中 国 科 学
1987 年 1 月　　B 辑　　第 1 期

人胃癌细胞株转化基因的克隆和核苷酸序列的分析

邓国仁　吕有勇　陈世明　苗　晶　路桂荣
李　华　蔡　红　徐新来　鄂　征　刘培楠
（北京市肿瘤防治研究所）

摘　　要

本文用人胃癌细胞株 BGC-823 总 DNA 对小鼠及大鼠成纤维细胞进行转染．用分子杂交方法证明大鼠第二轮恶性转化细胞基因组中含有来自人胃癌的转化基因，它与存在于正常细胞中的原癌基因 c-Ha-ras 同源．以 λ 噬菌体 EMBL 3 为载体，构建大鼠第二轮转化细胞基因组文库，以人 Alu 重复序列和 c-Ha-ras 为探针，将人胃癌细胞转化基因 Ha-ras 从文库中克隆分离出．用 M13——双脱氧法测定转化基因第一、第二外显子核苷酸序列．结果表明转化基因除了第一外显子中有一个碱基发生变化外，核苷酸序列与原癌基因完全相同．

近年来，国外报道了利用细胞转染技术从膀胱癌[1-4]、肺癌[5]、结肠癌[6]、乳腺癌[7]等肿瘤组织或细胞株中克隆出转化基因．这些工作对癌变机理的研究起了很好的推动作用．

我们已从胃癌细胞株 BGC-823 中克隆分离出转化基因，用分子杂交法证明它与原癌基因 c-Ha-ras 同源．在此基础上对转化基因的第一、第二外显子及其周围区域进行了核苷酸序列的测定，并将这段序列与存在于正常细胞中的原癌基因 c-Ha-ras 比较，结果表明胃癌转化基因编码区第 35 个核苷酸从原癌基因的 G 变为 T，使基因产物 p21 蛋白第 12 个氨基酸从正常的甘氨酸变为缬氨酸．

一、材料和方法

1. 细胞株　胃癌细胞株 BGC-823，MGC-803，PACM-82 分别由北京医科大学附属人民医院、山东师范学院和北京医科大学附属口腔医学院引入．小鼠及大鼠成纤维细胞系 NIH 3T3 及 Rat1 由上海肿瘤所顾健人、美国 Cornell 大学的 Rocker 和美国麻省理工学院的 Weinberg 赠送．

2. 癌基因、人 Alu 重复序列　含癌基因 c-Ha-ras，v-Ki-ras，N-ras 和人 Alu 重复序列的质粒 pbc-N1，pHiHi-3，pAT 8.8 和 pBLUR 8 分别由 Barbacid，Merck 公司、Hall 和

本文 1986 年 3 月 3 日收到，1986 年 8 月 25 日收到修改稿．

Weinberg 赠送.

3. 各种工具酶 限制性内切酶 BamHI, EcoRI, HindIII, PstI 等购自美国 BRL 公司和 Biolabs 公司.DNA 聚合酶 I 和 T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司.蛋白酶 K, DNA 酶 I 和 RNA 酶 A 从美国 Sigma 公司购入.

4. DNA 序列分析试剂和载体 X-gal,IPTG, 测序反应引物均从美国 BRL 公司购入. ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP 从美国 P-L Biochemicals 公司购入. 载体 M13 mp10 引自美国 Cornell 大学吴瑞实验室.

5. 同位素 [α-^{32}P] dATP (410 Ci/mmol, 1m Ci/ml) 和 [α-^{32}P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10m Ci/ml) 购自英国 Amersham 公司.

6. 细胞培养基 DMEM 培养基从英国 Gibco 公司购入.

7. 载体及宿主菌 基因文库载体 λ 噬菌体 EMBL 3 和宿主大肠杆菌 K802 为 Weinberg 和吴瑞所赠. 制备包装蛋白所用的溶原菌 BHB 2688 和 BHB 2690 由李文裕赠送.质粒宿主菌 HB101, C600, RR1 和 M13 宿主菌 JM101 则分别来自蔡良婉、Barbacid, Weinberg 和吴瑞实验室.

8. 细胞的转染、软琼脂生长试验、裸鼠致瘤试验 细胞和组织高分子量 DNA 的提取参照 Shih 等人的方法[1]. 肿瘤细胞和组织 DNA 对 NIH 3T3 和 Rat1 的转染实验 (磷酸钙沉淀法) 参照 Graham, Copeland 和 Shih 等介绍的方法[8, 9, 1] 软琼脂生长试验参照 Rapaport 的方法[10]. 裸鼠致瘤试验: 在 12 周龄的裸鼠背部皮下接种转化细胞 (4×10^6/只), 对形成的肿瘤进行病理检查.

