

人食管癌 cDNA 酵母杂交文库的构建与鉴定及其应用*

许丽艳^{1)**} 李恩民²⁾ 牛永东²⁾ 蔡唯佳¹⁾

韩 溟¹⁾ 吴炳礼²⁾ 张 灿²⁾ 沈忠英¹⁾ 曾 毅³⁾

(¹⁾ 汕头大学医学院肿瘤病理研究室, 汕头 515031;

²⁾ 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 汕头 515031;

³⁾ 中国预防医学科学院病毒学研究所, 北京 100052)

摘要 以往在研究由促癌物 12- σ -十四烷酰佛波醇-13-乙酯 (12- σ -tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) 诱导的人永生食管上皮细胞恶性变中基因的差异表达情况时, 曾获得中性粒细胞明胶酶相关 lipocalin (neutrophil gelatinase associated lipocalin, NGAL) 等新的食管癌癌变相关基因. 为深入研究这些癌变相关基因在食管癌中以蛋白质-蛋白质或蛋白质-DNA 相互作用为基础的功能网络调控关系, 建立了一个食管癌 cDNA 酵母杂交文库. 采用 Trizol 试剂从一种新的人食管癌细胞 (SHEEC, 由人永生食管上皮细胞转化而来) 中提取细胞总 RNA, 采用 Oligotex mRNA Kit 从细胞总 RNA 中制备 PolyA⁺ mRNA, 采用 SuperScriptTM Choice System For cDNA Synthesis Kit 合成 cDNA, 以 PolyA⁺ mRNA 为探针, 化学发光法监测 cDNA 合成的质量, 以 pGADT₇ 为载体构建了 SHEEC 细胞的 cDNA 酵母杂交文库. 文库的滴度为 1.19×10^9 cfu/ml, 重组片段大小主要集中在 0.5~6.0 kb, 重组率为 50%. 在此基础上, 应用酵母单杂交技术手段对该文库中的 NF- κ B 元件结合因子进行了筛选, 在 SD/-his/-leu/ [+ 15 mmol/L 3-AT] 缺陷培养基平板上共获得了约 360 个单克隆. 按照平板上酵母单克隆直径的大小, 选择直径大于 2 mm 者 91 个, 提取质粒进行酶切鉴定和一对一酵母单杂交验证实验, 结果获得了 30 个阳性重组子, 并随机取其中的 9 个阳性重组子进行测序和 GenBank/BLAST 同源分析, 发现某些基因编码的蛋白质产物在关键氨基酸残基位点上与 p65 和 p50 的 NF- κ B 元件结合域公共序列具有高度一致性. 这些实验结果表明, 所构建的人食管癌 cDNA 酵母杂交文库是成功的.

关键词 cDNA 文库, 酵母杂交, 食管癌细胞系

学科分类号 Q781

食管癌是我国部分地区的高发肿瘤, 其病因及发病机制至今不甚明了. 近年来随着生命科学前沿挺进到后基因组时代, 这方面的研究主要集中在寻找新的食管癌癌变相关基因, 以及揭示这些新基因的功能与食管癌的关系^[1-4]. 实验室有关人员曾建立两个新的细胞系, 一个为携有人乳头瘤病毒 18 型病毒癌基因的人永生食管上皮细胞系 (SHEE)^[5], 另一个则为 SHEE 在促癌物 12- σ -十四烷酰佛波醇-13-乙酯 (12- σ -tetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA) 作用下转化而来的食管癌细胞系 (SHEEC)^[6,7]. 2000 年我们采用基因芯片 (cDNA microarray) 技术, 配合抑制消减杂交实验, 在研究永生食管上皮细胞 SHEE 向食管癌细胞 SHEEC 的恶性转变中基因的差异表达情况时, 曾获得 NGAL (neutrophil gelatinase associated lipocalin) 等许多新的食管癌癌变相关基因, 其中部分未知基因 (7 个) 的片段已登录在 GenBank^[8]. 考虑到基因差异表达发生过程的时空同一性, 我们认为上述诸癌变相关基因在食管癌中可能存在着某种以蛋白质或 DNA 等生物大分子间相互作用为基础的功能网络调控关系. 很显然,

弄清楚这种功能网络调控关系, 对于在更深的层面上认识食管癌发病机制的本质特征是十分有帮助的. 在本文中, 我们成功构建了 SHEEC 细胞的 cDNA 酵母杂交文库, 因此为借助酵母单/双杂交等技术手段, 为揭示上述诸癌变相关基因在食管癌中的功能网络调控关系, 奠定了实验材料与技术基础.

