

Methods, 1980; 3: 273

2 Lynn W R, Macleod R M, Morrison J C *et al.* J Biochem Biophys Methods, 1985; 12: 57

3 顾学范, 陈瑞冠, 齐家仪. 生物化学与生物物理进展, 1985; (5): 59

4 Seymour C, Gronau S, Schickle H P. In: Solum N O ed. Program and Abstracts, ICES-ELPHO 93, Sandefjord (Norway): International Council of Electrophoresis Societies, 1993; 125

5 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1994; 21 (3): 265

6 Andrews A T. Electrophoresis: theory, techniques, and biochemical and clinical applications. New York: Oxford University Press, 1981; 52~53

7 郭尧君. 生物化学与生物物理进展, 1991; 18 (1): 32

8 Righetti P G, Gianazza E. J Chromatogr, 1987; 157: 243

Tian (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101, China*).

**Abstract** Rapid semi-dry technique by filter strips shortens running time from 2~4 h to 40~50 min without lowering resolution and using large amount of electrode buffer. It also simplifies operation and saves materials. Being compared with pH 8.9 anode PAGE, pH 4.8 PAGE has higher resolution in acid protein separation. Very good results can be obtained by using pH 5.5 cathode PAGE with semi-dry technique by filter strips for alkaline sample separations.

**Key words** anode PAGE, cathode PAGE, semi-dry technique

**New Rapid Semi-dry Technique Used in Anode PAGE and Cathod PAGE.** Guo Yaojun, Yu

# 人细胞差异表达基因 cDNA 消减杂交体系的建立\*

黎伯铨 吴旻

(中国医学科学院肿瘤研究所, 分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021)

**摘要** 为克隆肺腺癌分化相关基因, 采用诱导分化与消减杂交相结合的策略, 建立了全反式维甲酸 (RA) 诱导前后人肺腺癌细胞系的 cDNA 消减文库, 得到 124 个 cDNA 消减克隆. 经加-减法杂交差异筛选、DNA 和 RNA 印迹、cDNA 全序列测定和生物学功能分析, 分离到 3 个在人肺腺癌细胞系分化过程中由 RA 激活而特异表达的新的 cDNA 序列. 这一策略和技术路线适用于分离细胞中呈过量表达或表达抑制基因的 cDNA 克隆, 并具有反映细胞分化过程中基因表达动态变化特征和相对简便适用的特点.

**关键词** 消减杂交, 分化相关基因, cDNA 克隆, 维甲酸, 肺癌

癌的发生是细胞增殖失控和分化障碍的结果. 应用各种方法分离细胞癌变或分化过程中呈差异表达的基因, 一直是肿瘤学研究的前沿课题. 80 年代末, 本室设计了应用全反式维甲酸 (all-*trans* retinoic acid, RA) 诱导食管癌细胞系发生终末分化、消减杂交富集 RA 特异

性 cDNA 探针钓取和筛选目的基因 cDNA 的一整套方法<sup>[1]</sup>, 分离到一个使癌细胞分化的基因, 此后我们又建立了更为成熟和有效的在

\* 国家“863”高科技发展计划、攀登计划、博士后基金及 World Lab. 资助项目.

收稿日期: 1995-09-18, 修回日期: 1995-12-05

cDNA 文库间进行直接系统比较的 cDNA-cDNA 消减杂交体系, 并从诱导分化的人肺腺癌细胞中分离到若干个有生物学效应的 cDNA 克隆, 现予系统报道.

## 1 材料和方法

### 1.1 癌细胞的分化诱导

人肺腺癌细胞系 GLC-82 的培养、分化诱导和分化指标检测已另文报道<sup>[2]</sup>.

### 1.2 RNA 提取与 mRNA 的分离纯化

用异硫氰酸胍-盐酸胍分级沉淀法提取细胞总 RNA, 再用 oligo-dT 纤维素亲和层析分离出 poly (A)<sup>+</sup> RNA.

### 1.3 cDNA 的定向克隆与转化

用 RA 诱导前与诱导后细胞的 mRNA 各 5  $\mu$ g, 采用衔接头-引物 (adaptor-primer) 法合成具有不同粘性末端的 cDNA, 在 T4 DNA 连接酶作用下定向克隆进噬菌粒 (phagemid) 载体 pSPORT1. TFB 法制备 DH5 $\alpha$ F' IQ 感受态菌并进行转化, 分别构建未经 RA 诱导及 RA 诱导 1 d 和 4 d 细胞的 3 个 cDNA 文库.

### 1.4 ssDNA 的制备和纯化

自 RA 诱导 1 d 和 4 d 的两个文库各取 1 ml 菌液, 扩增后用 M13K07 辅助噬菌体感染诱导文库的转化子, 提取含 cDNA 插入片段的重组单链噬菌粒 DNA<sup>[3]</sup>, 用羟基磷灰石柱层析<sup>[4]</sup>和限制性内切酶消化除去残存的双链 DNA.

### 1.5 ssDNA 消减杂交

80  $\mu$ g 未诱导文库的总 cDNA 经 Not I / Sal I 双酶切和 NaOH 变性后, 转印至化学活化的纤维膜 (APT 膜), 取 RA 诱导 1 d 和 4 d 文库的单链 DNA 各 5  $\mu$ g, 混合后用甲酰胺体系在 42 $^{\circ}$ C 与共价结合于 APT 膜上的未诱导文库的单链 cDNA 进行杂交<sup>[1]</sup>. 回收经 6 轮杂交仍未被结合的 RA 诱导文库的单链 DNA, 纯化后溶于 10  $\mu$ l 去离子水中.