9. 吸印转移和分子杂交 用 30 U 限制性内切酶 BamHI 或 EcoRI 消化细胞总 DNA 15μg,37℃ 恒温过夜,在 0.8% 琼脂糖凝胶上进行电泳,参照 Maniatis 方法进行吸印转移[11]、缺口翻译[12]和分子杂交[13].

10. 基因组文库的构建和克隆的筛选 参照 Maniatis 方法构建基因组文库[14],载体选用 Frischauf 等创建的 λ 噬菌体 EMBL3[15],包装蛋白的制备及重组 DNA 的包装参照 Enquist 等和 Hohn 的方法[16,17].

用 Benton 等介绍的方法[18],对基因组文库进行平皿扩增,以人 Alu 重复序列和原癌基因 c-Ha-ras 为探针,对噬斑进行原位杂交,找出阳性克隆.

11. DNA 序列分析方法 以噬菌体 M13 mp 10 为载体[19], 用双脱氧核苷酸末端终止法[20]对 DNA 片段进行核苷酸序列的测定.

二、结 果

1. 胃癌 DNA 和转化细胞 DNA 对 NIH 3T3 和 Rat 1 细胞的转染及分子杂交鉴定结果.

取各种胃癌细胞株 DNA 或胃癌实体瘤组织 DNA 75μg 对 1.5×10^6 NIH 3T3 或 Rat1 细胞进行第一轮转染, 同时取胃正常粘膜组织 DNA 和 NIH 3T3 DNA 各 75μg 对 NIH 3T3 或 Rat1 进行转染,作为对照实验,二至三周后出现形态明显改变的转化灶,细胞交叉、重迭生长,密度增大, 形态由梭形变为多角、卵圆形, 折光性增强(图 1). 各种胃癌细胞株及实体瘤组织 DNA 对 NIH 3T3 细胞第一轮转染的转化灶形成率(每微克供体 DNA 每 10^5 受体细胞所形成的转化灶数)比较,见表 1.

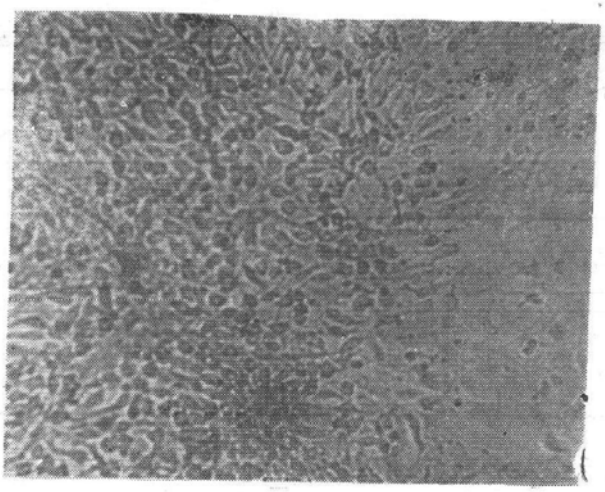


图 1　用胃癌细胞株 BGC-823 DNA 转染大鼠成纤维细胞 Rat 1 形成的转化灶（×420）

表 1　不同胃癌 DNA 转染 NIH 3T3 转化灶形成率的比较

供体 DNA	培养瓶数	转化灶数	转化灶数/μg DNA/10^5 细胞
NIH 3T3	15	12	0.006
正常胃组织	15	3	0.002
BGC-823	34	40	0.017
MGC-803	25	10	0.005
PACM-82	13	14	0.014
胃腺癌组织 1	5	1	0.002
胃腺癌组织 2	5	2	0.004

从表 1 中可以看出，BGC-823 DNA 对 NIH 3T3 的转化率最高．将这些转化灶挑出，扩大培养，提取总 DNA．转化细胞 DNA 用 EcoRI 或 BamHI 酶解后，进行电泳和吸印转移．以人 Alu 重复序列为探针进行分子杂交，同位素放射自显影后所得结果(图 2)说明人 Alu 重复序列已经整合到第一轮转化细胞基因组中．