1 材料与方法

1.1 细胞培养

SHEEC 食管癌细胞系^[7,8]在含 10%~15% 小牛血清 (华美公司) 的 199 培养液 (Invitrogen) 中传代培养, 细胞长成单层后, 收获约 3×10^7 个细胞用于提取总 RNA.

* 国家自然科学基金资助项目 (39900069, 30170428), 广东省自然科学基金资助项目 (990799, 010431), 广东省高校自然科学基金项目 (200033), 广东省医学科研基金资助项目 (A2001419), 汕头大学研究与发展基金资助项目 (L0004, L00012).

** 通讯联系人. Tel: 0754-8900464

E-mail: nmli@stu.edu.cn; nmli@21cn.com

收稿日期: 2002-11-08, 接受日期: 2002-11-20

1.2 cDNA 合成

采用 Trizol 试剂 (Invitrogen) 提取细胞总 RNA. 采用 Oligotex mRNA Kit (QIAGEN) 从细胞总 RNA 中提取 PolyA⁺ mRNA. 采用 SuperScriptTM Choice System For cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) 合成 cDNA 第一链和 cDNA 第二链. 以上操作均按相应试剂盒说明书进行.

1.3 cDNA 第一链和 cDNA 第二链质量的检测

取适量的 cDNA 第一链和 cDNA 第二链 (各 2 μ l) 按常规 DNA 印迹方法电泳、转膜 (HybondTM-N⁺ 尼龙膜, Amersham Pharmacia Biotech)、以 PolyA⁺ mRNA 为探针 (AlkPhos Direct Labeling Kit, Amersham Pharmacia Biotech) 进行杂交, 化学发光法检测 (CDP-Star detection reagent, Amersham Pharmacia Biotech), 暗室中压片, 显影, 定影.

1.4 双链 cDNA 的加工处理及其筛选

双链 cDNA 在 T4 DNA 连接酶作用下, 在其两端接上 *Eco*RI / *Not*I 接头, 柱层析法回收尽可能大的 cDNA 片段. 其基本步骤是预处理层析柱后, 加入 cDNA 液体, 然后用洗脱液洗脱, 每管收集一滴流出液, 共连续收集 20 管. 为了确认所回收的 cDNA 片段的大小范围及在哪一管中 cDNA 片段的含量最高, 取约 200 ng PolyA⁺ mRNA 进行探针标记后, 将回收的带 *Eco*RI / *Not*I 接头的 cDNA 片段按常规 DNA 印迹方法电泳、转膜、杂交及化学发光法检测, 暗室中压片, 显影, 定影. 根据杂交结果留取 cDNA 含量高且含较长片段的回收液保存于 -20℃ 备用.

1.5 cDNA 文库的构建

将质粒载体 pGADT₇ (CLONTECH) 用 *Eco*RI 酶切, 电泳鉴定确已切开后, 回收线型 pGADT₇ 载体 (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN), 并用牛小肠碱性磷酸酶 (CIAP, Promega 公司) 去掉线型 pGADT₇ 载体末端的磷酸, 通过连接反应和转化大肠杆菌验证去磷效率. 如确已去磷充分, 则将上述所获得的 cDNA 片段与其连接, 转化 TOP10F⁺ 感受态细胞 (CLONTECH), 铺 LB-琼脂板 (含 50 mg/L 氨苄青霉素), 37℃ 倒置培养过夜. 次日观察. 在长有菌落的平板上加入适量的 LB 培养基, 刮下菌落混匀后, 加入终浓度为 25% 的甘油, 分装, -70℃ 保存.

