

肾癌相关基因克隆——肾癌 cDNA 消减文库的构建*

张 强 毛泽彬¹⁾ 张志文²⁾ 辛殿旗 郭应禄

(北京医科大学第一附属医院, 泌尿外科研究所, 北京 100034)

摘要 应用抑制性消减杂交技术, 构建人肾癌与正常肾差异表达的 cDNA 消减文库. 分别从肾癌及正常肾细胞系中提取 poly (A)⁺ RNA, 依次合成单链及双链 cDNA, 经酶切成平均大小为 400~ 600 bp 的片段, 将肾癌 cDNA 分为两组, 分别与两种不同的接头衔接, 再与正常肾 cDNA 进行两次消减杂交及两次抑制性 PCR 后, 将产物与 T/A 载体连接构建成功 cDNA 消减文库, 并转染大肠杆菌进行文库扩增. 构建成功具有高消减效率的人肾癌 cDNA 消减文库, 非特异性 cDNA 片段被有效地消减, 特异表达的 cDNA 得到富集. 文库扩增后得到 6 500 个克隆, 随机挑取 350 个制备质粒, 酶切分析均得到 400~ 600 bp 插入片段. 所构建的人肾癌 cDNA 消减文库为进一步大批量筛选、克隆肾癌特异性表达的未知新基因奠定了基础.

关键词 肾肿瘤, 癌, 抑制性消减杂交, 文库

学科分类号 R394. 3, R737. 11

肾癌的发生发展与多种基因的突变与表达异常有关. 本课题首次应用抑制性消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术构建了由肾癌和正常肾之间差异表达的 cDNA 片段组成的 cDNA 消减文库, 为进一步筛选出肾癌特异表达的未知新基因奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 肾癌和正常肾细胞系

肾癌细胞系 GRC-1 (由北京医科大学泌尿外科研究所免疫室提供), 正常肾细胞系 HK-2 由美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心惠赠, 均为原代培养的细胞系, 液氮冻存复苏后, 培养至细胞最佳生长状态.

1.2 试剂

mRNA Purification 试剂盒为美国 Pharmacia Biotech 公司产品; PCR-Select cDNA Subtraction 试剂盒, 50 × PCR Enzyme Mix、Advantage PCR Cloning 试剂盒为美国 Clontech 公司产品, 限制性内切酶 *EcoR* I 为美国 Promega 公司产品. 质粒载体为 PT-Adv 质粒, 长度为 3 890 bp, 抑制性 PCR 产物以 T/A 方式接入载体. 文库扩增使用感受态大肠杆菌 Top10F'. 联合应用氨苄青霉素 (50 mg/L) 及 β-半乳糖苷酶 α 互补作用显色反应 (显色剂为 X-gal/IPTG) 筛选阳性克隆. PCR 扩增仪为 Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480.

1.3 抑制性消减杂交

1.3.1 肾癌及正常肾细胞系 poly (A)⁺ mRNA 的

提取: GRC-1 及 HK-2 细胞各 1×10^7 , 使用 mRNA Purification 试剂盒, Oligo (dt) -Cellulose 柱层析法直接提取 poly (A)⁺ RNA, 严格按说明书进行并进行定性定量分析.

1.3.2 单链 cDNA (sscDNA) 及双链 cDNA (dscDNA) 合成: 按 Diatchenko^[1] 的方法进行, 取 poly (A)⁺ RNA 4 μl (2 μg) 和 cDNA 合成引物 1 μl, 70 °C 退火结合 2 min 后, 加入白血病病毒 (MMLV) 逆转录酶 (200 U) 及 dNTP 组成反应体系, 总体积 10 μl, 42 °C 延伸 1.5 h. 立即在 sscDNA 合成体系中加入 DNA 聚合酶 I、RNase H、*E. coli* DNA 连接酶、dNTP 组成总体积 80 μl 的反应体系, 16 °C 孵育 2 h 后加入 6 U T4 DNA 聚合酶, 16 °C 再反应 30 min 后, 用酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 纯化, 95% 乙醇/4 mol·L⁻¹ 乙酸钠沉淀 dscDNA, 并溶于 50 μl 水中.

