

Si-1 基因中一个多态位点的初步分析*

杨克¹, 杨举伦², 覃扬³, 郭庆¹, 王琨岚¹, 杨莹¹, 谭德勇¹
 (1. 云南大学 生命科学学院生物化学与分子生物学实验室, 云南 昆明 650091;
 2. 成都军区昆明总医院 病理科, 云南 昆明 650000;
 3. 四川大学 华西医学中心基础医学与法医学院, 四川 成都 610041)

摘要:通过 PCR-RFLP 技术分析了 Si-1 基因的外显子在肿瘤样本与正常人群外周血液样本的突变情况, 初步确定了 Si-1 基因的第 15 号外显子的第 56 位发生点突变, 突变类型为 C-T 的置换突变, 其编码的 P(脯氨酸)变化为 S(丝氨酸). 在正常人群外周血液样本中的突变频率为 14%, 而在肿瘤中的突变频率为 24.7%, 尤其在肠癌中的突变频率高达 51.5%. 上述结果表明 Si-1 基因的外显子的突变与肿瘤间有一定关系.

关键词: Si-1 基因; 肿瘤; 突变; RFLP

中图分类号: Q 756 **文献标识码:** A **文章编号:** 0258-7971(2004)05-0450-04

肿瘤与遗传相关性的证据随着肿瘤遗传学的深入研究而越来越丰富, 包括细胞水平和分子水平. 尤其是分子水平, 在几乎所有各类肿瘤细胞中都观察到肿瘤细胞所特有的遗传变异. 在细胞中存在的肿瘤易感基因, 在分子水平上确认在其某一外显子的某一密码子上容易发生点突变的热点 (hot spot)^[1], 这种点的突变常常是导致细胞生长失控从而癌变的分子病理机制. 同时这类基因在一般人的染色体上呈纯和状态 (homozygosity), 而在某些特定的人群其染色体上则以杂和体 (heterozygosity) 的形式存在, 能呈现一种隐性癌基因的特性, 在某些环境因素影响之下其转化为癌基因^[2].

Si-1 基因是本实验室克隆得到的一个新基因, 在 U251 细胞株中血清抑制时有较高的表达,

由于血清饥饿使细胞进入 G₀ 期, 由此推测其可能是细胞由 G₁ 期进入 G₀ 期的调控基因, 因而可能与细胞癌变有关. 基于此种考虑, 我们针对 Si-1 基因在肿瘤样本与正常人群的血液样本中进行突变分析, 从而比较分析 Si-1 基因的突变与肿瘤的相关性. 该研究一方面为 Si-1 基因功能深入研究提供依据, 同时对肿瘤分子病理机制的研究具有重要的参考价值^[3,4].

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 肿瘤样本 由成都军区昆明总医院病理科、华西医科大学提供, 各类肿瘤组织样本 159 例 (见表 1).

表 1 各类肿瘤组织情况一览表

Tab. 1 The amount and character of tumor tissue

| | 脑部 | 肝部 | 胃部 | 肺部 | 胸部 | 肠道部 | 其他部位 | 合计 |
|--------|----|----|----|----|----|-----|------|-----|
| 恶性肿瘤组织 | 19 | 11 | 19 | 35 | 24 | 33 | 17 | 158 |

上述肿瘤组织均未进行过放射性及化学性治疗的恶性肿瘤.

1.1.2 正常人群外周血液样本 采取自愿献血原则, 采集血样. 并且记录献血者的年龄、性别、血型

* 收稿日期: 2004-04-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39960030; 30360040); 云南省应用基础研究基金重点资助项目 (1999C002Z).

作者简介: 杨克 (1978-), 男, 回族, 云南人, 硕士, 主要从事分子生物学及肿瘤遗传学研究.