1.6 文库大小滴定及重组率和重组子大小的鉴定

从 -70℃ 取出 cDNA 文库, 进行 10⁶ 倍稀释后, 取 100 μ l 铺 LB-琼脂板 (含 50 mg/L 氨苄青霉

素), 37℃ 倒置培养 14~16 h, 对长出的菌落进行计数, 共重复 3 次, 确定文库滴度 (菌落数 $\times$ 10⁷ cfu/ml).

随机从上述滴定文库滴度的平板中挑取一定数量的单菌落, 分别采用常规方法进行细菌扩增, 质粒提取, *Eco*RI 酶切, 电泳鉴定. 有外源片段插入者即为重组子, 根据重组子的多少, 计算重组率. 以重组率和重组子中外源片段大小的分布情况, 结合文库滴度评价文库的质量.

1.7 文库在酵母单杂交中的应用

按常规方法扩增 SHEEC 食管癌细胞系 cDNA 酵母杂交文库, 并提取质粒 (QIAfilterTM Plasmid Mega Kit, QIAGEN). 以三重 NF- κ B 元件寡聚核苷酸串 (AATTCGGAATGTCCTCCGGAATGTCCTCCGGAATGTCCT) 为诱饵, 采用经典的乙酸锂法进行单杂交筛库实验. 具体操作参照 CLONTECH 公司的 MATCHMAKER One-Hybrid System 使用手册进行. 从筛库得到的阳性酵母克隆中提取质粒, 酶切鉴定, 转化大肠杆菌 TOP10F⁺ 感受态细胞, Amp⁺ 平板筛选后, 取单克隆进行扩增并提取质粒 (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN). 将所提取的质粒进行一对一酵母单杂交实验, 具体操作参照酵母操作手册 (CLONTECH). 将上述一对一酵母单杂交验证实验所获得的阳性重组子进行 DNA 序列测定 (上海基康公司), 利用 NCBI 公共数据库对目标基因序列进行 BLAST 同源性分析鉴定. 运用 BTI software/ GeneTool Lite Launcher 软件 (<http://www.doubletwist.com> Microsoft Internet Explorer Provided by Amersham Pharmacia Biotech) 对酵母单杂交目标基因编码产物氨基酸序列进行翻译, 然后与 p65 和 p50 等已知 NF- κ B 因子的 DNA 结合域进行序列比对, 确定关键位点氨基酸残基的一致性.

2 结 果

2.1 总 RNA 和 polyA⁺ mRNA 的质量

采用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取 SHEEC 细胞总 RNA, 其 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 1.851. 取 1 μ g RNA 进行甲醛变性凝胶电泳, 溴化乙锭染色后可见 28 S 和 18 S 条带十分明显, 且二者之比大于 2 (图 1). 这说明所获得的总 RNA 样品的质量良好, 符合继续实验的要求. 另外从 600 μ g 总 RNA 中所提取的 polyA⁺ mRNA 的 A₂₆₀/A₂₈₀ 为 2.001, 表明所获得的 polyA⁺ mRNA 样品的质量良

好, 纯度已达到了反转录实验的要求, 可用于合成 cDNA.

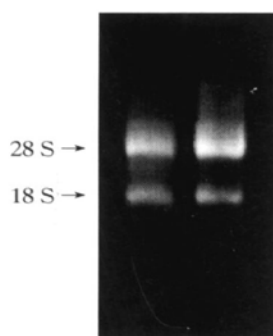


Fig. 1 Electrophoretic analysis of total RNA from SHEEC by a denaturing formaldehyde agarose/EB gel

2.2 cDNA 第一链、第二链的长度

获得尽可能长的 cDNA 片段是保证所构建的 cDNA 文库质量的关键因素之一. 在我们的实验中, 采用 DNA 印迹检测发现 cDNA 第一链、第二链的长度范围均较宽, 最小片段的长度大于 0.5 kb, 这说明所合成的 cDNA 的长度符合文库构建要求.