1.3.3 肾癌 dscDNA 经 *Rsa* I 酶切后与两种接头衔接: 将合成的 dsDNA 43.5 μl 与 15 U *Rsa* I 及酶切缓冲液组成总体积 50 μl 反应体系, 37 °C 反应 5 h 后, 用酚/氯仿/异戊醇提纯, 95% 乙醇沉淀, 并溶于 5.5 μl 水中. 以肾癌为试验方 (tester), 正常肾为参照方 (driver), tester dscDNA 以 1:6 稀释后, 分为两组, 各 2 μl, 分别为接头 1.2 (adaptor 1.2) 连接, 16 °C 反应过夜后进行连接效率检测.

* 国家自然科学基金资助项目 (39870841).

¹⁾ 北京医科大学生物化学与分子生物学系.

²⁾ 北京医科大学生理系.

Tel: (010) 66171122-2604

收稿日期: 1999-06-17, 修回日期: 1999-10-25

Adaptor 1: 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGC CC GGGC AGGT-3'
3'- CCGG TCCA-5'

Adaptor 2: 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGG TG CGG AGGG CGGT-3'
3'- GCC TCCC GCCA-5'

1.3.4 两次消减杂交: 在鉴定连接效率满意 (> 25%) 后, 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的 tester dscDNA 1.5 μ l 分别与 1.5 μ l driver dscDNA 在 68 $^{\circ}$ C 下杂交 8 h 后, 立即将两组经过第一次消减杂交的体系混合, 另加新变性的 driver cDNA 1 μ l, 68 $^{\circ}$ C 杂交过夜. 加 200 μ l 缓冲稀释.

1.3.5 两次抑制性 PCR (巢式 PCR) 及抑制效率检测: 取 1 μ l 稀释后的第二次杂交后的产物, 在 50 $\times$ advantage klen Taq 聚合酶作用下, 以 adaptor 1 及 adaptor 2 的外侧序列分别为 5' 及 3' 引物 (5' 引物序列 5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3', 3' 引物序列 5'-TGTAGCGTGAAGACGACAGAA-3'), 进行第 1 次 PCR 扩增, 取第 1 次 PCR 产物 3 μ l, 1:10 稀释后取 1 μ l, 在 50 $\times$ advantage klen Taq 聚合酶作用下, 以 adaptor 1 及 adaptor 2 的内侧序列分别为 5' 及 3' 的巢式 PCR 引物 (5' 引物序列 5'-TCGAGCGGCCGCCGGGCAGGT-3'), 进行第 2 次 PCR 扩增, 并进行 PCR 产物消减效率检测 (将未经抑制消减的肾癌 cDNA 同时进行 PCR 对照).

1.4 cDNA 消减文库的构建

按 Clark 等^[2]的方法, 取 3 μ l (约 8 ng) PCR 产物及 2 μ l PT-Adv 线性化质粒载体, 在 1 μ l (4 weis单位) T4 DNA 连接酶的作用下, 按摩尔比 1:1 建立总体积 10 μ l 的反应体系, 14 $^{\circ}$ C 反应过夜后, -20 $^{\circ}$ C 保存.

1.5 cDNA 消减文库的扩增及初步鉴定

取 2 μ l 连接反应产物, 加入含 2 μ l β -巯基乙醇的 50 μ l 感受态大肠杆菌 Top10F' 中, 经水浴、热休克, 另加 250 μ l SOC 液, 置 37 $^{\circ}$ C 水浴中, 225 r/min 摇菌 1 h, 取 200 μ l 菌液种植于含 50 mg/L 氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG 培养板上, 37 $^{\circ}$ C 培育 18 h. 计数培养板中直径 > 1 mm 清晰的白色及蓝色菌落数, 随机挑取 350 个白色菌落, 按 Sambrook 等^[3]的方法制备质粒, 并进行酶切分析.

2 结 果

2.1 mRNA 的定性定量分析

紫外分光检测显示共提取肾癌及正常肾 poly (A)⁺ RNA 分别为 5.08 μ g 和 5.12 μ g, A_{260}/A_{280}

> 1.90, 从 1.0% 琼脂糖凝胶电泳中可见 mRNA 为大于 0.5 kb 清晰慧尾片状条带, 证实 mRNA 质优量足 (图 1).

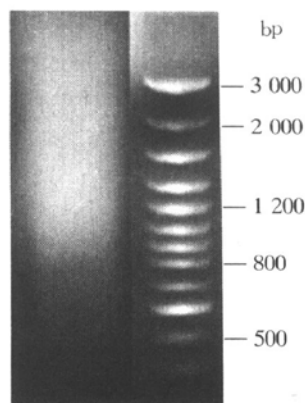


图 1 mRNA 琼脂糖凝胶电泳分析结果
mRNA 呈清晰慧尾状条带.