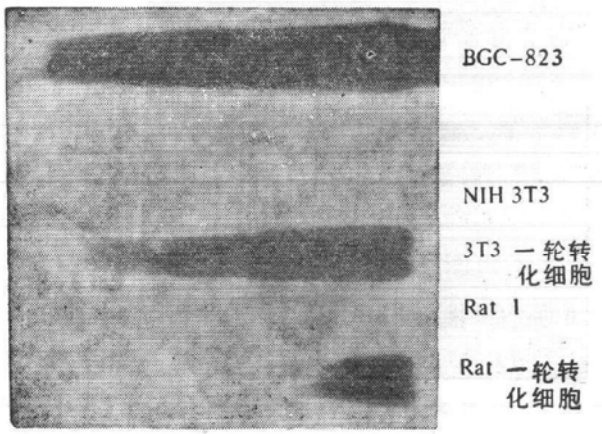


图 2　一轮转化细胞中人 Alu 重复序列的检测

(NIH 3T3，Rat1 和它们相应的一轮转化细胞以及 BGC-823 细胞 DNA 各 10 μg 用 BamHI 酶解后进行电泳、吸印转移和分子杂交．探针：人 Alu 重复序列)

取第一轮转化细胞 DNA 75 μg 对 1.5 × 10^6 NIH 3T3 或 Rat1 细胞进行第二轮转化，二至三周后对转化灶进行计数. 第二轮转化灶的形成率见表 2. 与表 1 相比可以看出，第二轮的转化率比第一轮提高了.

表 2 第二轮转染的转化灶形成率

受体细胞	培养瓶数	转化灶数	转化灶数/μg DNA/10^5 细胞
Rat1	6	58	0.077
NIH 3T3	6	26	0.035

对第二轮转化细胞进行扩大培养，提取总 DNA. 酶解后进行电泳、吸印转移，以人 Alu 重复序列为探针进行分子杂交，放射自显影结果 (图 3) 表明第二轮转化细胞中仍保留来自胃癌细胞的 DNA 片段. 其中 Rat3-3 DNA 与 Alu 探针杂交得到的是单一的区带，说明 Rat3-3 细胞经过两轮转染只保留了个别来自胃癌细胞的基因.

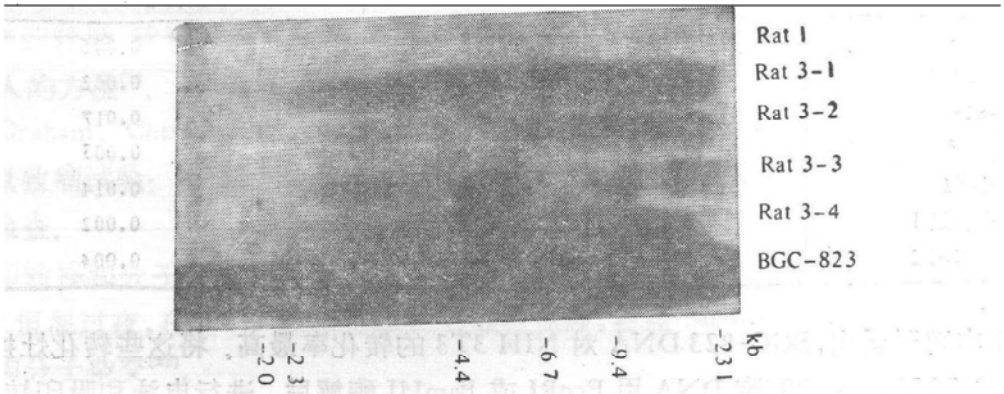


图 3 二轮转化细胞中人 Alu 重复序列的检测

(Rat1 和它相应的二轮转化细胞以及 BGC-823 细胞 DNA 各 10 μg 用 EcoRI 酶解后进行电泳、吸印转移和分子杂交. 探针同图 2)

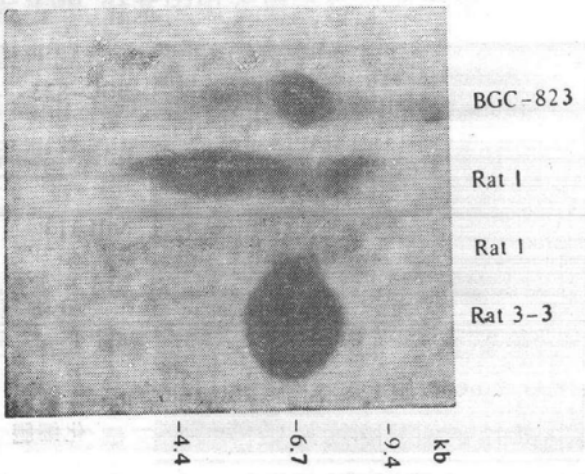


图 4 二轮转化细胞中癌基因 Ha-ras 的检测

(40μg DNA 在 BamHI 酶解后进行电泳、吸印转移和分子杂交. 探针: c-Ha-ras BamHI 酶解片段 (6.6kb))