2.3 cDNA 片段长度的范围及其容量

通过对柱层析纯化后回收的 cDNA 片段进行 DNA 印迹, 发现在 6, 7 号管已见有杂交信号, 但较弱. 在 8 号管杂交信号最强, 且片段范围较宽, 主要集中在 0.5~6.0 kb. 其后的 9, 10 管尽管杂交信号也较强, 但片段的长度已开始变短. 因此我

们选取 8 号管 cDNA 作为构建文库的目的片段.

2.4 线型 pGADT₇ 载体末端去磷效率的验证

分别以未进行酶切的环型 pGADT₇ 和未去磷的线型 pGADT₇ 作对照, 对去磷的线型 pGADT₇ 重新用 T4 DNA 连接酶进行连接, 转化 TOP10F' 感受态细胞, 37℃ 培养 14~16 h 后, 对长出的菌落进行计数, 检验去磷效果. 结果是未进行酶切的环型 pGADT₇ 板长出约 90 个菌落, 未去磷的线型 pGADT₇ 板长出约 60 个菌落, 而去磷的线型 pGADT₇ 板仅长出 1 个菌落. 未去磷载体板的菌落数与去磷载体板的菌落数之比是 60:1 (按要求应大于 50:1). 这表明线型 pGADT₇ 载体末端去磷是充分的, 与目的 cDNA 片段连接可确保连接效率.

2.5 cDNA 文库的鉴定

将所获得的 cDNA 片段与线型去磷的 pGADT₇ 载体连接, 转化 TOP10F' 感受态细胞, 铺板培养 14~16 h 后观察发现菌落几乎呈融合状态. 回收菌落, 确定文库滴度. 3 次结果分别为 1.20×10^9 cfu/ml、 1.01×10^9 cfu/ml 和 1.36×10^9 cfu/ml, 那么文库的平均滴度即为 1.19×10^9 cfu/ml.

随机从滴定文库滴度的平板中挑取 12 个单菌落, 提取质粒, *Eco*R I 酶切, 电泳后发现 6 个质粒含有外源片段 (图 2), 因此文库的重组率为 50%. 另外, 外源片段的长度分布于 1.0~3.0 kb 之间, 平均长度为 2.1 kb, 表明重组子中外源片段的大小在文库所要求的范围之内.

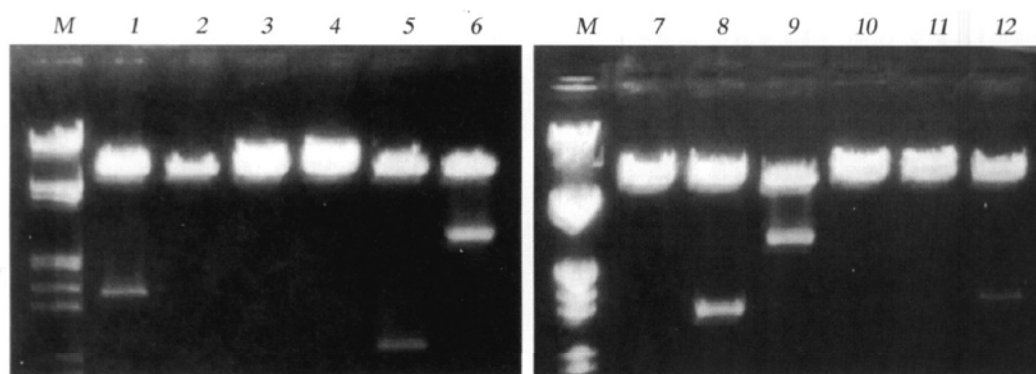


Fig. 2 Identification of the recons from SHEEC cDNA library for yeast hybrid system by *Eco*R I-cutting
M: λ DNA/ (*Eco*R I + *Hind* III); 1, 5, 6, 8, 9, 12: recons. 2, 3, 4, 7, 10, 11: nonrecons.

