

技术与方法

人胚鼻咽上皮细胞 cDNA 文库的构建及鼻咽癌
相关基因的筛选*

张必成 曹利 钱骏 余鹰 李伟芳 向娟娟 李桂源**

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 长沙 410078)

摘要 为了进一步分离人鼻咽组织特异性表达基因和鼻咽癌特异相关基因, 采用 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) 技术, 构建了人胚鼻咽上皮 cDNA 文库。从原代培养的人胚鼻咽上皮分离总 RNA 并纯化 mRNA, 利用经修饰的 oligo (dT) 引物 (含 *Sfi* I B 酶切位点) 合成 cDNA 第一链, 同时根据真核生物 mRNA 5' 端帽子结构特点, 利用 SMART 核苷酸 (含 *Sfi* I A 酶切位点) 作为 cDNA 第一链在 mRNA 5' 端延伸出去的模板, 进而以此序列为引物利用 LD-PCR (long distance PCR) 合成双链 cDNA, 双链 cDNA 经 *Sfi* I (I A 和 I B) 酶切和过柱分级分离后, 克隆入经 *Sfi* I 酶切的 λ TriplEX2 载体后经体外包装而成 cDNA 文库。结果表明, 原始人胚鼻咽上皮 cDNA 文库获得 1.0×10^6 个重组子, 重组率达 96%。文库扩增后, 滴度达 7.8×10^9 pfu/ml, 插入 cDNA 平均长度为 1.2 kb, 用 PCR 从该文库扩增出本实验室新克隆的鼻咽癌相关基因 NAG4 的全长 cDNA。构建的人胚鼻咽上皮 cDNA 文库具有良好的质量, 该 cDNA 文库为进一步筛选、克隆鼻咽癌抑癌基因及鼻咽组织特异性表达基因奠定了基础。

关键词 鼻咽, 胚胎, cDNA 文库, 基因克隆, NAG4

学科分类号 R739.63

鼻咽癌 (nasopharyngeal carcinoma, NPC) 是一种我国南方常见的上皮源性恶性肿瘤。鼻咽癌的发病是与 EB 病毒感染、遗传因素和环境因素有关的多因素多步骤的过程, 在这个过程中可能涉及到多个癌基因的激活与抑癌基因的失活, 但其分子发病机理仍不十分清楚。在目前已发现的抑癌基因中, p53 基因在鼻咽癌中突变率极低, 但 p53 蛋白有高水平的表达, 推测与 EB 病毒的瘤蛋白和/或细胞瘤蛋白有关^[1]; p16 基因在鼻咽癌中虽无点突变, 但存在表达下调, 认为可能与 p16 基因的异常甲基化有关^[2]; RB、WAF1/CIP/P21, VHL 等抑癌基因在鼻咽癌基因组中均没有突变和表达下调^[3]。国际上至今尚未获得鼻咽癌特异相关基因和人鼻咽组织特异性表达基因。我们实验室通过大规模全基因组扫描发现在 3P 和 9P 存在恒定的染色体缺失, 这些结果强烈提示鼻咽癌基因组中可能存在尚未发现的易感/抑癌基因。构建不同组织细胞或同一组织不同发育阶段及其病变组织 cDNA 文库为研究组织发育、分化和病变提供了方便而有效的遗传资源, 本实验室在成功构建成人鼻咽组织

cDNA 文库的基础上^[4], 又构建人胚鼻咽上皮 cDNA 文库, 将为鼻咽及鼻咽癌特异性相关基因的进一步克隆及其功能研究提供重要的实验工具。

1 材料与方法

1.1 材料

水囊引产的 6 月龄左右的胚胎 10 例由中南大学湘雅医院提供, 经患者同意。

cDNA 合成引物: SMART III 寡核苷酸: 5'-AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT **GGCCATTAT-GGCCGGG**-3' (*Sfi* I A 酶切位点), CDS III 3' PCR 引物: 5'-ATTCTAGA **GGCCGAGGCGGCCG**-CATG-d(T)₃₀N-1 N-3' (N = A, G, C 和 T; N-1 = A, G 和 C) (*Sfi* I B 酶切位点), 5' PCR 引物: 5'-

* 国家“863”项目(102-10-01-05)国家重点基础研究发展规划项目(973)(G1998051008)和国家自然科学基金(39800078)资助。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805446, E-mail: lgy@public.cs.hn.cn

收稿日期: 2001-06-16, 接受日期: 2001-07-23

AGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'; λ TripIEx2 插入子筛选引物: 5' 引物: 5'-CTCGG-GAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3', 3' 引物: 5'-ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCG-3'.

