

技术与方法

应用代表性差异分析法筛选人癌候选抑癌基因*

湛凤凰 江 宁 曹 利 邓龙文 周 鸣 谢 奕 曾朝阳 李桂源

(湖南医科大学肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 运用 cDNA 代表性差异分析法 (cDNA representational difference analysis, cDNA RDA), 以正常人鼻咽上皮细胞及鼻咽癌 HNE1 细胞作为比较的样品来源, 分离了四个在鼻咽癌中缺失的 cDNA 片段. 以此四个片段作探针, 分别进行 DNA 杂交、RNA 杂交, 结果显示, 这些差异性的 cDNA 序列确实来自正常人鼻咽上皮且只在其中表达和/或在鼻咽癌 HNE1 中表达降低, 并在鼻咽癌病人中存在不同程度的缺失. 序列分析结果表明这些差异性表达的基因为具有相当抑癌基因功能的已知基因和可能与鼻咽癌相关的抑癌基因的新基因. 从而说明 cDNA RDA 是一种高效、敏感、假阳性低的克隆抑癌基因的有效方法.

关键词 鼻咽癌, 抑癌基因, cDNA 代表性差异分析法

学科分类号 R73

1993 年, Lisitsyn^[1]等在消减杂交的基础上, 发展了一种称为代表性差异分析法 (representational difference analysis, RDA). 这种方法的主要特点在于制备“代表” (representation). 所谓“代表”, 指用限制性内切酶消化基因组 DNA, 连上接头后, PCR 能显著扩增的部分. 再通过多轮杂交和 PCR 扩增, 将存在于“检测”扩增子, 却缺失于“驱赶”扩增子中的 DNA 大量富集. 随后, Hubank^[2]将 RDA 改良, 即用识别四碱基的限制性内切酶代替识别六碱基的限制性内切酶消化 cDNA, 用于比较两组织间的表达差异的基因. 在肿瘤研究中, 这种方法一般用于检测表达增高的基因, 或者检测由于某种因素作用后所对应表达增高的基因. 本文试图采用这一方法, 用正常人鼻咽上皮 cDNA 作为“检测”来源, 鼻咽癌细胞株 HNE1^[3]的 cDNA 作为“驱赶”来源, 筛选出鼻咽癌中候选的抑癌基因.

1 材料与方法

1.1 细胞总 RNA 及 PolyA⁺ mRNA 分离和纯化

将原代培养的正常人鼻咽上皮细胞及低分化鳞状上皮鼻咽癌细胞系 HNE1 细胞, 依 TRIzolTM 试剂盒 (GIBCO BRL) 所介绍的程序抽提细胞总 RNA. 采用磁性球珠 PolyAT tract^R mRNA 分离系统分离和纯化 PolyA⁺ mRNA.

1.2 双链 cDNA 的合成

在 M-MLV 逆转录酶的作用下, 分离、纯化的 PolyA⁺ mRNA 在 GIBCOBRL 公司 cDNA 合成系统中合成 cDNA 第一链和第二链.

1.3 RDA 程序中所用接头

实验中共用三对接头, 每对接头均为 24 mer 和 12 mer, 其中 24 mer 作相应的引物^[1]. RDA 使用的接头及引物序列分别为 R: Bam24 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGAG-3'/R: Bam12 5'-GATCCTCGGTGA-3'; J: Bam24 5'-ACC-GACGTCGACTATCCATGAACG-3'/J: Bam12 5'-GATCCGTTTCATG-3'; N: Bam24 5'-AGGCAA-CTGTGCTATCCGAGGGAG-3'/N: Bam12 5'-GATCCTCCCTCG-3'. 其中“R”接头用于制备扩增子, “J”及“N”接头用于杂交扩增反应.

1.4 cDNA RDA

参照文献 [1, 2], 取正常鼻咽上皮 cDNA 和 HNE1 细胞的 cDNA 各 1 μ g, 分别用 10 U 的 *Sau* 3A1 酶切, 在 T4 DNA 连接酶的作用下, 将上述酶切的 cDNA 片段连上 R Bam 接头. 其后进行 PCR 扩增反应, 反应程序采用 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min,

* 国家“863”高科技发展计划 (102-10-01-05) 和湖南省自然科学基金资助项目.