将 Rat 3-3 总 DNA 用 BamHI 酶解、电泳、吸印转移后以原癌基因 c-Ha-ras 为探针进行分子杂交，自显影结果如图 4. 从图 4 可看出，Rat3-3 中含有癌基因 Ha-ras，它的位置相当于 6.6kb，与人胃癌、BGC-823 细胞总 DNA 与 c-Ha-ras 杂交所显示的区带位置相同，而与 Rat1 细胞总 DNA 所显示的位置不同. 这说明 Rat 3-3 基因组中 6.6 kb 长 (BamHI 酶解后) 的癌基因不是来自 Rat1 基因组内部，而是来自人胃癌 BGC-823 细胞. 第二轮转化细胞 DNA 与其它癌基因探针 (v-Ki-ras, N-ras 等)杂交均未显示出外源性区带.

将第二轮转化的 Rat 3-3 细胞接种到裸鼠皮下，二至四周后观察到在接种部位形成肿瘤，病理诊断为纤维肉瘤. 这说明经胃癌 BGC-823 转染后的鼠成纤维细胞有强致瘤性.

以上实验说明了人胃癌细胞株 BGC-823 含有可以使成纤维细胞发生恶性转化的癌基因 Ha-ras.

2. 从 Rat 3-3 基因组文库中克隆转化基因

对载体 EMBL3 DNA 进行体外包装，侵染宿主菌 K 802，测定的效价表明每微克载体 DNA 可形成 1.3×10^8 个噬斑，说明包装体系的效率已达到构建完整基因文库的要求. 对载体左右臂(含 BamHI 末端) 与外源 DNA (Rat3-3 总 DNA 用 BamHI 进行不完全消化形成的15-20kb 片段)以不同分子比进行连接，包装，侵染 K802，测定包装效率，结果见表 3.

表 3　不同载体臂/外源DNA(分子比)的重组分子的包装效率

	载体臂/外源 DNA (分子比)	包装效率 (PFU*/μg DNA)	本底噬斑百分率(%)
EMBL 3	—	1.3×10^8	—
EMBL3 左右臂	—	6×10^3	—
EMBL3 左右臂	0.5:1	5.5×10^5	5
+外源 DNA	1:1	8.3×10^5	4
+DNA 连接酶	2:1	1.3×10^6	3

* PFU为噬斑形成单位.

从表 3 中可以看出，当载体臂与外源 DNA 的分子比为 2:1 时，包装效率最高，可达 1.3×10^6 PFU/μg 外源 DNA. 根据计算可知，此时仅有 3% 的噬斑不含插入片段. 从而得到了完整的 Rat3-3 基因组文库.

分别以人 Alu 重复序列和原癌基因 c-Ha-ras 为探针，对一百万重组体噬斑进行原位杂交，经过三轮筛选，得到可以同时与这两个探针杂交的噬斑(图 5). 这些噬斑含有来自人胃癌细胞株 BGC-823 的癌基因 Ha-ras.

分别取两个阳性噬斑 (λ120 和 λ151) 进行液体培养，提取 DNA，用 BamHI 酶解后进行电泳(图 6)，吸印转移，并以 c-Ha-ras 为探针进行分子杂交(图 7). 图 6 和图 7 显示 λ120 和 λ151 的插入片段分别被 BamHI 完全消化成三个片段 (8.6kb, 6.6kb, 2.5kb) 和两个片段 (6.6kb, 6.2kb)，其中 6.6 kb 片段为 Ha-ras 癌基因的同源片段. 各片段的位置关系见图 8. 这个位置关系可在它们的次级克隆中得到证明 (结果将另行发表). 用 Alu 探针对 λ 120 和 λ 151 的 BamHI 酶解片段进行 Southern 杂交，结果显示出 6.6kb 片段不含人 Alu 重复序列，而它周围的片段 6.2 kb, 2.5kb 和 8.6 kb 均含 Alu 重复序列. 这进一步证明克隆出的 Ha-ras 癌基因来