NAG4 基因全长 cDNA PCR 扩增引物如下. 5' 引物: 5'-CAGATTCCAGGGGAAGAAAAGGGGA-3', 3' 引物: 5'-GGTCCACACTCAGCAACATCCGTC-3'.

SMARTTM cDNA library construction kit 购自 Clontech 公司, LD-insert screening amplicon sets 购自 Clontech 公司, mRNA separator kit 购自 Clontech 公司, MaxPlaxTM lambda packaging Extract 购自 Epicentre Technologies 公司.

1.2 人鼻咽上皮组织原代培养

将经水囊引产的 6 月龄左右的人胚胎, 在超净台里快速分离人鼻咽上皮组织, 置于 Hank's 液中, 剔除周围结缔组织及其他成分, 将组织块剪碎成 0.5~1 mm³ 小块, 0.25% 胰酶处理 5 min, Hank's 液冲洗两次, 收集组织碎片, 加数滴培养基 (RPIM-1640 培养基和 20% 小牛血清) 混合, 用弯头吸管将组织块均匀贴壁在培养瓶壁, 37℃, 干贴壁培养 5~10 h, 然后轻轻翻转培养瓶, 让培养基浸透组织块. 每 2~3 天观察一次, 换培养液和去成纤维细胞, 大约 3~4 周可长满全瓶.

1.3 总 RNA 抽提和 mRNA 的分离

按照 TRIzolTM 试剂盒 (Gibco BRL 公司) 操作程序提取人胚鼻咽上皮总 RNA, 后用 DNase I 消化 RNA 中痕量 DNA, 反应混合物为: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 6 mmol/L MgCl₂, 1U DNase I 每微克 RNA, 1U RNasin 每微升反应体积, 37℃, 1 h, 加等体积酚/氯仿, 氯仿各抽提一次, 加终浓度为 0.3 mmol/L NaAc (pH 5.2), 无水乙醇沉淀, 75% 乙醇洗 2 次, 风干后溶解. 用紫外分光光度计测定其浓度. 经 PCR 扩增 GAPDH 检测无特异扩增条带以保证 DNA 消化完全. 根据 oligo (dT) 与 mRNA 3' 端 poly (A) 尾的互补配对特性, 采用 oligo (dT) 亲和层析柱纯化人胚鼻咽上皮细胞 mRNA, 按 mRNA 分离试剂盒 (Clontech 公司) 操作程序进行.

1.4 第一链 cDNA 的合成

取 1 μ g 人胚鼻咽上皮 mRNA, 在含有 50 mmol/L Tris (pH 8.3)、6 mmol/L MgCl₂、75 mmol/L KCl 和 1 mmol/L DTT 的 10 μ l 反应体积中加入 10 μ mol/L 的 CDS III/3' PCR 引物和 10 μ mol/L SMART III 寡核苷酸各 1 μ l, 加入

SuperScript II 逆转录酶 (200 U/ μ l, Gibco BRL 公司) 1 μ l, 置 42℃ 空气浴 1.5 h, 逆转录成 cDNA 第一链.

1.5 引物延伸法合成双链 cDNA

加入 25 mmol/L 的 NaOH 1 μ l, 68℃, 30 min. 在含有 40 mmol/L Tricine-KOH (pH 9.2)、15 mmol/L KOAc、3.5 mmol/L Mg (OAc)₂、3.75 mg/L BSA 的 100 μ l 反应体积中取 cDNA 第一链逆转录产物 11 μ l, 加入 10 μ mol/L 的 CDS III/3' PCR 引物和 5' PCR 引物各 2 μ l, 加入 Advantage cDNA 聚合酶 2 μ l, 采用引物延伸法结合 LD-PCR 以获得双链 cDNA: 72℃ 延伸 10 min, 95℃ 变性 1 min, 95℃ 变性 15 s, 68℃ 复性延伸 8 min 进行 6 个循环.