和民族的情况,共采集到血样 100 例。

1.2 方法

1.2.1 样本基因组 DNA 抽提及检测 使用上海华舜试剂公司提供的组织 DNA 小量抽提试剂盒抽提。用 β - actin 对模板进行扩增,反应体系为: PCR Buffer 2.5 μ L, 25 μ mol/L MgCl₂ 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.75 μ L, 引物各 2 μ L (20 pmol/ μ L), Taq DNA 聚合酶 0.5 U, 模板 1 μ L, 加水至 25 μ L。循环程序: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 57 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物 4 μ L 在 7% 的中性聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测。

1.2.2 PCR 扩增及产物回收 使用检测引物进行扩增,引物为: 5' - AAA GGG CAA TGC TGT GTA CC - 3'; 5' - GCA GGA TGA GGG ATG AGA AG - 3', 扩增产物为 499 bp。反应体系为: PCR Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.75 μ L, 引物各 2 μ L (20 pmol), Taq DNA 聚合酶 0.5 U, 模板 1 μ L, 加水至 25 μ L。循环程序: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 20 s, 56 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶凝胶上电泳检测。采用华舜胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物,

回收产物 1% 琼脂糖凝胶电泳检测^[5]。

1.2.3 测序分析 将样品的 PCR 产物交由上海生工进行测序,测序结果在线与人类基因组进行比对分析。

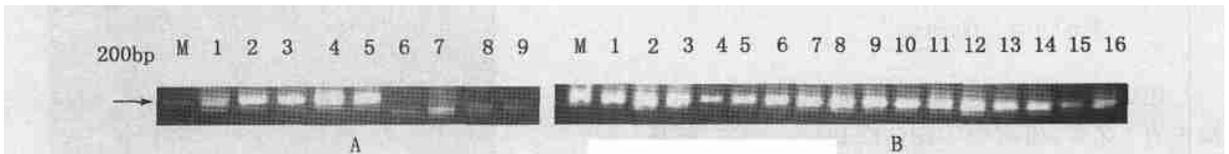
1.2.4 RFLP 分析 对于突变位点进行序列分析后,设计酶切位点,对 PCR 纯化回收产物进行 RFLP 分析。试剂购自宝生公司,反应体系为: 10 \times K Buffer 2 μ L, 酶 2 μ L, PCR 回收产物 3 μ L, 加水至 20 μ L。

2 结 果

2.1 样本基因组 DNA 抽提检测结果 箭头所指的片段大小为 200 bp, β - actin 扩增的片段大小为 203 bp。扩增结果见图 1。

从检测结果可知样本基因组 DNA 模板抽提效果可靠,纯度及浓度可以进行 PCR 扩增及 RFLP 检测。

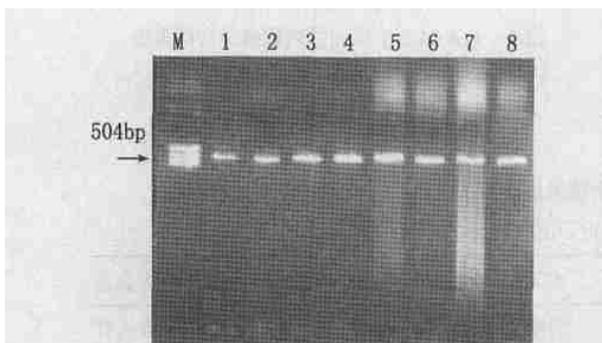
2.2 PCR 扩增与产物回收检测结果 引物扩增 Si- 1 基因的第 15 号外显子区段,片段的大小为 499 bp,部分扩增结果及产物回收检测结果见图 2。



A: M 道为 200~ 1 000bp DNA ladder marker, 1~ 9 道为正常人群外周血液 PCR 扩增片段。B: M 道为正常人群外周血液 PCR 扩增片段, 1~ 7 道为脑肿瘤组织 PCR 扩增片段, 8~ 14 道为肝肿瘤组织 PCR 扩增片段, 15~ 16 道为胃癌组织 PCR 扩增片段。