2.2 dscDNA 两端连接效率检测

dscDNA 与接头连接效率的高低是决定抑制性消减杂交成败的最关键步骤. 将连接有 adaptor 1 和 adaptor 2 的两组肾癌 dscDNA 分别用 G3PDH3'、5' 引物及以 G3PDH3' 引物和接头部序列为 5' 引物进行 30 个循环扩增, 产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳鉴定. 结果显示: 两组肾癌 dscDNA 连接效率均高于 80%, 说明 80% 以上 dscDNA 已与接头连接 (图 2).

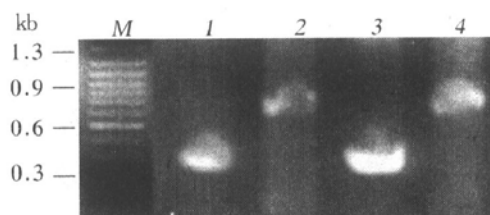


图 2 dscDNA 两端连接效率琼脂糖凝胶电泳鉴定

1、2: 与 adaptor 1 连接组; 3、4: 与 adaptor 2 连接组; 1、3: 以 G3PDH3'、5' 引物; 2、4: 以 G3PDH3' 引物和接头部序列为 5' 引物; M: 分子质量标准. 结果显示灰度比值: 2/1、4/3 均大于 80%.

2.3 cDNA 消减文库消减效率的鉴定

此步骤是评价消减文库价值的决定性环节, 各取 1 μ l 抑制性 PCR 产物和非抑制性 PCR 产物为模板, 分别用看家基因 G3PDH 及肾癌中高表达而正常肾中表达很低甚至不表达的癌基因 c-myc 片段^[4]

的引物进行 PCR 扩增, PCR 反应体系 30 μ l, 分别在 28、33、38、43 循环结束时从体系中吸取 5 μ l 进行电泳鉴定, 结果显示: 与非抑制性 PCR 产物相比, 抑制性 PCR 产物中非特异性表达 G3PDH 基因产物大大减少 (图 3a), 而特异性高表达的 *c-myc* 基因大量富集 (图 3b), 说明所构建的消减文库具有很高的消减效率。

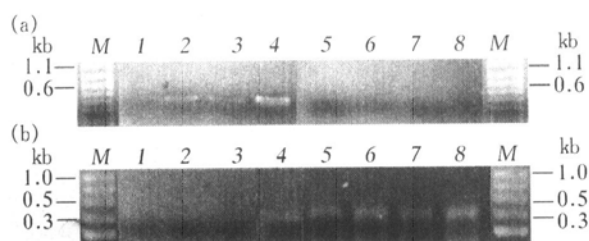


图 3 G3PDH 基因片段和 *c-myc* 基因片段扩增后电泳图谱 (a) G3PDH 基因片段扩增后丰度降低; (b) *c-myc* 基因片段扩增后丰度增高。1、2、3、4: 非抑制性 PCR 产物; 5、6、7、8: 抑制性 PCR 产物; 1、5: 28 个循环后产物; 2、6: 33 个循环后产物; 3、7: 38 个循环后产物; 4、8: 43 个循环后产物; M: 分子质量标准。

2.4 cDNA 消减文库扩增及克隆的初步鉴定

扩增后 cDNA 消减文库包含约 6 500 个白色克隆和 150 个蓝色克隆, 克隆饱满清晰。随机挑取 350 个白色克隆, 制备质粒后, 以 *Eco*R I 酶切分析, 350 个克隆均载有 400~600 bp 大小片段 (图 4), 与理论设计大小相符。