收稿日期: 1997-10-31, 修回日期: 1998-04-25

72℃退火延伸3 min, 扩增20个循环分别制备“检测”扩增子及“驱赶”扩增子。

杂交和扩增反应时, 取0.4 μg 连接接头的检测扩增子, 40 μg 的驱赶扩增子 (1: 100), 98℃变性5 min; 67℃杂交20 h. 以J Bam 接头为引物进行PCR 扩增; 扩增产物正是“检测”cDNA 中有的而“驱赶”扩增cDNA 中缺失的片段. 以此PCR 产物为“检测”cDNA 与过量的“驱赶”扩增子按上述条件进行第二轮及其随后的第三轮、第四轮的杂交和扩增. 每轮反应中“驱赶”扩增子均为40 μg, “检测”扩增子 (上一轮产物) 与“驱赶”扩增子的比例在第2~4 轮中的比例分别为1: 400、1: 40 000、1: 800 000; 采用的接头则分别为N Bam24、J Bam24、N Bam24.

1.5 DNA 及 RNA 印迹杂交

用回收的“检测”与“驱赶”扩增子及第一轮至第四轮的差异性产物作为探针, 分别与10对配对鼻咽癌肿瘤组织和外周血DNA 进行DNA 杂交; RNA 杂交时将原代培养的正常人鼻咽上皮及HNE1 细胞总RNA 各20 μg 分别转入尼龙膜, 并以回收的第四轮差异性产物为探针 (GAPDH 为内参照), 在68℃杂交过夜, 用2×SSC、0.1% SDS、50℃, 15 min 洗膜2次, 0.1×SSC、0.1% SDS、65℃, 15 min 洗膜2次, -70℃放射自显影.

1.6 克隆、测序及其同源性分析

PCR 产物与载体pGEM-T 连接, 用碱裂解法抽提质粒DNA, 样品经自动测序仪 (全自动荧光测序仪377型, 美国PE 公司) 进行测序. 测序后应用BLAST network service (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 对测定的核苷酸序列进行分析.

2 结 果

实验用cDNA RDA 方法分离和筛选人鼻咽癌表达差异cDNA 的技术路线如图1.

2.1 cDNA RDA 的分析

四轮差异性产物显示200~ 600 bp 扩增效率最高, 随着相减杂交次数的增加, 所获得的差异性片段逐渐减少; 第三轮杂交, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 溴乙锭染色, 有7条较明显的片段. 在第四轮杂交后, 只有4条差异性片段的产生 (图2). 按片段从大到小分别命名为DP4-1、DP4-2、DP4-3、DP4-4.