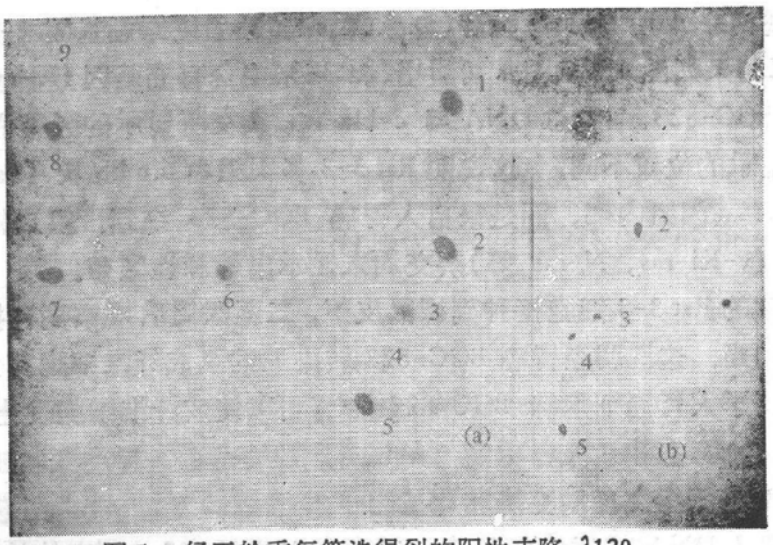
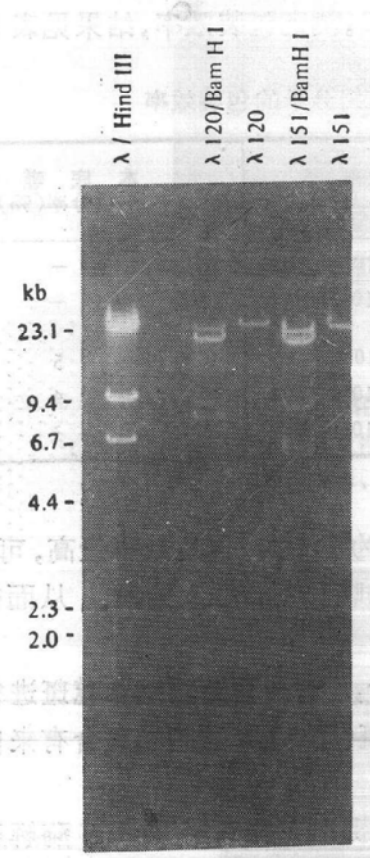
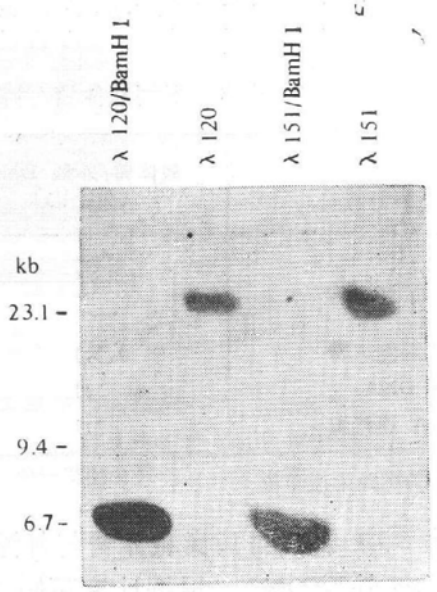


图 5 经三轮重复筛选得到的阳性克隆 λ120
((a)——与探针 c-Ha-ras 杂交
(b)——与探针 Alu 重复序列杂交)





克隆 λ120 和 λ151 DNA 中 c-Ha-ras 的检测
(λ120 和 λ151 DNA 用 BamHI 酶解,电泳后进行吸印转移,以 c-Ha-ras (6.6kb) 为探针进行分子杂交)

图 6 克隆 λ120 和 λ151 DNA BamHI 酶解片段的比较

自人胃癌细胞.

为了测试克隆的 Ha-ras 的转化活性，用 1μg 含 Ha-ras BamHI 6.6kb 片段的次级克隆 pGC6.6 DNA 对 Rat1 细胞进行转染，转化灶形成率可达 48/μg DNA/10^5 细胞，这说明克隆化的癌基因比克隆前对成纤维细胞的转化效率提高了三个数量级.