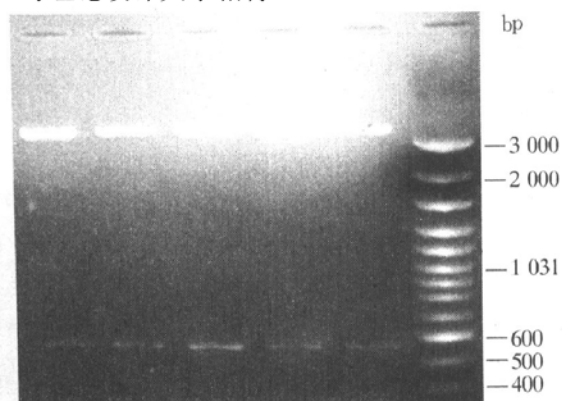


图 4 质粒酶切电泳分析结果
从随机挑取的克隆中, 均载有 500~600 bp 大小的插入片段。

3 讨论

肾癌是一种生物学行为奇特多变的肿瘤, 病因至今不清, 近年来遗传学研究表明抑癌基因 VHL、WT1 的突变, 原癌基因 *c-myc* 和 EGFR mRNA 的过表达与肾癌发生有关, 但均非肾癌特异性表达的基因^[5~7]。目前国外研究的热点集中于对肾癌特

异性基因的克隆与鉴定, 构建一般的基因组文库或 cDNA 文库并进行筛选是较普遍的方法, 但因其特异性差, 筛选阳性率低, 故进展缓慢。

1996 年, Diatchenko 等^[1]在抑制性 PCR 的基础上首次发明了抑制性消减杂交技术 (suppression subtractive hybridization, SSH), 并成功地构建了睾丸肿瘤特异性 cDNA 消减文库, 并从随机挑选的 62 个克隆中, 鉴定出了 42 个睾丸肿瘤特异的新基因, 使对睾丸肿瘤的研究取得了巨大进展。此后 SSH 技术相继应用于乳腺癌、肾上腺癌等肿瘤特异性基因的克隆^[8], 均取得成功, 但至今尚无肾癌等泌尿系统肿瘤消减文库构建及基因克隆的报道。抑制性消减杂交技术构建 cDNA 消减文库的原理如下: 分别提取杂交双方实验方 (tester, 如肾癌) 和参考方 (driver, 如正常肾) 的 mRNA, 反转录成 cDNA 后用 *Rsa* I 内切酶切割成平均 600 bp 大小平端片段, 之后将 tester cDNA 分为两组, 分别于其 5' 端上接上两种不同的具有一段反向末端重复序列的寡聚核苷酸接头 (adaptor 1, adaptor 2) 以利于以后选择性扩增, 两组 tester cDNA 样品分别与过量的 driver cDNA 进行第 1 次杂交, 使原来丰度不同的单链 cDNA 相对含量达到基本一致, 同时使 tester DNA 中特异表达基因的 cDNA 得到大量的富集, 两组产物另加上新变性的 driver cDNA 再次杂交, 这样就产生了两个 5' 端有两个不同接头的 e 型分子, 这种 e 型 cDNA 正是 tester 较 driver 特异表达的 cDNA, 填平粘性末端, 以两个长接头序列分别设计成内外两对引物, 利用巢式 PCR 原理扩增, 基于 PCR 抑制效应的存在, 仅 e 型分子即特异性表达的 cDNA 片段才能指数扩增, 这样经过抑制性消减杂交后, 极大地提高了产物的特异性。将 e 型 cDNA 片段插入载体即构建成功以特异性 cDNA 片段为主的 cDNA 消减文库。它较普通的基因组文库或 cDNA 文库优点在于: a. 特异性: 通过 SSH 技术中装上接头, 两轮消减杂交, 两轮抑制性 PCR, 大量特异扩增那些代表了差异表达的 cDNA 片段, 抑制了非特异性片段, 使各种消减文库特异性达 60%~95%^[1,9,10], 大大减少了进一步筛选的复杂性。b. 有一个归一化 (normalization) 过程, 在第一次杂交过程中, 由于杂交二级动力学的原因高丰度的转录物易退火, 这样高、低丰度序列浓度便变得一致, 实验证明经过一轮消减即可对稀少片段几个分子富集达 1 000~5 000 倍, 这样对低丰度的差异表达基因也能有效地克

隆^[9,11], 这是普通基因组文库和 cDNA 文库无法达到的. c. 方法简便易行, 仅需 1~ 2 μg mRNA, 操作熟练仅需 10~ 15 d 即可构建成功. d. 载体的二次 PCR 产物可作为后期 RNA 印迹, 狭缝杂交, DNA 测序的探针, 制备简便, 特异性高.