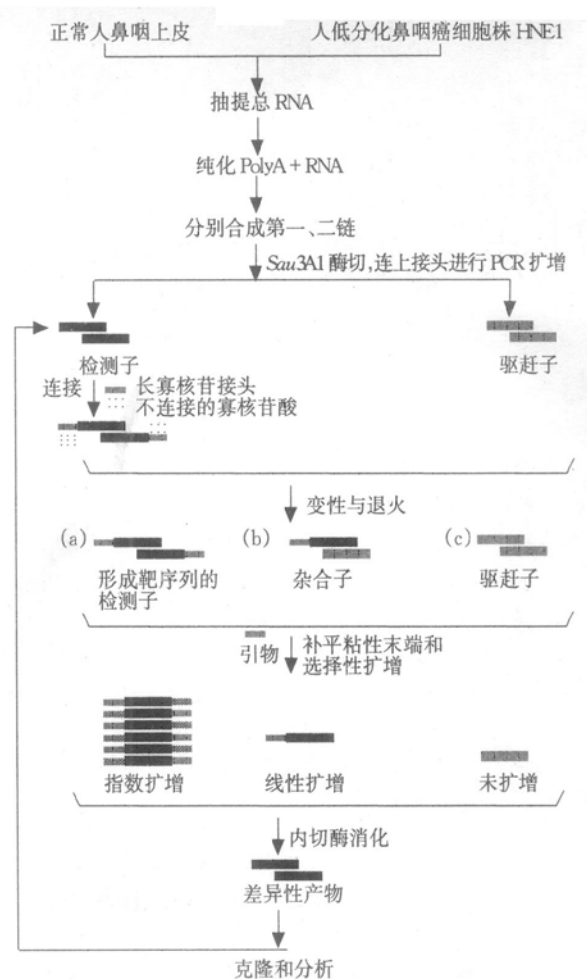


图1 cDNA RDA 筛选候选抑癌基因的策略和技术路线示意图

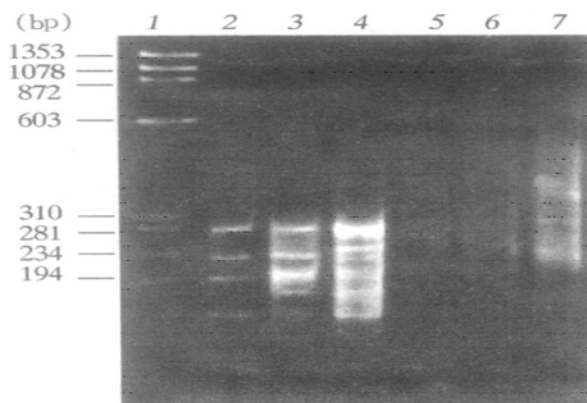


图2 cDNA RDA 的结果

8%非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳; 1: 分子质量标准 (ΦX174); 2~5: 分别为第四轮到第一轮的差异性产物; 6, 7: 分别为驱赶扩增子和检测扩增子.

2.2 DNA 印迹分析

在“检测”扩增子及第一轮到第四轮的差异性产物中, 用所回收的四个片段作探针均出现阳性结

果; 其中 3 个片段出现不止一条带的阳性信号. 而“驱赶”扩增子杂交后, 均无阳性信号出现 (图 3). 另外, 我们也在 10 对鼻咽癌及其配对的外周血进行杂交, 目的是检测这些片段是否存在基因缺失, 结果显示部分病人可能存在不同程度的缺失 (图 4).

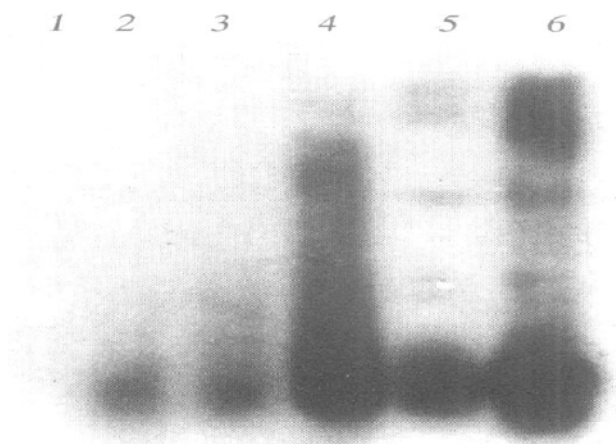


图 3 DP4 与 cDNA RDA 产物杂交

1, 2: 驱赶扩增子和检测扩增子; 3~6: 分别为第一轮到第四轮的差异性产物.

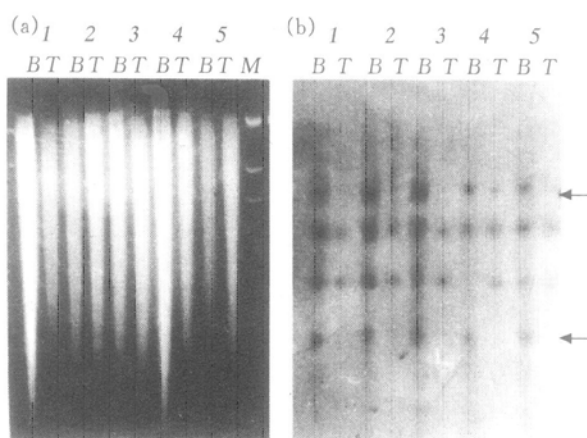


图 4 DP4 与鼻咽癌组织及配对外周血杂交

B, T: 外周血及肿瘤组织; M: 分子质量标准 λ Hind III. $\leftarrow$ 表示可能存在纯合性缺失. (a), (b) 分别为 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳及杂交结果.