1.6 cDNA 的克隆

取双链 cDNA 的 PCR 产物 50 μ l, 加入 2 μ l 蛋白酶 K (20 g/L), 45℃ 20 min, 以灭活 DNA 聚合酶的活性后, 等体积苯酚/氯仿, 氯仿抽提各一次, 酒精沉淀后, 溶于 79 μ l H₂O 中, 加入 10 μ l *Sfi* I (20 U/ μ l) 酶切 3 h, 双链 cDNA 经过 CHROMA SPIN-400 柱进行分级分离, 收集 1~18 管, 每管 1 滴. 分别取 3 μ l 在 1% 琼脂糖凝胶上 150 V 电泳 10 min, 收集符合要求的 4 管, 加糖原共沉淀后, 用 7 μ l H₂O 溶解 cDNA. 设定 cDNA 与载体 λ TripIEX2 (*Sfi* I A-B-digested arm) 的不同比例连接反应体系, 载体与 cDNA 体积比分别为 1:0.5, 1:1, 1:2, 加入 T4DNA 连接酶, 16℃ 连接过夜.

1.7 cDNA 与 Lambda DNA 连接产物的体外包装

采用 MaxPlaxTM lambda packaging Extract (Epicentre Technologies 公司) 包装以上三种不同比例连接产物. 从 -70℃ 快速取出包装抽提物, 融化后速将连接产物加入包装抽提物中, 30℃ 水浴 3 h, 加入 450 μ l 噬菌体稀释液和 25 μ l 氯仿. 混匀后取 10 μ l, 用噬菌体稀释液做梯度稀释后, 铺平板, 测定文库的容量, 同时在涂有 X-Gal 和异丙基硫代- β -D-半乳糖苷 (IPTG) 的平板上铺平板, 以测定文库的重组率.

1.8 cDNA 文库的扩增及质量鉴定

以每板 6 $\times$ 10⁴~7 $\times$ 10⁴ 克隆数在 150 mm 平板上铺板, 待噬菌斑生长融合后, 加入 12 ml 噬菌体稀释液置 4℃ 过夜, 然后置摇床洗脱 1 h, 收集洗脱液, 加入 1/5 体积氯仿振荡 2 min, 离心后取上清即为扩增 cDNA 文库. 将其作 1:25 $\times$ 10⁴ 稀释,

铺平皿, 以测定文库的滴度. 并随机挑取 40 个噬菌斑, 分别加入 30 μ l 噬菌体稀释液中, 置 4 $^{\circ}$ C 过夜. 取 5 μ l 噬菌体稀释液, 在含有 40 mmol/L Tricine-KOH (pH 9.2)、15 mmol/L KOAc、3.5 mmol/L Mg (OAc)₂、3.75 mg/L BSA 的 50 μ l 反应体积中加入 20 μ mol/L 的 λ TripIEx2 插入子筛选引物各 1 μ l, 加入 Advantage cDNA 聚合酶 1 μ l, 用 LD-PCR 扩增插入 cDNA 片段大小, PCR 反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 4 min, 循环 35 次后, 68 $^{\circ}$ C 保温 8 min, 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖电泳胶中鉴定插入 cDNA 片段的大小.

1.9 鼻咽癌相关基因 NAG4 的筛选

取扩增的人胚鼻咽上皮 cDNA 文库 1 μ l 加入 10 μ mol/L 的 NAG4 全长 5'、3' 引物各 1 μ l, 加入 Advantage cDNA 聚合酶 1 μ l, 组成 40 mmol/L Tricine-KOH (pH 9.2)、15 mmol/L KOAc、3.5 mmol/L Mg (OAc)₂、3.75 mg/L BSA 的 50 μ l 反应体系进行 PCR 扩增, PCR 反应参数为: 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 68 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 循环 35 次后, 72 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖电泳胶中鉴定扩增 cDNA 片段的大小.