2.6 文库在酵母单杂交中的应用

将 SHEEC 食管癌细胞系 cDNA 酵母杂交文库质粒转化 pHis-3NF [YM4271], 在 SD/-his/-leu/[+ 15 mmol/L 3-AT] 缺陷培养基平板上进行单杂交筛库实验, 结果获得了约 360 个单克隆. 按照平

板上酵母单克隆直径的大小, 选择直径大于 2 mm 者 91 个, 提取质粒, 进行酶切鉴定, 结果获得了 31 个阳性重组子, 外源片段的长度主要集中在 0.8~1.6 kb, 部分结果见图 3. 将上述筛库所得到的 31 个阳性重组子进行一对一酵母单杂交验证实验,

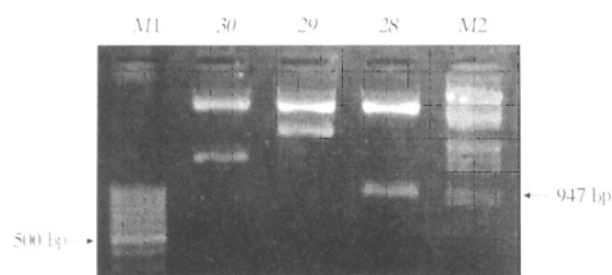


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of restriction endonucleases *EcoRI* digesting positive recombinant plasmids of yeast one-hybrid system

M1: 100 bp ladder; M2: λ DNA/ (*EcoRI* + *HindIII*); 30, 29, 28: positive recombinants.

结果其中的 30 个阳性重组子被进一步确认。然后随机取 9 个阳性重组子进行 DNA 序列测定, 拼接后利用 NCBI 公共数据库进行 GenBank/ BLAST 同源分析, 结果见表 1。氨基酸序列翻译结果表明, 28 S rRNA 基因突变体编码蛋白产物, 在关键氨基

酸残基位点上与 p65 和 p50 的 NF- κ B 元件结合域公共序列^[9]具有高度一致性 (图 4), 其他阳性重组子尚在分析鉴定中。

Table 1 Analysis and identification of some positive clones from one-hybrid by GenBank/ BLAST database

number	gi accession number	discription
1	17865502	HUMAN, nuclear LIM interactor-interacting factor 1
2	4758802	HUMAN, nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 4
3	337381	Human 28 S ribosomal RNA gene mutation
4	104480	malonyl-CoA decarboxylase
5	13347032	cytochrome c oxidase subunit III
6	20071961	Homo sapiens, ribosomal protein L13
7	21620057	Homo sapiens, hypothetical protein MGC5442
8	20482677	Homo sapiens N-terminal kinase-like (NTKL)
9	16877758	Homo sapiens, proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 7, (PSMB7)

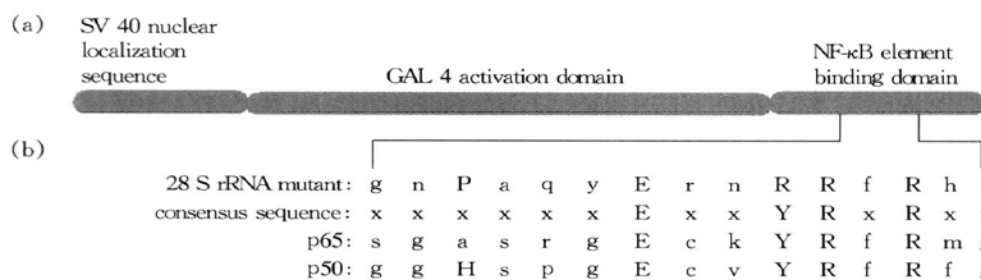


Fig. 4 The 28 S rRNA mutant fusion protein products

(a) A schematic representation of the 28 S rRNA mutant fusion protein. (b) The amino acid sequence of the NF- κ B element binding domain in 28 S rRNA mutant, consensus sequence, p65 and p50. The residues that special interacted with NF- κ B element are denoted by capital letters.