2.3 RNA 印迹分析

四个探针中, 其中一个 DP4-1 在正常人鼻咽上皮细胞中及 HNE1 细胞中的某一位置同时表达, 在另一位置处仅在正常人鼻咽上皮细胞中表达; DP4-2 只在正常人鼻咽上皮的一个位置表达; DP4-3 及 DP4-4 在正常人鼻咽上皮共三个位置有阳性信号, 但在 HNE1 中其对应的位置处只有一个位点有阳性信号. 并且在 HNE1 中, 所有表达量均有下调 (图 5).

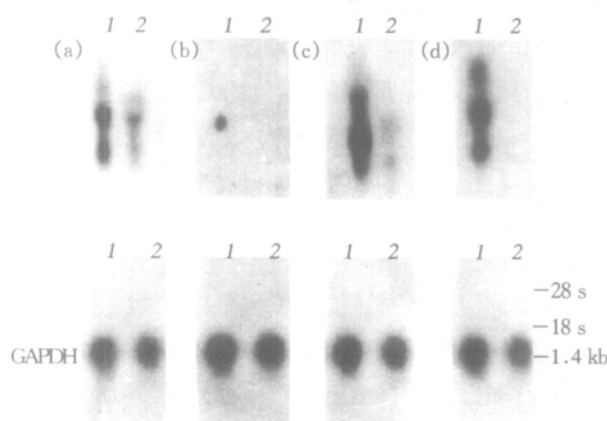


图 5 DP4 为探针与正常人鼻咽上皮及鼻咽癌细胞株 RNA 杂交

(a), (b), (c), (d) 分别为探针 DP4-1, DP4-2, DP4-3, DP4-4; 1, 2: 正常人鼻咽上皮 RNA 及 HNE1 RNA; GAPDH 为上图各自的阳性对照.

2.4 测序分析及同源性比较

40 个菌落采用酶切及 PCR 鉴定后, 经序列分析, 有 20 个独立的克隆. 其中 9 个克隆未找到同源序列; 9 个高度同源 (> 96%) 的基因, 如转化生长因子 β I 型受体相互作用蛋白 (TGF- β receptor interacting protein 1, TRIP1) 基因、TBP 相关因子 (TATA box binding protein associate factor, TAF) 基因等等; 另外还有 2 个克隆为与 EST 部分同源的序列. 详情已另文报道.

3 讨 论

从抑癌基因概念的提出到 1986 年分离鉴定出第一个抑癌基因已经过了 20 多个年头, 到今天也只筛选和克隆少数二十几个抑癌基因. 其中主要原因就是保持细胞稳定的野生型基因很难通过选择的方法鉴定出来. 运用家系谱分析和细胞遗传学方法虽然能够证明抑癌基因的存在, 但最多只能把它们定位在某个染色体的特定位置上, 而不能获得该基因^[4]. 随着分子生物学技术的发展, 才使得分离抑癌基因成为现实. 目前有数种方法用来分离和克隆抑癌基因. 在克隆鼻咽癌的抑癌基因的研究中, 曾采用基因组递减杂交法^[5]和 mRNA 差异显示法^[6]尝试分离鼻咽癌中缺失或表达降低的序列均未获得预期的结果. 因此, 采用更有效的方法寻找与分离出鼻咽癌发病有关的抑癌基因, 成为鼻咽癌发病分子机理研究的重要内容. cDNA RDA 从 RNA 入手, 研究具有相近遗传背景, 但表型不同的两组 cDNA 之间的差异序列. 该法采用识别四碱

基的限制性内切酶消化双链 cDNA, 制备具有代表性的“检测”和“驱赶”扩增子, 形成平均长度为 256 bp 的群体, 保证绝大部分遗传信息能被 PCR 扩增. 在四轮杂交和扩增中, “检测”扩增子和“驱赶”扩增子的比例为 1: 100、1: 400、1: 40 000、1: 800 000, 其结果将“检测”群体中非特异性序列全部消减掉. 由于仅在“检测”扩增子的 cDNA 片段两端连上接头, PCR 扩增采用接头中的长寡核苷酸片段作引物, 因此最终表现为缺失于“驱赶”扩增子但存在于“检测”扩增子的同源 cDNA 序列能得到显著性的富集. 最先, 应用这一方法分离到了暴露于咖啡因的前 B 淋巴细胞表达上调的几个基因^[2]; 其后, 确定了胰腺 B 细胞相关的基因^[7]等等. 考虑到该法具有高效、敏感、假阳性低的特点, 我们尝试应用这一方法分离候选的鼻咽癌抑癌基因. 结果显示, cDNA RDA 的第三轮及第四轮产物中, 即见到明显的差异性片段, 用这些片段作探针, DNA 杂交检测其来源, 表明这些序列确实来自“检测”扩增子即正常人鼻咽上皮, 而缺失于“驱赶”扩增子 HNE1 中. 从而证明这是一种非常可靠的方法. 但在应用这一方法时, 作为“检测”及“驱赶”来源的 RNA、cDNA 的质量以及在更换接头时使用高浓度的限制性内切酶 (10 U/ μ g) 是保证这一方法高效、假阳性低的绝对前提.