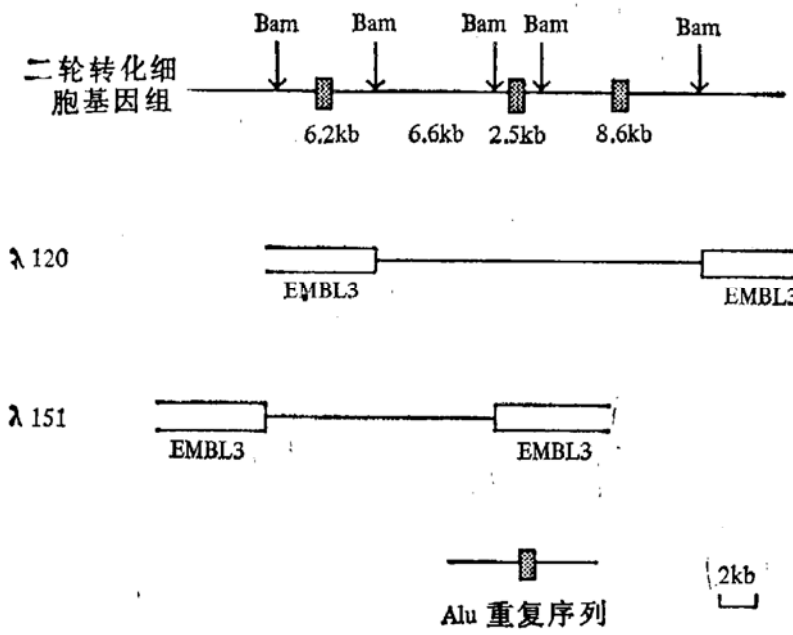


图 8　Ha-ras（6.6kb）和旁侧片段位置关系及 λ120，λ151 的克隆范围

3. 转化基因第一、第二外显子 DNA 序列分析的结果

将 λ 120 DNA 用限制性内切酶 PstI 消化，用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行片段分离(图 9)．根据原癌基因 c-Ha-ras 的酶谱(图 10)可知，第一、第二外显子分别在 PstI-F 片段 (371 碱基对长) 和 PstI-G 片段 (299 碱基对长)上．由于 c-Ha-ras 激活的位点——第 12 密码子和第 61 密码子分别在第一、第二外显子中[3,4,21,22]，我们测定了 PstI-F 和 PstI-G 片段的 DNA 序列．图 11 为 DNA 序列测定的实验安排，箭头所示的方向和起、终点为读序列的方向和起、终点，每个方向来自不同的 M13 克隆．图 12 为 PstI-F 片段测序凝胶电泳图谱．将核苷酸序列与正常组织中存在的原癌基因 c-Ha-ras 相应区域序列比较，可以看出，对第一外显子来说，二者之间除了两个碱基外，完全相同 (图 13)．第一个有区别的位置为起始密码左侧第 10 个核苷酸，它的改变不影响基因产物的结构，仅反映基因的多态性．而第二个有区别的位置是编码区第 35 个核苷酸，它从正常原癌基因的 G 变为转化基因的 T，这一变化使相应的第 12 位三联密码从 GGC 变为 GTC，也就是说这一变化使基因产物 p21 蛋白第 12 个氨基酸从正常的甘氨酸变成缬氨酸．对第二外显子来说，转化基因与原癌基因的核苷酸序列完全相同．

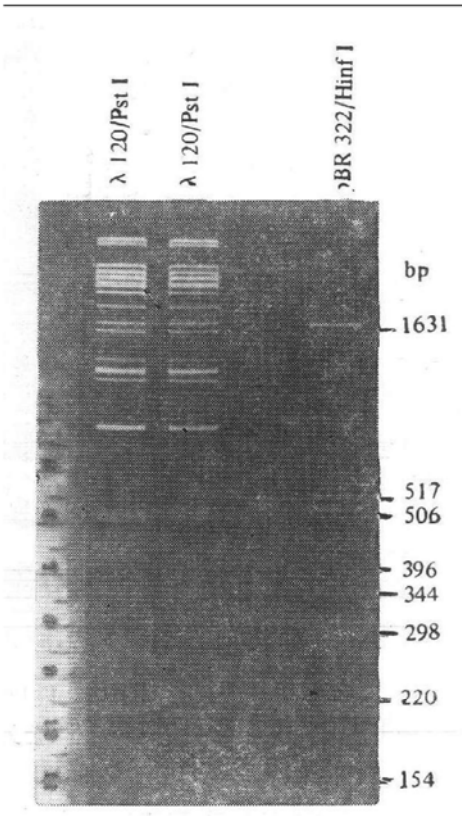


图 9　克隆 λ120 DNA PstI 酶解片段电泳图谱

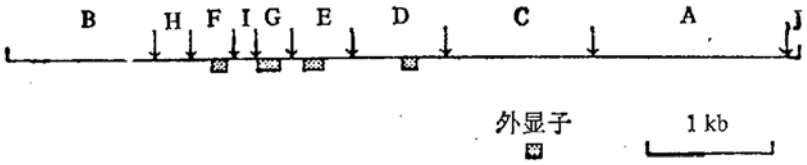


图 10 c-Ha-ras BamHI 6.6kb 片段中 PstI 的切点位置

(PstI 酶解后形成的 A,B,C,D,E,F,G,H,I,J 片段的长度分别为 1635, 1212, 1144, 827,437,371,299,276,187,73 碱基对)