3 讨 论

目前在人类基因组计划快速向前推进的有力带动下, 大规模地研究基因的功能已成为生命科学研究领域的核心内容。与此相适应, 酵母杂交等^[10~15]以揭示蛋白质与蛋白质以及蛋白质与 DNA 等生物大分子间相互作用为基础的实验技术平台相继被许多相关实验室所建立。然而在某些方面比如食管癌研究, 由于受缺乏针对性强的预制型酵母杂交 cDNA 文库的影响, 酵母杂交技术的应用还是受到很大的限制, 这在一定程度上已成为制约该技术广泛应用的瓶颈。食管癌是我国以及其他一些经济相对不发达国家部分地区的高发肿瘤, 而美国以及许多欧洲国家食管癌的发病率是很低的, 可

能受此影响, CLONTECH 和 Invitrogen 等著名的酵母杂交试剂盒研发公司一直没有开发预制型食管癌酵母杂交 cDNA 文库。而与此同时, 虽然酵母杂交技术在肺癌、乳腺癌、肝癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌和宫颈癌等许多肿瘤的研究中已被广泛应用并获得了十分有意义的结果^[16~20], 但相比之下在食管癌研究中却一直未见相关报道。这从一个侧面说明本文所报道的 SHEEC 细胞酵母杂交 cDNA 文库对食管癌研究来讲可能具有一定意义, 因此也是非常必要的。

一个酵母杂交 cDNA 文库质量的评价标准主要有文库的滴度、重组率和重组子中外源片段的大小等。从本文的实验结果来看, SHEEC 细胞酵母杂交 cDNA 文库 50% 的重组率似乎是低了一些, 但

由于另外两项指标达到了较高水平, 因此综合而言此文库依然保持了较高的质量. 这可以通过对此文库的有效滴度进行理论推算而得到充分证明. 首先重组率 50% 将使文库的有效滴度减半. 其次外源片段正反向插入载体的几率均等 (各占 50%) 也将使文库的有效滴度减半. 最后外源片段以正确编码插入载体的比例为 1/3, 将使文库的有效滴度减少 2/3. 综合上述三个方面的情况, SHEEC 细胞酵母杂交 cDNA 文库的有效滴度即为 $1.19 \times 10^9 \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{2} \times \frac{1}{3} = 9.92 \times 10^7$ cfu/ml, 依然远远高于酵母杂交 cDNA 文库通常所要求的 2×10^6 cfu/ml 的文库滴度. 由此可见, 本文所构建的 SHEEC 细胞酵母杂交 cDNA 文库的质量是很高的. 最近我们通过酵母单杂交技术对上述文库中所存在的 NF- κ B 元件结合因子进行了筛选, 结果在 SD/-his/-leu/[+ 15 mmol/L 3-AT] 缺陷培养基上, 经过特异限制性内切酶酶切鉴定, 和一对一酵母单杂交验证实验获得了 30 个阳性重组子, 外源片段的长度分布在 0.6~ 2.0 kb. 针对部分阳性重组子测序后所进行的氨基酸序列翻译结果表明, 28 S RNA 突变体基因编码的蛋白质产物, 在关键氨基酸残基位点上与 p65 和 p50 的 NF- κ B 元件结合域公共序列具有高度一致性, 而其在 SHEEC 细胞中确切功能的鉴定正在进行中. 然而无论如何, 这些实验结果可以充分表明 SHEEC 细胞酵母杂交 cDNA 文库的质量完全能够满足实际研究需要.

所合成的 cDNA 的质量是决定酵母杂交 cDNA 文库质量的最关键因素. 针对此环节本文所采用的监测手段是化学发光法, 而不是传统的放射性核素法. 这主要出于如下两点考虑. a. Amersham Pharmacia 提供的化学发光法检测试剂盒 (CDP-Star detection reagent) 所采用的是碱性磷酸酶直接标记策略, 其检测灵敏度 (0.06×10^{-12} g) 已被显著提高, 虽然仍不及放射性核素法敏感, 但完全可以满足实验的要求. b. 采用化学发光法不但避免了放射性污染, 而且还具有实验操作快捷简便、底片背景低、特异性高以及标记好的探针可保存相对较长时间 (-20℃下, 可有效保存 6 个月) 等优点. 实验结果表明, 在酵母杂交 cDNA 文库构建中应用化学发光法对 cDNA 合成质量这一关键环节进行监测是非常成功的, 这特别适合于那些尚不具备放射性核素操作条件的实验室应用.

综上所述可见, 本文首次成功构建了一种食管

癌的酵母杂交 cDNA 文库. 这对于促进运用酵母杂交实验技术平台, 深入开展食管癌方面的研究是具有非常重要意义的.