2 结 果

2.1 人胚鼻咽上皮细胞总 RNA 的提取和 mRNA 的纯化

高质量总 RNA 的提取及其 mRNA 的纯化是构建 cDNA 文库的关键. 本研究采用 Trizol 试剂快速提取其总 RNA. 紫外测定表明 A_{260}/A_{280} 介于 1.9~2.0 之间, 28S 和 18S 条带清晰、比值恰当. 用 DNase I 消化 RNA 中痕量 DNA 后, 经 PCR 扩增 GADPH 检测, 无特异扩增条带. 分离的 mRNA 的大小分布符合要求, 说明提取的总 RNA 和分离的 mRNA 质量良好, 符合反转录的要求.

2.2 cDNA 的合成

采用 SMART 技术, 取 1 μ g 人胚鼻咽上皮细胞 mRNA, 反转录合成单链 cDNA, 进而通过引物延伸法结合 LD-PCR 获得双链 cDNA, 取 5 μ l PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, cDNA 产物分布在 0~9 kb 范围, 由此可见, 本实验 cDNA 合成体系较好 (图 1).

2.3 cDNA 的克隆

将 50~150 ng 的 cDNA 与 0.5 μ g λ TripIEx2

载体连接, 经体外包装后得到人胚鼻咽上皮细胞 cDNA 文库, 文库容量为 1.0×10^6 . 在涂有 X-Gal、IPTG 的平板上进行蓝/白斑筛选, 测定此文库重组率约为 96%.

2.4 cDNA 文库的鉴定

成人鼻咽组织 cDNA 文库经扩增后, 测定文库滴度为 7.8×10^9 pfu/ml, 随机挑选 40 个克隆进行 PCR 以鉴定 cDNA 插入子大小, 插入片段大小分布于 0.5~4.0 kb 之间, 平均长度为 1.2 kb (图 2), 说明所构建 cDNA 文库的质量高.

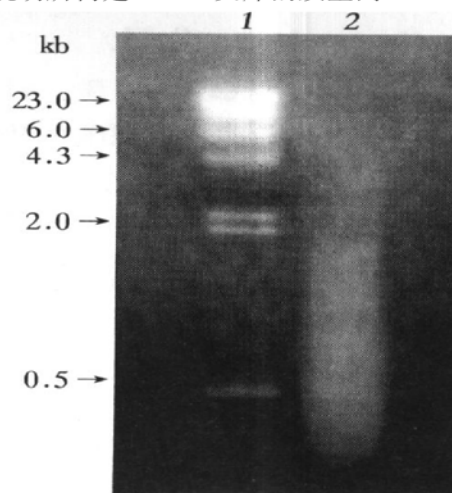


Fig. 1 dscDNA synthesized by primer extension and LD-PCR was electrophoresed on 1.0% agarose gel

1: λ DNA/Hind III marker; 2: dscDNA.

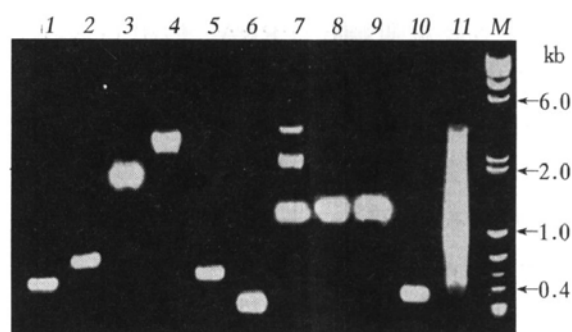


Fig. 2 The inserts of the random clones from human embryonic nasopharynx cDNA library were identified by PCR

1~10: the PCR products of the clones picked randomly from the cDNA library; 11: the PCR products of the cDNA library; M: λ DNA/Hind III+ PBR322/Alu I markers.

2.5 鼻咽癌相关基因 NAG4 的筛选

以构建的人胚鼻咽上皮 cDNA 文库为模板, 加入 NAG4 全长 5'、3' 引物, 成功扩增出 NAG4 基因的全长 cDNA (图 3).

