

·简 报·

广东汉族人 WT33 cDNA 3'端非翻译区内的 *Hinf* I 酶切点的遗传多态性^①

郭奕斌^② 杜传书

(中山医科大学遗传学教研室;广州,510089)

主题词 基因;肾母细胞瘤;脱氧核糖核酸酶类;限制性片段长度多态性;抗癌基因;聚合酶链反应

中图分类号 Q 33; 78

Wilms 瘤基因 WT33是第三个被公认的抗癌基因,对其 cDNA 3'端非翻译区内952 bp 扩增片段的多态性问题,国外学者 Paul R. Hoban 和 Anna M. Kelsey 曾作过研究^[1]。为了弄清中国人人群中该片段内是否存在其它酶切位点的多态性以及该片段内 *Hinf* I 酶切位点的多态性是否与国外报道的存在差别,以便进一步了解这些多态性与 Wilms 瘤发生的相关性,为今后的基因诊断等打下基础。作者对来自广东地区的数十例汉族人的 WT33 cDNA 3'非翻译区内的 *Hinf* I 酶切位点及通过电脑分析而新确定的 *EcoR* I、*Bgl* I 酶切位点进行了遗传多态性的研究。现将这方面工作的初步结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 正常人基因组 DNA 的制备

取0.5 ml肝素抗凝的正常人外周血,加0.5~1.0 ml 裂解缓冲液[0.32 mol/L 蔗糖,10 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5),5 mmol/L MgCl₂,1% Triton X-100],4℃放置30 min,离心8 000 r/min,10 min,弃上清,加0.5 ml 裂解缓冲液,混匀,离心8 000 r/min,10 min,弃上清(重复1次),加100 μl DNA 提取液[10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),0.5% NP-40,0.5% Tween 20,100 μg/ml 蛋白酶 K],55℃水浴1~3 h,离心15 000 r/min,10 min,吸上清,备扩增。

1.2 952 bp 片段的 PCR 扩增

引物按照文献^[1]设计的合成。P1:5'GCCTG-

GAAGAGTTGGTCTC T 3';P2:5'A CACAGTAA TTTCAAGCAACGG 3'。扩增条件为:93℃、1 min,58℃、1 min,72℃、2.5 min,30~35个循环。

1.3 扩增片段的多态性分析

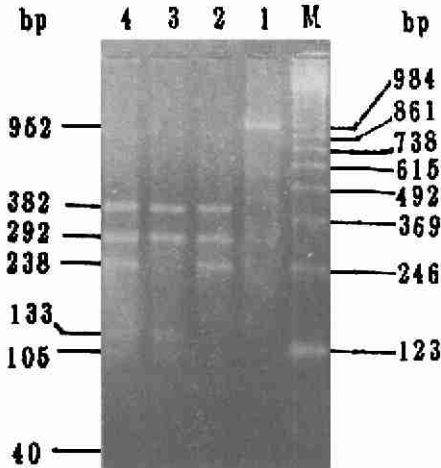
在参考有关文献的基础上,用 *Hinf* I 对64例无亲缘关系的正常人的952 bp 片段进行酶切,然后用3%的琼脂糖凝胶电泳分析酶切结果。此外,为了弄清该片段是否还有其它酶切位点的多态性,作者又通过电脑对该片段进行了酶切位点的分析。分析的结果表明:该片段除了文献[1]报道的6种酶外,还含有 *EcoR* I 和 *Bgl* I 两种酶的单切位点。因此,又分别用 *EcoR* I 和 *Bgl* I 两种酶先对10例无亲缘关系的正常人的952 bp 扩增片段进行酶切,并用1%的琼脂糖凝胶电泳检查酶切结果,以了解这两种酶在该片段中酶切位点的多态性情况。

2 结 果

用 *Hinf* I 对64例无亲缘关系的正常人外周血的扩增产物进行酶切的结果表明:两个等位基因系统都有382 bp、292 bp 和40 bp 3条带,其中等位基因1(A1)还有一条238 bp 的带,而等位基因2(A2)则还有133 bp 和105 bp 的两条带(见附图的 lane2 和 Lane3)。A1所占的比例为0.625;A2所占的比例为0.375。染色体定位于11p13^[2],若是杂合子,则这6条带均可见(附图的 lane4)。而用 *EcoR* I 和 *Bgl* I 酶切的结果表明:在952 bp 扩增片段内的这两种

① 本课题由学校科研基金资助;② 第一作者,1963年生,男,硕士,讲师

酶切位点均无多态性。



附图 952 bp 片段内的 *Hinf* I 的遗传多态性

M:123 bp 的 DNA 分子量标准

1,952 bp 的扩增片段

2,952 bp 片段的 *Hinf* I 酶切产物1

3,952 bp 片段的 *Hinf* I 酶切产物2

4,952 bp 片段的 *Hinf* I 酶切产物3

3 讨论

WT33是第3个被公认的抗癌基因,国外学者 Paul R. Hoban 和 Anna M. Kelsey 对其 cDNA 3'端非翻译区内的952 bp 片段的多态性进行研究的结果表明,*Hinf* I 在952 bp 片段内具有多态性,其中除了共有的382 bp、292 bp、40 bp 3条带外,等位基因1 (A1)还有一条238 bp 的带,频率为0.66,等位基因2 (A2)则还有133 bp 和105 bp 两条带,频率为0.34;

而 *Alu* I, *Cfo* I, *Hpa* I, *Hae* III, *Rsa* I, *Taq* I 在该片段内的酶切位点均无多态性。作者未见国内文献报道。本文通过对广东汉族人群中该片段的的多态性的研究发现:该片段内的 *Hinf* I 酶切位点也具有多态性,其中 A1 的多态性频率为0.625, A2 的为0.375,与国外报道的不同。经 χ^2 检验后,求得 $P > 0.05$,表明两者没有显著性差异。另外,借助电脑的分析,选用 *Eco*R I 和 *Bgl* II 两种酶对其进行酶切分析,结果表明在952 bp 片段内的这两种酶切位点均无多态性,这在国内外尚属首报。此外,952 bp 片段的扩增,因所用的耐热聚合酶是复旦大学所提供的酶而非进口酶,故扩增条件经摸索后也作了适当的改动,由原来的94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 74℃ 2.5 min, 30个循环改为现在的93℃ 1 min, 58℃ 1 min, 72℃ 2.5 min, 30~35个循环,结果证明扩增效果良好。

参 考 文 献

- 1 Hoban PR, Kelsey AM. *Hinf* I polymorphism within the 3' untranslated region of the candidate Wilms tumor gene. *Nucleic Acids Res*, 1991,19(5):1164
- 2 Call KM, Glaser T, Ito CY, et al. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms tumor locus. *Cell*, 1990,60:509

(1994-07-08收稿 1995-11-19修回)

(上接第63页)

good in all cases. There were no intraoperative or postoperative complication. We concluded that diagnostic and therapeutic procedure can be done simultaneously in the laparoscopic operation and maybe better than laparotomy.

Subject headings genital diseases, female/surgery; surgery, laparoscopic, laparoscopy