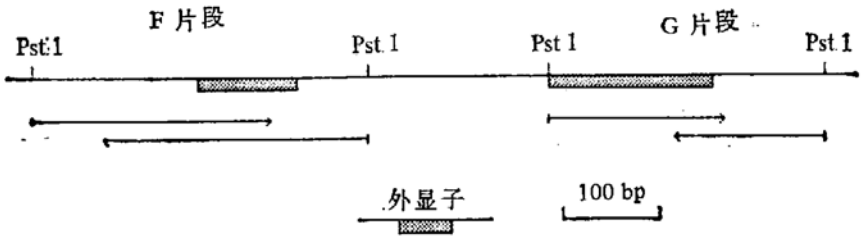


图 11 测定 PstI-F 和 G 片段核苷酸序列的实验安排

(箭头所示的方向和起、终点为读序列的方向和起、终点)

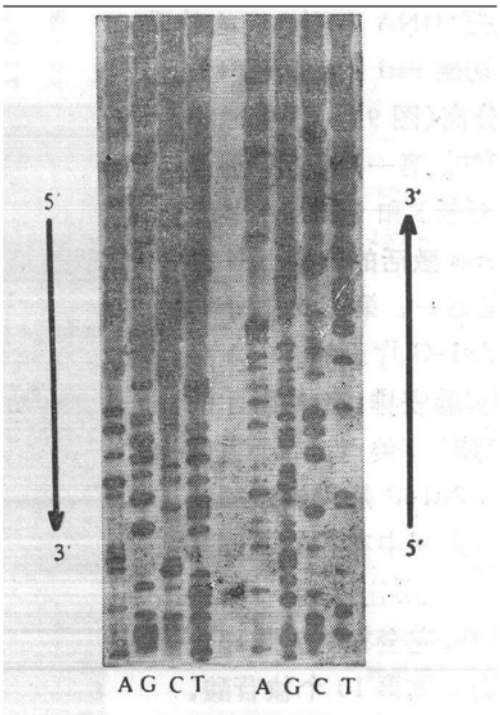


图 12 PstI-F 片段序列分析的放射自显影结

(箭头显示两条互补单链的读序方向)

三、讨 论

本项研究采用了基因转移的方法，用人胃癌细胞株 DNA 使鼠成纤维细胞系发生恶性转化. 用分子生物学手段将来自人胃癌细胞株的转化基因从鼠转化细胞中克隆分离出来. 经过分子杂交鉴定，这个基因就是被活化的原癌基因 c-Ha-ras. 对这个基因中最有意义的部分进

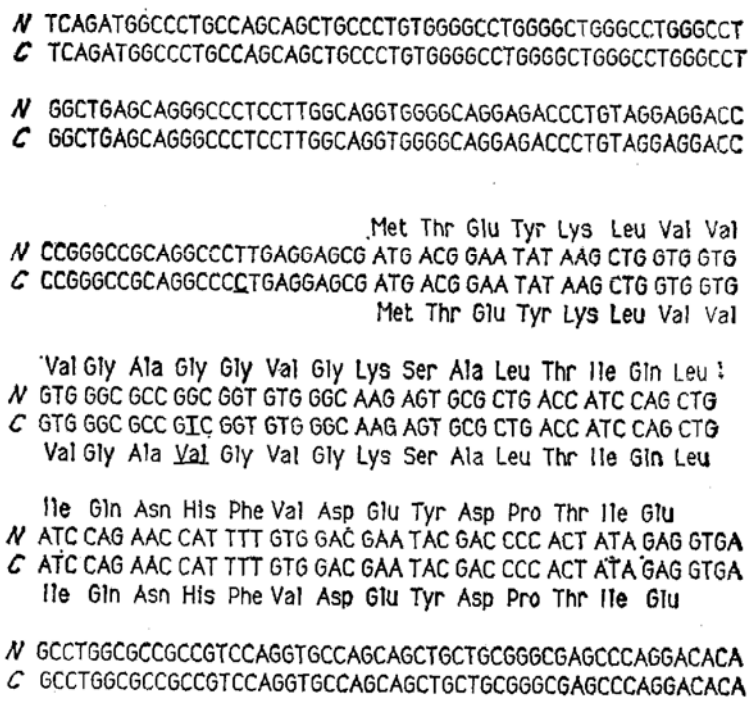


图 13　转化基因 Ha-ras 与原癌基因 c-Ha-ras 的 PstI-F 片段序列的比较

（*N*——原癌基因 *c*-Ha-ras 的核苷酸序列，
C——转化基因 Ha-ras 的核苷酸序列，
它们各自编码的氨基酸分别表示在它们的上面和下面．有区别的核苷酸和氨基酸下面用横线显示出）