图 1 基因组 DNA β - actin 扩增结果图

Fig. 1 The result of β - actin PCR for the template of the tissue



M: pBR322 DNA/Hae III Markers; 1~ 4: PCR 回收产物; 5~ 8: PCR 产物。

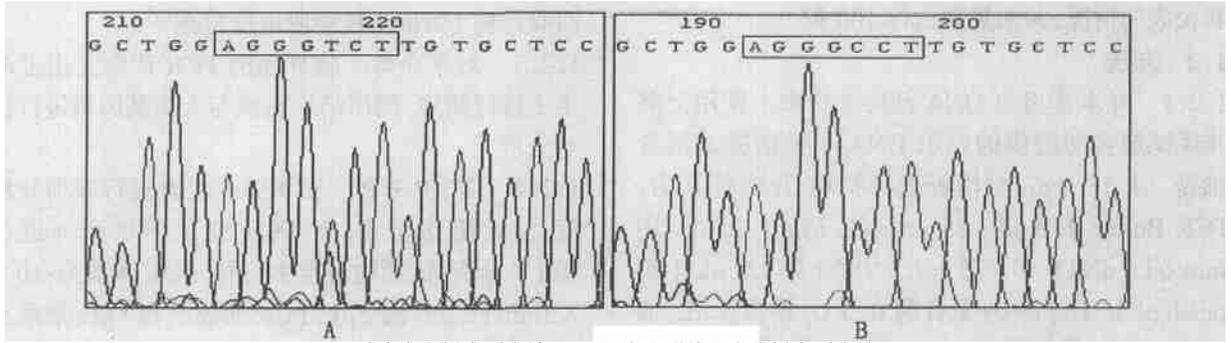
图 2 PCR 扩增及产物回收结果图

Fig. 2 The result of the PCR fragment and fragment reclaiming

从检测结果可知,PCR 扩增产物的片段大小正确。针对 PCR 产物进行的回收之后,可以看到基本已将 PCR 产物中的非特异性带去处,获得了较为单一的 PCR 产物,可以进行下一步的 RFLP 分析。

2.3 测序分析结果 将 PCR 产物送往上海生工进行测序,部分测序结果见图 3。

通过比较和分析肿瘤突变样本与未患肿瘤人群外周血液样本的测序报告,可以看到在图中画框处存在突变,其突变的形式为杂合型点突变。同时通过 Primer Premier 5.0 分析软件分析该位点发现该处存在 Eco O109 I (Dra II) 的限制性内切酶位点。其酶切模式图见图 4。



A: 肿瘤突变样本测序结果; B: 正常人群外周血液样本测序结果

图 3 PCR 产物测序结果图

Fig. 3 The result of PCR fragment sequencing

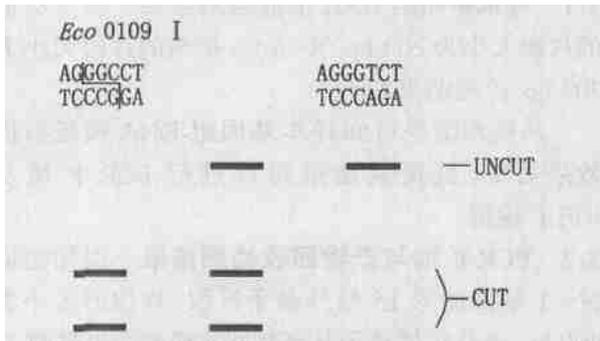


图 4 *Eco O109I* 限制性内切酶酶切模式图

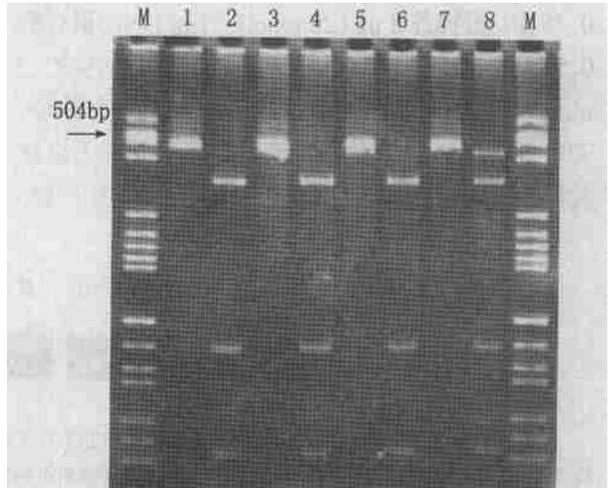
Fig. 4 The middle fig of restriction endonuclease of *Eco O109I* digesting

如果样品为纯和型野生型则可以观察到完全酶切的 2 条带, 而突变体则该酶切位点丧失, 但是样品发生杂和型突变则会观察到 3 条带, 即突变与野生的混合模式. 由于在该片段上 *Eco O109I* (*Dra II*) 的限制性内切酶位点有 2 个, 因此可以观察到野生型有 3 条带, 而杂和突变型有 4 条带.