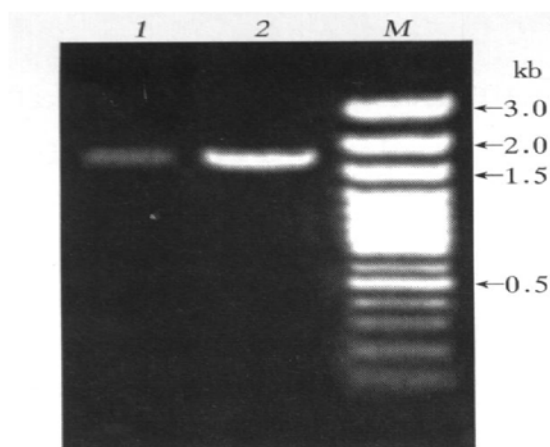


Fig 3 Screened the full-length cDNA of NAG4, a candidate tumor suppressor gene related with nasopharyngeal carcinoma by PCR

1: the products(1 735bp) amplified from HNE1 cDNA library by PCR;
2: the products(1 735bp) amplified from human embryo nasopharynx
cDNA library by PCR; M: 100 bp DNA ladder plus marker.

3 讨 论

遗传资源的开发和利用在基因结构和功能研究中有极其重要的作用。构建不同组织细胞或同一组织不同发育阶段及其病变组织 cDNA 文库为研究组织发育、分化和病变提供了方便而有效的遗传资源。我们在成功构建了成人鼻咽上皮组织 cDNA 文库的基础上^[4]，又构建了人胚鼻咽上皮 cDNA 文库和鼻咽癌上皮细胞株 HNE1 cDNA 文库 (另文报道)，这三个 cDNA 文库对于发现鼻咽不同发育阶段的新基因和分析鼻咽不同发育阶段差异基因的表达与调控，有极其重要的意义，将为人鼻咽组织特异性基因和鼻咽癌基因与抑癌基因的进一步分离提供基础。

NAG4 基因是本实验室新克隆的一个鼻咽癌候选抑癌基因，GenBank 登录号 AF179285，是含有多个磷酸化位点和溴区结构域的核内转录因子，在鼻咽癌中表达下调^[5]。我们应用 NAG4 基因的全长 5'、3' 引物在人胚鼻咽上皮 cDNA 文库中成功扩增出 NAG4 基因的全长 cDNA，显示出人胚鼻咽上皮 cDNA 文库筛选鼻咽癌抑癌基因的可靠性，也进一步证明本文构建的人鼻咽上皮 cDNA 文库的质量高。

本研究采用 SMART 技术^[6,7]，以一个经修饰的 oligo (dT) 引物 (*sfi* I B)，合成第一链 cDNA，同时利用 mRNA 5' 端帽子结构的特征，以一段独特寡核苷酸序列 (*sfi* I A) 作为逆转录向 mRNA

5' 端延伸出去的模板，继而又以此序列作为引物，采用 LD-PCR 使双链 cDNA 得以扩增。当逆转录到达真核生物 mRNA 的 5' 端时，逆转录酶发生跳移，使第一链 cDNA 继续合成三个 C，与 SMART 寡核苷酸一端的三个 G 进行碱基互补，继续逆转录至 SMART 寡核苷酸的末端，这样逆转录的 cDNA 包含了 mRNA 完整的 5' 端和 SMART 寡核苷酸的互补序列。采用这种方法构建 cDNA 文库的主要优点在于：首先，提高 cDNA 文库中所含全长 cDNA 的比例。其次，由于 LD-PCR 在 cDNA 文库构建中体现出来的优越性，只需极其少量的 mRNA (25 ng) 或总 RNA (50 ng) 就能构建 cDNA 文库，这对于取材非常困难的组织意义更加重大。第三，合成的双链 cDNA，经 *sfi* I (I A 和 I B) 酶切后，连接到经 *sfi* I 酶切的 λ TRipLex2 的左右臂，从而实现 cDNA 的简便、快速的定向克隆，经鉴定所构建的成人正常鼻咽组织 cDNA 文库质量高，是今后进一步筛选鼻咽癌相关的抑癌基因和人鼻咽组织特异性表达基因的重要资源。我们所用 cDNA 克隆载体 λ TRipLex2 是一种新的噬菌体载体，多克隆位点上游含两个翻译起始点，可以三种阅读框方式表达插入 cDNA，同时容易质粒化，充分显示其具有广泛的应用前景。