抑癌基因在肿瘤中表现形式主要由基因缺失导致的该基因不表达或由突变等引起的基因表达下调. 虽然细胞遗传学研究表明, 鼻咽癌中存在 3 p、7 q 和 9 p 的缺失^[8~10], 但至今尚未找到这些区域的抑癌基因. 利用配对的肿瘤组织与外周血同时进行 DNA 杂交, 显示一些位点存在这些差异性表达基因信号缺失和/或减弱, 怀疑这些区域存在纯合性或杂合性丢失 (loss of heterozygosity, LOH); RNA 杂交结果也显示这些基因在鼻咽癌中不表达或表达显著降低.

在我们所获得的差异性表达的已知基因中, 如 TRIP1^[11]、TAF (TBP 相关因子)^[12]等, 这些基因在维持细胞正常结构和功能方面均有非常重要的作用, 其表达降低和/或不表达可导致肿瘤的形成. 从而再次证明采用正常组织作为“检测”扩增子的来源, 运用 cDNA RDA 可获得抑癌基因或相当抑癌基因功能的基因.

虽然 RDA 在克隆基因的研究中表现出较大的优越性, 但这种方法要求作为配对的样品具有相同

的遗传背景. 在肿瘤研究中, 则要求组织来源于同一患者的同一部位, 这在部分实验中存在相当大的困难. 如我们从事研究的鼻咽癌, 就不太可能取到同一患者的正常鼻咽粘膜. 处理这种情况, 应对所获得的差异性序列作进一步分析, 排除个体差异导致的基因表达不平衡. 另外, 细胞培养也可能损失部分遗传信息, 采用流式细胞仪代替细胞培养去除混杂的细胞是一种更好地获得纯净靶基因的有效方法^[1].

致谢 感谢医学遗传学国家重点实验室夏家辉教授在测序分析方面的大力帮助!

参 考 文 献

- 1 Lisitsyn N, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the difference between two complex genomes. *Science*, 1993, **259** (12): 946 ~ 951
- 2 Hubank M, Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22** (25): 5640~ 5648
- 3 Yao K T, Zhang H Q, Zhu H C, *et al.* Establishment and characterization of two epithelial tumor cell lines latently infected with EBVS and derived from nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*, 1990, **45** (1): 83~ 89
- 4 王 学, 徐 静 (Wang X, Xu J). 筛选肿瘤抑制基因的方法. 国外医学遗传学分册 (*Foreign Medical Sciences — Hereditas*), 1996, **19** (3): 128~ 131
- 5 孟祥文, 李 璞 (Meng X W, Li P). 构建消减杂交文库的方法与策略. 国外医学. 遗传学分册 (*Foreign Medical Sciences — Hereditas*), 1994, **17** (3): 131~ 135
- 6 Liang P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction. *Science*, 1992, **257** (12): 967~ 969
- 7 Niwa H, Harrison L C, Deaizpurua H J, *et al.* Identification of pancreatic β cell-regulated genes by representational difference analysis. *Endocrinology*, 1997, **138** (4): 1419~ 1426
- 8 Hildesheim A, Levin P. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol Rev*, 1993, **15** (2): 466~ 485
- 9 Huang D P, Kwok-Wai L, van Hasselt C A, *et al.* A region of homozygous deletion on chromosome 9p21~ 22 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*, 1994, **54** (15): 4003~ 4006
- 10 Huang D P, Lo k, Choi P H K, *et al.* Loss of heterozygosity on the short arm of the chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1991, **54** (1): 91~ 99
- 11 Chen R H, Meltlnen P J, Mincione G, *et al.* A WD-domain protein that is associated with and phosphorylated by the type II TGF- β receptor. *Nature*, 1995, **377** (12): 548~ 552
- 12 Bertolotti A, Lutz Y, Heard D J, *et al.* hTAF_{II} 68, a novel RNA/ssDNA-binding protein with homology to the proto-oncoprotein TLS/FUS and EWS is associated with both TF II D and RNA polymerase II. *EMBO J*, 1996, **15** (18): 5022~ 5031

