变分析

使用 PC9 和 PC10 扩增的片段为 98bp，野生型可形成 79bp 和 19bp 两个片段，突变型为 98bp。42 例石蜡包埋的胃癌组织中未见有突变。

3 讨论

最初测定 ras 基因点突变的方法是根据 ras 基因转化 NIH/3T3 细胞株的能力[10]，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、不适合大规模样品的检测；寡聚核苷酸探针杂交的方法需要合成十几种以 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[11]；限制性片段长度多态性分析是根据 ras 基因点突变可引起某一区域的限制性内切酶位点的改变，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[12]。此外还有 RNA 酶 A 错配清除法、DNA 序列分析等。以上方法均需同位素，实验周期从数周到长达数月。试剂价格的昂贵和较长的实验周期限制了对肿瘤组织中 ras 基因点突变的研究。PCR-RFLP 方法不需使用同位素，可在 2～3 d 内得到结果。

N-ras 基因第 12 位密码子、K-ras 基因第 12 位、13 位密码子均无已知限制性内切酶的识别位点，我们在设计上述位点正链和负链的引物时引入了一个误配的碱基，使之正好成为 BstNI 的识别位点，这样可通过 PCR-RFLP 方法检测上述位点的突变。

我们使用 PCR-RFLP 方法测定了 c-Ha-ras 基因第 12 位和 61 位、N-ras 基因第 12 位、K-ras 基因第 12 位和 13 位密码子的点突变。试剂价格的低廉和短的实验周期，使我们可对大量的样品进行检测，以探索 ras 基因点突变和肿瘤发生、发展的关系。这将对基础理论研究和临床研究有十分重要的意义。

参考文献

1. Barbacid M. ras gene. Ann Rev Biochem, 1987; 56:799
2. Bos JL. Ras oncogenes in human cancer. Cancer Res, 1989; 49:4682
3. 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
4. Saiki RK, Sharf S, Falooa F, et al. Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences restriction site analysis for diagnosis of sickle cell ane-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

mia. Science, 1985; 230: 1350
5. Saiki RK, Sharf S. Primer-directed enzymatic amplification of DNA polymerase. Science, 1988; 239: 487
6. Shih C, Weinberg RA. Isolation of a transforming sequence from a human bladder carcinoma cell line. Cell, 1982; 29: 161
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Isolation of DNA from mamalian cell. Molecular coloning. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989: 9.16
8. Dubean L, Chandler LA, Gralow JR, et al. Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. Cancer Res, 1986; 46: 2964
9. Roger BB, Alpert LC, Hine EAS, et al. Analysis of DNA in fresh and fixed tissue by the polymerase chain reaction. Am J Pathology, 1990; 136: 541
10. Krontiris T, Cooper GM. Transformating activity in human tumor DNAs. Proc Natl Acad Sci USA, 1981; 78: 1181
11. Bos JL, Wies MV, Janson AM, et al. Three different mutation in codon 61 of human N-ras gene detected by synthetic oligonucleotides hybridization. Nucleic Acid Res, 1984; 12: 9155
12. Muchel RJ, 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

(收稿: 1992-12-04; 修回: 1993-03-25)

A study on point mutation of ras oncogenes

Wang Junru, Deng Guoren, Liu Weiwen, et al (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical College, 630038, Chongqing)

Abstract It is known that no restriction endonuclease cleavage site exists at 12 codon in N-ras gene and at 12 and 13 codon in K-ras gene. Amismatched base was incorporated at the 3' end primer to creat a kind of restriction endonuclease cleavage site. Then it was possible for us to analyze the point mutation of the above mentioned codons with the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. In this paper, the study of the point mutation at 12 and 61 codon in c-Ha-ras, at 12 codon in N-ras, and at 12 and 13 codon in K-ras was reported.

Key words oncogene; mutation; PCR-RELP

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net