参 考 文 献

- 1 谢 奕, 姚开泰, 胡维新. 鼻咽癌、宫颈癌和肺癌 p53 基因突变与表达的对比. 中华医学病理杂志, 1997, 26 (4): 229~232
Xie Y, Yao K T, Hu W X. Chin J Pathology, 1997, 26 (4): 229~232
- 2 Lo K W, Cheung S T, Leung S F, et al. Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res, 1996, 56 (12): 2721~2725
- 3 Lo K W, Huang P W, Sin D, et al. Genetic change in nasopharyngeal carcinoma. Chin Med J, 1997, 110 (7): 548~559
- 4 张必成, 余 鹰, 李桂源, 等. 鼻咽上皮组织定向 cDNA 文库的快速构建. 中华耳鼻喉科杂志, 2001, 36 (1): 47~50
Zhang B C, Yu Y, Qiu Y Z, et al. Chin J Otorhinolaryngol, 2001, 36 (1): 47~50
- 5 余 鹰, 谢 奕, 曹 利, 等. 一个新鼻咽癌抑癌候选基因的克隆及其功能初步研究. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27 (3): 319~324
Yu Y, Xie Y, Cao L, et al. Prog Biochem Biophys, 2000, 27 (3): 319~324
- 6 Zhu Y Y, Machleder E M, Chenchik A, et al. Reverse transcriptase template switching: a SMART approach for full-length cDNA library construction. Biotechniques, 2001, 30 (4): 892~897
- 7 Endege W O, Steinmann K E, Boardman L A, et al. Representative cDNA libraries and their utility in gene expression profiling. Biotechniques, 1999, 26 (3): 542~550

Construction of Directional cDNA Library from Human Embryo Nasopharyngeal Epithelia and Screening a Candidate Tumor Suppressor Gene Related with Nasopharyngeal Carcinoma^{*}

ZHANG Bi-Cheng, CAO Li, QIAN Jun, YU Ying, LI Wei-Fang, XIANG Juan-Juan, LI Gui-Yuan^{**}

(Cancer Research Institute, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China)

Abstract In order to isolate and screen tissue-specific genes of human nasopharynx and new tumor suppressor genes of nasopharyngeal carcinoma (NPC), a directional cDNA library from human embryo nasopharyngeal epithelia was constructed by SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) technique. The total RNA and mRNA were separated from primary cultural human embryo nasopharyngeal epithelia and the first-strand cDNA was synthesized through reverse transcription by a modified oligo (dT) primer (contained *Sfi* I B site) while the SMART oligonucleotide (contained *Sfi* I A site) was utilized as a template so that the first-strand cDNA could be extended over the 5' end of mRNA. The double-strand cDNA was amplified by LD-PCR (long-distance PCR) with the above two primers and then digested by *Sfi* I (I A & I B) restriction enzyme. After cDNA size fractionation through CHROMASPIN column, the double-strand cDNA was ligated into the *Sfi* I-digested λ TriplEx2 vector and then the recombinant DNA was packaged *in vitro*. The unamplified human embryo nasopharynx cDNA library consists of 1.0×10^6 independent clones in which the percentage of recombinant clones is about 96%. The titer of the amplified cDNA library is 7.8×10^9 pfu/ml and the average exogenous inserts of the recombinants is 1.2 kb. The full-length cDNA of NAG4, a candidate tumor suppressor gene related with nasopharyngeal carcinoma, was amplified in the cDNA library by PCR. These results show that the human embryo nasopharynx cDNA library has an excellent quality and lays solid foundation for screening and cloning new tumor suppressor genes of nasopharyngeal carcinoma and tissue-specific genes of human nasopharynx.

Key words nasopharynx, embryo, cDNA library, cDNA cloning, NAG4

^{*} This work was supported by grants from the state 863 High Technology R & D Project of China (102-10-01-05), the National Basic Research Programs of China (G1998051008), and the National Natural Sciences Foundation of China (39800078).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-731-4805446, E-mail: lgy@public.cs.hn.cn

Received: June 16, 2001 Accepted: July 23, 2001