Screening the Candidates of Tumor Suppressor Genes in Human Carcinoma by cDNA Representational Difference Analysis. ZHAN Feng-Huang, JIANG Ning, CAO Li, DENG Long-Wen, ZHOU Ming, XIE Yi, ZENG Zhao-Yang, LI Gui-Yuan (*Cancer Research Institute, Hunan Medical University, Changsha 410078, China*).

Abstract Using cDNA from normal human primary cultures of nasopharyngeal epithelial cells as tester amplicon and cDNA from nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line HNE1 as driver amplicon, four differential cDNA fragments were isolated by cDNA representational difference analysis (RDA). While these differential cDNA fragments were hybridized to

amplicons by DNA blot, it was found that they really came from the tester amplicon. In addition, RNA blot also revealed that the differentially expressed fragments were not expressed or down-regulated in the NPC HNE1 cells; and sequence analysis also indicated that those differentially expressed fragments may include tumor suppressor gene relative to NPC. Therefore, it shows that the cDNA RDA is an effective, sensitive and specific method for screening the candidates of tumor suppressor gene.

Key words nasopharyngeal carcinoma, tumor suppressor gene, cDNA representational difference analysis (RDA)

大肠杆菌表达的单链抗体柱复性的研究*

朱迎春 王 琰 高荣凯 刘群英 化 冰 陈宇萍

(海军总医院中心实验科, 北京 100037)

摘要 对包含体表达的抗乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 的单链抗体 (ScFv) 纯化复性进行了探索. 尝试了利用金属螯合亲和层析和凝胶层析柱进行柱上在位复性的可行性. 对包含体表达的 ScFv 进行透析复性与柱复性, 比较其相对复性率及蛋白质回收率, 发现柱上复性效果优于传统的透析复性. 抗 HBsAg ScFv 经凝胶色谱 Sephacyl S-200 柱复性的相对复性率为 98%, 蛋白质回收率为 81%. 由于将纯化复性同步进行, 简化了操作程序, 提高了产品的回收率.

关键词 单链抗体 ScFv, 包含体, 纯化, 复性

学科分类号 R392

单链抗体 (single chain Fv, ScFv) 是由抗体重链可变区 V_H 和轻链可变区 V_L 通过一段连接肽连接而成的重组蛋白质. 由于其分子质量小, 穿透力强, 免疫原性低, 利于基因工程操作等特点, 具有良好的应用前景. 近年来国内外学者对单链抗体进行了大量研究. 本室构建了抗乙肝病毒表面抗原 (HBsAg) 的 ScFv, 并在大肠杆菌表达体系中以包含体形式获得高效表达^[1, 2], 由于包含体为没有活性的变性蛋白质, 其纯化和复性是大量制备 ScFv 的重要环节. 传统的稀释透析复性方法对包含体蛋白质的复性效率较低, 操作复杂, 限制了生物技术的开发应用. 为此我们对包含体表达的抗 HBsAg ScFv 的柱上在位复性进行了探索. 变性溶解的包含体 (抗 HBsAg ScFv) 可直接经凝胶色谱 Sephar-

cyl S-200 进行柱上在位复性, 其相对复性率为 98%, 蛋白质回收率为 81%. 这种将纯化和复性结合在一起的柱上复性方法简化了操作程序, 提高了蛋白质的回收率, 具有很好的应用前景.

1 材料和方法

1.1 仪器

快速蛋白质液相色谱仪 (FPLC) (Pharmacia 公司).

1.2 实验材料

菌株质粒, 大肠杆菌 BL21 (DE3) 为本室保

* 国家 863 计划 (863-102-09-02-01) 和全军医药卫生重点项目 (96Z004) 资助.

收稿日期: 1997-12-15, 修回日期: 1998-04-24