2.4 RFLP 分析结果 针对肿瘤样本及未患肿瘤人群外周血液样本进行 RFLP 分析, 部分酶切结果见图 5.

野生型被酶切为(335 bp+ 97 bp+ 52 bp) 3 个片段, 纯和突变型被酶切为(447 bp+ 52 bp) 2 个片段,

而杂和型突变则被酶切为(447 bp+ 335 bp+ 97 bp+ 52 bp) 4 个片段, 通过与 pBR322 DNA/*Hae III* Markers 比对, 酶切结果片段大小与设计片段大小吻合. 肿瘤人群及正常人群 RFLP 分析结果见表 2.



M: pBR322 DNA/*Hae III* Markers; 1~ 4: 正常人群外周血液样本, 其中 1, 3 为 PCR 回收未酶切产物; 2, 4: 酶切产物; 5~ 8: 肿瘤样本, 其中 5, 7 为 PCR 回收未酶切产物; 6, 8: 酶切产物

图 5 *Eco O109I* 限制性内切酶酶切结果图

Fig. 5 The result of restriction endonuclease of *Eco O109I* digesting

表 2 RFLP 分析结果统计表

Tab. 2 The result of RFLP

| | 肿 瘤 | | | | | | | 合计 | 外周血液 正常人群 |
|---------|------|------|-----|------|------|------|------|------|--------------|
| | 脑肿瘤 | 肝癌 | 胃癌 | 肺癌 | 乳腺癌 | 肠癌 | 其他肿瘤 | | |
| 突变数 | 4 | 3 | 1 | 8 | 4 | 17 | 2 | 39 | 14 |
| 样本数 | 19 | 11 | 19 | 35 | 24 | 33 | 17 | 158 | 100 |
| 突变频率/ % | 21.1 | 27.3 | 5.3 | 22.8 | 16.7 | 51.5 | 11.8 | 24.7 | 14 |

在肿瘤组织中其突变率为 24.7%, 而在未患肿瘤人群外周血液样本中的突变率为 14%。在脑肿瘤、肝癌、肺癌和肠癌中的突变率均超过 20%, 尤其是在肠癌中的突变率高达 51.5%。由卡方计算可知 Si- 1 基因在肠癌与正常人群血液样本中的突变频率有显著差异 ($\chi^2 = 4.28, P < 0.05$)^[7]。

3 讨论

通过 RFLP 分析及测序分析, 可以发现在 Si- 1 基因的第 15 号外显子的 56 位发生点突变, 突变类型为 C-T 的置换突变。而该处的突变导致了该基因的编码蛋白发生变化, 其编码的 P(脯氨酸) 变化为 S(丝氨酸), 可能导致编码蛋白的结构及功能的变化。由此可以发现该点的突变, 可能是使得 Si- 1 基因的功能丧失, 从而引发了肿瘤。

细胞周期调控基因大部分为纯和型基因, 当其在功能区发生点突变时, 可形成杂和型基因, 杂和型基因在大部分情况之下, 表现为一种隐性癌基因的特性, 但是在外界环境发生变化时, 其有可能被活化为癌基因^[6]。从而表现出癌基因的特性。Si- 1 基因是在在以往的研究中发现该基因在血清饥饿细胞中有与肿瘤易感基因 p16, p21 和 p53 基因相似的表达特征^[3], 同时该基因的高表达状态是在 U251 细胞株进行血清抑制培养条件下出现的, 而 U251 细胞株在血清抑制培养条件下, 会出现细胞大量的进入 G₀ 期, 由此可以认为 Si- 1 基因是细胞周期中的 G₁ 期进入 G₀ 期的调控基因。其发生突变就有可能使得该调控点发生紊乱, 在 RFLP 检测以及测序分析中我们发现肿瘤样本的突变类型为一种典型的杂和型突变, 其特征与大多数的隐性癌基因的情况类似。同时在肿瘤中的突变频率高于正常人群血液样本, 尤其在脑肿瘤、肝癌、肺癌和肠癌中的突变率均