本研究首次应用抑制性消减杂交的方法, 经严格检验成功地构建了高特异性的人肾癌 cDNA 消减文库. 经过消减效率鉴定表明象看家基因 G3PDH 这样非特异性表达的 cDNA 片段得到了高度抑制, 而特异性的 c-myc 基因的 cDNA 得到了充分的富集, 这表明所构建的 cDNA 文库是高度特异的. 文库扩增后得到 6 500 个阳性克隆, 随机挑取 350 个酶切分析证实每个克隆的质粒内均载有单一片段, 平均 500~ 600 bp 大小不等, 这提示扩增文库中的每一克隆可能均载有高特异性目的片段. 人肾癌 cDNA 消减文库构建的意义在于: 它大大减少了进一步应用 RNA 印迹、RT-PCR、DNA 测序等技术筛选、克隆 (正在试验中) 肾癌特异基因的盲目性, 大大提高了特异性; 并且有利于克隆出低丰度的稀有基因, 为基础研究肾癌的发生、发展提供重要的突破口, 为临床上肾癌的预防、早期特异性诊断、基因治疗提供了新的重要工具.

参 考 文 献

- 1 Diatchenko L, Lau Y F C, Campbell A P, *et al.* Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93** (18): 6025~ 6030
- 2 Clark J M. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 1988, **16** (15): 9677~ 9686
- 3 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, *et al.* Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd. New York: Science Press, 1992. 18 ~ 24
- 4 Bhat-HK, Springer I, Rajaraman S, *et al.* Immunocytochemical localization of c-myc and C-jun oncoproteins in hamster kidney and estrogen-induced kidney tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1997, **60** (1~ 2): 99~ 104
- 5 Linehan W M, Lerman M I, Zbar B. Identification of the von Hippel-Lindau (VHL) gene, its role in renal cancer. *JAMA*, 1995, **273** (2): 564~ 570
- 6 Hewitt S M, Hamada S, McDonel T J, *et al.* Regulation of the protooncogenes bcl-2 and c-myc by the Wilms' tumor suppressor gene WT1. *Cancer Res*, 1995, **55** (18): 5386~ 5389
- 7 Walther M M, Jennings S B, Gnarr F R, *et al.* Molecular genetics of renal cell carcinoma. In: Vogelzang N J, Scardino P T, Shipley W U, eds. *Comprehensive Textbook of Genitourinary Oncology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 160~ 170
- 8 Kuang W W, Thompson D A, Hoch R V, *et al.* Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (4): 1116~ 1123
- 9 Gurskaya N G, Diatchenko L, Chenchik A, *et al.* Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: Cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal Biochem*, 1996, **240** (1): 90~ 97
- 10 Wong B R, Park C G, Lee S Y, *et al.* Identifying T-cell signaling molecules with the CLDNTECH PCR-select cDNA subtraction kit. *Cldntechiques*, 1996, **XI** (3): 32~ 33
- 11 von Stein O D, Thies W G, Hofmann M, *et al.* A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25** (13): 2598~ 2602

Cloning of Renal Cell Carcinoma Relation Gene: Construction of a cDNA Subtractive Library of Human Renal Cell Carcinoma and Its Significance.

ZHANG Qiang, MAO Ze-Bin, ZHANG Zhi-Wen¹⁾, XIN Dian-Qi, GUO Ying-Lu (Urological Department of the First Teaching Hospital, Beijing Medical University, Beijing 100034, China; ¹⁾Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China).

Abstract To construct a cDNA subtractive library of human renal cell carcinoma (RCC) with technique called suppression subtractive hybridization. The library only contains the differently expressing cDNAs between RCC and normal kidney. Poly (A)⁺ RNA were isolated from cell lines of RCC and normal kidney respectively. Moreover, single-strand cDNAs and double-strand cDNAs were synthesized in turn. After enzyme restriction, cDNAs between 400 ~ 600 bp were obtained. RCC cDNAs then were divided into two groups and ligated to the specific adaptor 1 and adaptor 2 respectively. After RCC cDNAs hybridized with normal kidney cDNA twice and underwent two times of nested PCR, then with arms of T/A plasmid vectors to set up the subtractive library. Amplification of the library was carried out with the *E. coli* strain Top 10F'. Human RCC subtractive library with high subtractive efficiency was set up successfully. The amplified library contains 6 500 positive clones. Random analysis of 350 clones with enzyme restriction shows that all plasmids in the clones contain 400~ 600 bp inserts. The constructed cDNA subtractive library of human RCC is a highly efficient one and lays solid foundation for screening and cloning new and specific oncogenes or tumor suppressor genes of RCC.

Key words kidney neoplasms carcinoma, suppression subtractive hybridization, library