参 考 文 献

- 1 王楠, 刘芝华, 丁芳, 等. 胃肠富集 Kruppel 样因子在食管癌的表达. 生物化学与生物物理进展, 2002, **29** (1): 46~ 50
Wang N, Liu Z H, Ding F, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2002, **29** (1): 46~ 50
- 2 Lu J, Liu Z, Xiong M, *et al.* Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. Int J Cancer, 2001, **91** (3): 288~ 294
- 3 Shibata K, Tanaka S, Shiraishi T, *et al.* G-protein gamma 7 is downregulated in cancers and associated with P27 kip1-induced growth arrest. Cancer Res, 1999, **59** (5): 1096~ 1101
- 4 Miyauchi M, Shimada H, Kadomatsu K, *et al.* Frequent expression of midkine gene in esophageal cancer suggests a potential usage of its promoter for suicide gene therapy. Jpn J Cancer Res, 1999, **90** (4): 469~ 475
- 5 沈忠英, 岑山, 蔡唯佳, 等. 人乳头状瘤病毒 18 型 E6E7 基因诱导人胚食管上皮永生. 中华实验和临床病毒学杂志, 1999, **13** (2): 121~ 124
Shen Z Y, Cen S, Cai W J, *et al.* Chinese J Exp Clin Virol, 1999, **13** (2): 121~ 124
- 6 Shen Z, Cen S, Shen J, *et al.* Study of immortalization and malignant transformation of human embryonic esophageal epithelial cells induced by HPV18 E6E7. J Cancer Res Clin Oncol, 2000, **126** (10): 589~ 594
- 7 沈忠英, 蔡唯佳, 沈健, 等. 人乳头状瘤病毒 18E6E7 和 TPA 协同诱发人胚食管上皮细胞恶性转化的研究. 病毒学报, 1999, **15** (1): 1~ 6
Shen Z Y, Cai W J, Shen J, *et al.* Chin J Virol, 1999, **15** (1): 1~ 6
- 8 许丽艳, 李恩民, 熊华洪, 等. NGAL 基因在永生食管上皮细胞恶性转化中过表达的研究. 生物化学与生物物理进展, 2001, **28** (6): 839~ 843
Xu L Y, Li N M, Xiong H Q, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2001, **28** (6): 839~ 843
- 9 Chen F E, Huang D B, Chen Y Q, *et al.* Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- κ B bound to DNA. Nature, 1998, **391** (6665): 410~ 413
- 10 Ko L, Cardona G R, Henrion C A, *et al.* Identification and characterization of a tissue-specific coactivator, GT198, that interacts with the DNA-binding domains of nuclear receptors. Mol Cell Biol, 2002, **22** (1): 357~ 369
- 11 Schaefer L K, Wang S, Schaefer T S. Functional interaction of Jun and homeodomain proteins. J Biol Chem, 2001, **276** (46): 43074~ 43082
- 12 Parrinello S, Lin C Q, Murata K, *et al.* Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis. J Biol Chem, 2001, **276** (42): 39213~ 39219
- 13 Xu X L, Wu L C, Du F, *et al.* Inactivation of human SRBC, located within the 11p15.5-p15.4 tumor suppressor region, in breast and lung cancers. Cancer Res, 2001, **61** (21): 7943~ 7949
- 14 Lin L, Holbro T, Alonso G, *et al.* Molecular interaction between human tumor marker protein p150, the largest subunit of eIF3, and intermediate filament protein K7. J Cell Biochem, 2001, **80** (4): 483~ 490
- 15 Tarabykina S, Kriajevska M, Scott D J, *et al.* Heterocomplex formation between metastasis-related protein S100A4 (Mts1) and S100A1 as revealed by the yeast two-hybrid system. FEBS Lett, 2000, **475** (3): 187~ 191