超过 20%, 在肠癌中的突变频率更高达 51.5%。

基于以上的实验结果, 我们可以认定在 Si- 1 基因的第 15 号外显子的 56 位 C-T 有一个突变热点, 其具有在肿瘤人群与非患肿瘤人群间的 SNP 点的特性。进一步收集样本针对于该位点进行 SNP 分析后, 将会加深对于 Si- 1 基因与肿瘤间, 以及 Si- 1 基因与细胞周期尤其是细胞由 G₁ 期进入 G₀ 期中的调控位点间关系研究。由于本研究只是对现有样本进行了初步分析, 关于与不同的肿瘤之间的关系研究, 有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] HSU I C, METCALF R A, SUN T, et al. Mutational hotspot in the P53 gene in human hepatocellular carcinomas[J]. Nature, 1991, 350: 427.
- [2] 汤 钊, 朱世能, 曹世龙, 等. 现代肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000.
- [3] 谭德勇, 赖建华, 何云刚, 等. 一个血清抑制基因的克隆[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5): 816—819.
- [4] 罗 兰, 何云刚, 舒昆贤, 等. 血清对胶质瘤细胞株 U251 基因的表达的影响[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2000, 22(2): 144—147.
- [5] 奥斯泊 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [6] POULSEN H E, LOFT S, WASSERMANN K. Cancer risk related to genetic polymorphisms in carcinogen metabolism and DNA repair[J]. Phar2 Macol Toxicol, 1993, 72: 93—103.
- [7] 杨树勤, 周有尚, 倪旱雨, 等. 卫生统计学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [8] 何 婕, 谭德勇. 体外细胞株 G₀ 期同步化模型建立及分析[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2003, 25(增刊): 202—204.

Initial study on a SNP site of Si- 1 gene

YANG Ke¹, YANG Ju-lun², QING Yang³, GUO Qing¹, WANG Kun-lan¹, YANG Ying¹, TAN De-yong¹

(1. The Laboratory of Biochemistry & Molecular Biology, Life Sciences School, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. The Pathology Department, The Chief Hospital of Chengdu Military Area, Kunming 650000, China;

3. West China School Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, Sichuan University, Chengdu 640041, China)

Eleven primers were screened out from forty random primers, and a total of 86 DNA fragments were amplified ranging from 300—2 000 bp. The average number of DNA fragments produced by each primer was 7.28. Nei's similarity coefficients and genetic distances were calculated by using POPGENE software and the dendrogram were constructed by using UPGMA. The 10 *Primula* species were divided into three groups. *P. poissonii* Franch, *P. Wilsoni* Dunn, *P. bulleyana* Forr., *P. beesiana* Forr. val. *beesiana* were clustered into one group, which is in consistence with the morphological classification. The relationships of *P. poissonii* Franch. and *P. wilsoni* Dunn. were discussed.

Key words: *Primula*; ISSR; cluster analysis; the relationships

* * * * *

(上接第 453 页)

Abstract: In this study, Si- 1 gene from the various types of tumors and the normal blood sample was analyzed by using PCR-RFLP method. A SNP site in the NO. 15 exon was found. The site lie at No. 56 base, and the mutation mode is C—T, which can change the protein sequence from Pro to Ser. The mutation analysis results showed that the mutation rate is 14% in the normal blood sample, but 24.7% in the tumors. Moreover, it was very high up to 51.5% in the intestinal cancer. In conclusion, there exists a significant relationship between the mutation frequency at No. 56 site of 15 exon of Si- 1 and the tumor incidence.

Key words: Si- 1 gene; tumor; gene mutation; RFLP