行 DNA 序列测定，结果表明它在编码区与正常的原癌基因仅差一个密码子．

c-Ha-ras 广泛存在于真核生物中，甚至在最低等的真核生物酵母中也找到了 ras 的同源序列[23-25]．ras 基因这种进化上的高度保守性表明其功能的重要性．近年来的研究进一步证明，c-Ha-ras 编码的 p21 蛋白存在于细胞质膜内面．它可与 GTP 及 GDP 紧密结合，并具有 GTP 酶的活性．它的功能与 Gs 蛋白类似，可将细胞膜外的调节信号通过膜上的生长因子受体传递给膜内的其它调控因子，如腺苷酸环化酶[23]，从而在细胞的正常生长分化中起重要的调节作用．Wigler 等实验室用实验证明 p21 蛋白第 12 个氨基酸发生的突变可导致 GTP 酶活性的降低[24]．Seeburg 等将 c-Ha-ras 在体外诱发突变，使第 12 密码子从甘氨酸变为另外 20 种氨基酸，并用这些突变基因进行细胞转染．他们发现除脯氨酸外，各种氨基酸代替甘氨酸密码子的基因均有转化活性[26]．第 12 密码子的突变使 p21 蛋白空间构型发生变化，从而使细胞的生长分化偏离正常轨道，这可能是细胞癌变的重要机理之一[27]．

值得注意的是癌症的起因是十分复杂的问题，细胞癌变受多种因素、多种癌基因的控制，不同肿瘤癌基因的活化方式可能也不尽相同．本项研究工作首次从一株胃癌细胞株中克隆出转化基因，并证明它的活化是由于第 12 密码子的点突变造成的，这在癌变机理的研究方面是一项有意义的探讨性工作．

参　考　文　献

[1] Shih, C. and Weinberg, R. A., *Cell*, 29(1982), 161—169.

[2] Goldfarb, M. et al., *Nature*, **296**(1982), 404—409.
[3] Reddy, E. P. et al., *ibid.*, **300**(1982), 149—152.
[4] Tabin, C. J. et al, *ibid.*, **300**(1982), 143—149.
[5] Shimizu, K. et al., *ibid.*, **304**(1983), 497—500.
[6] Capon, D. J. et al., *ibid.*, **304**(1983), 507—513.
[7] Kraus, M. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**(1984), 5384—5388.
[8] Graham, F. L. and van der Eb, A. J., *Virology*, **52**(1973), 456—467.
[9] Capeland, N. G. et al, *Cell.*, **17**(1979), 993—1002.
[10] Rapaport, E. et al., *Cancer Res.*, **43**(1983), 4402—4406.
[11] Maniatis, T. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp 383—386.
[12] Maniatis, T. et al., *ibid.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp 109—112.
[13] Maniatis, T. et al., *ibid.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, pp 387—389.
[14] Maniatis, T. et al., *Cell*, **15**(1978), 687—701.
[15] Frischauf, A. et al., *J. Mol. Biol.*, **170**(1983), 827—842.
[16] Enquist, L. and Sternberg, N., *Methods in Enzymology*, Vol. 68, 1979, Academic Press, pp 281—298.
[17] John, B., *Methods in Enzymology*, Vol. 68, 1979, Academic Press, pp 299—309.
[18] Benton, W. D. and Davis, R. W., *Science*, **196**(1977), 180—182.
[19] Messing, J., *Methods in Enzymology*, Vol. 101, 1983, Academic Press, pp 20—78.
[20] Sanger, F. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**(1977), 5463—5467.
[21] Yuasa, Y. et al, *Nature*, **303**(1983), 775.
[22] Kraus, M. H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**(1984), 5384—5388.
[23] Toda, T. et al., *Cell*, **40**(1985), 27—36.
[24] Kataoka, T. et al., *ibid.*, **37**(1984), 437—445.
[25] Tatcheil, K. et al., *Nature*, **309**(1984), 523—528.
[26] Seeburg, P. H. et al., *ibid.*, **312**(1984), 71—75.
[27] Gambke, C. et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**(1985), 879—882.