- 16 Yamanaka H, Maehira F, Oshiro M, *et al.* A possible interaction of thioredoxin with VDUP1 in HeLa cells detected in a yeast two-hybrid system. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, **271** (3): 796~ 800
- 17 Fong W G, Liston P, Rajcar-Separovic E, *et al.* Expression and genetic analysis of XIAP-associated factor 1 (XAF1) in cancer cell lines. *Genomics*, 2000, **70** (1): 113~ 122
- 18 Yeh C T, Lu S C, Chen T C, *et al.* Aberrant transcripts of the cyclin-dependent kinase-associated protein phosphatase in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 2000, **60** (17): 4697~ 4700
- 19 Wilson E M, Oh Y, Hwa V, *et al.* Interaction of IGF-binding protein related protein 1 with a novel protein, neuroendocrine differentiation factor, results in neuroendocrine differentiation of prostate cancer cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, **86** (9): 4504~ 4511
- 20 Hanaoka E, Ozaki T, Ohira M, *et al.* Molecular cloning and expression analysis of the human DA41 gene and its mapping to chromosome 9q21.2-q21.3. *J Hum Genet*, 2000, **45** (3): 188~ 191

Construction and Identification and Application of cDNA Library From an Esophageal Cancer Cell Line for Yeast-Hybrid System*

XU Li-Yan^{1)**}, LI Er-Min²⁾, NIU Yong-Dong²⁾, CAI Wei-Jia¹⁾,
HAN Ming¹⁾, WU Bing-Li²⁾, ZHANG Can²⁾, SHEN Zhong-Ying¹⁾, ZENG Yi³⁾

(¹⁾*Institute of Oncologic Pathology, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China;*

²⁾*Department of Biochemistry and Molecular Biology, Medical College of Shantou University, Shantou 515031, China;*

³⁾*Institute of Virlogy, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 100052, China)*

Abstract Many new carcinogenesis-related genes of esophageal cancer, including neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), had been cloned when the differentially expressed genes in the process of the esophageal epithelial cell transforming to carcinoma were being looked for. In these genes there might be some control mechanisms of functional networks. In order to further study the network relationships of the genes, a cDNA library from a esophageal cancer cell line (SHEEC), which had been established, for yeast-hybrid system will be constructed. Total RNA was extracted from SHEEC by Trizol reagent and PolyA⁺ mRNA was purified from total RNA by Oligotex mRNA Kit. cDNA was synthesized using SuperScriptTM Choice System For cDNA Synthesis Kit. The quality of synthesized cDNA was detected by chemical light method using PolyA⁺ mRNA probe. The double-strand cDNA was ligated into the *EcoR* I site of pGADT₇ vector and the cDNA library from the esophageal cancer cell line for yeast-hybrid system was constructed. The titer of the amplified cDNA library was 1.19×10^9 cfu/ml. The inserted fragment size of recombinants was from 0.5 kb to 6.0 kb and the percentage of recombinant clones was about 50%. NF- κ B element binding factors were screened from this cDNA library by yeast one-hybrid technic and more than 360 clones were obtained on the SD/-his/-leu/[+ 15 mmol/L 3-AT]. Plasmids of 91 clones which were larger than 2 mm in diameter were isolated from yeast and transformed to *E. coli*. 30 positive recombinants had been obtained since plasmids were extracted from *E. coli* and digested by *EcoR* I and validated by yeast one-hybrid assay, 9 clones of them were sequenced and the sequence was compared with GenBank/BLAST database. Results showed that protein product of some genes obviously conformed to consensus sequence of NF- κ B element binding domain of p65 or p50 in the key sites of amino acid residues. These results determined that the human esophageal cancer cDNA library for yeast-hybrid system had a higher quality.

Key words cDNA library, yeast-hybrid system, esophageal carcinoma cell line

* This work was supported by grants from The National Natural Sciences Foundation of China (39900069, 30170428), Guangdong Provincial Natural Science Foundation of China (990799, 010431), Guangdong Provincial College Natural Science Foundation of China (200033), Guangdong Provincial Medical Science Foundation of China (A2001419) and Research and Development Foundation of Shantou University (L0004, L00012).

** Corresponding author. Tel: 86-754-8900464, E-mail: nmli@stu.edu.cn; nmli@21cn.com

Received: November 8, 2002 Accepted: November 20, 2002