### 1.6 ssDNA 回复双链反应及细菌转化

**1.6.1 引物与反应条件的选择:** 设四个平行管, 加入等量单链 DNA, 分别与二种引物

(T7 通用引物和线性载体 pSPORT1 DNA)、二种反应体系 (Klenow 酶<sup>[5]</sup> 和 Taq DNA 聚合酶) 组合, 作单链 DNA 回复双链效率比较.

**1.6.2 回复双链反应及转化实验:** 在优化选择的基础上, 将模板/引物反应液 [10  $\mu$ l 消减杂交富集的单链 DNA, 25 ng 引物 (Not I / Sal I 双酶切的线性载体 pSPORT1 DNA), 5  $\mu$ l 5 $\times$  Taq DNA 聚合酶缓冲液] 于 92 $^{\circ}$ C 变性 7 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 40 min, 加入 5  $\mu$ l 预热的 5 $\times$  Taq 酶缓冲液, 5  $\mu$ l (2 mmol/L) dNTP 混合液, 1 U Taq DNA 聚合酶, 14.5  $\mu$ l 去离子灭菌水, 55 $^{\circ}$ C 继续反应 2 min 后于 70 $^{\circ}$ C 延伸 40 min, 加入 10  $\mu$ l 1% SDS 和 50  $\mu$ l EDTA (25 mmol/L, pH 8.0) 终止反应, 反应产物纯化后溶于 10  $\mu$ l TEN 缓冲液 (Tris-HCl, EDTA, NaCl 缓冲液, pH 8.0) 并转化感受态菌, 用含 5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷 (X-gal) / 异丙基硫代- $\beta$ -D-半乳糖苷 (IPTG) / 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 培养基筛选, 挑取无色菌落扩增后, 加入 25% 甘油混匀, 分装于 24 孔板于 -70 $^{\circ}$ C 保存.

### 1.7 RA 特异性 cDNA 的筛选

菌落原位杂交/加-减法差异筛选、消减克隆 cDNA 的同源性分析、DNA 印迹和 RNA 印迹按常规方法进行.

### 1.8 RA 特异性 cDNA 的序列测定

以 M13/pUC 正向引物和 T7 反向引物用双脱氧终止法测序.

### 1.9 RA 特异性 cDNA 的生物学功能分析

将 RA 特异性 cDNA 亚克隆进诱导型真核表达载体 pMSG, 脂质转染试剂介导转染亲本 GLC-82 细胞, 用含霉酚酸等的选择性培养基筛选, 地塞米松诱导表达, 观察细胞生长状态的变化.

## 2 结 果

### 2.1 RA 诱导肺腺癌细胞分化

RA 激活 GLC-82 细胞基因表达和对细胞的分化诱导效应已另文报道<sup>[2]</sup>.

### 2.2 RA 特异性 cDNA 的克隆

实验用 cDNA 文库消减杂交方法分离和筛选人肺腺癌细胞分化相关基因 cDNA 的技术路线如图 1.

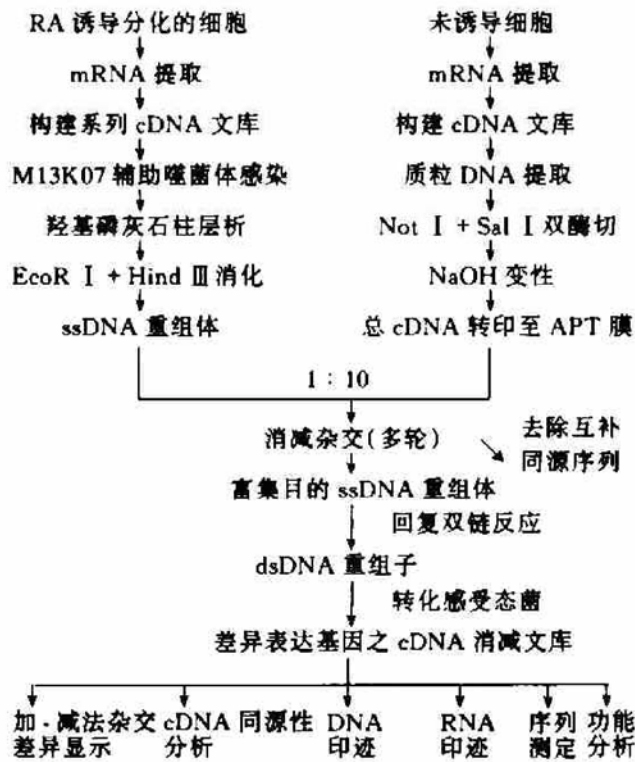


图 1 cDNA 文库消减杂交分离癌细胞分化相关基因 cDNA 的策略和技术路线示意图

2.2.1 cDNA 文库的构建: 应用定向克隆技术, 构建了未经 RA 诱导及 RA 诱导 1 d 和 4 d 细胞的三个 cDNA 文库, 分别命名为 Lib. GLC-82、Lib. GLC-82. RA1 和 Lib. GLC-82. RA4.

2.2.2 RA 特异性 cDNA 消减文库的建立: a. 用 10 μg RA 诱导文库的单链 DNA 与 80 μg 共价结合于 APT 膜上的未诱导文库的单链 cDNA 进行 6 轮杂交, 去除 RA 诱导文库单链 DNA 重组子中与未诱导文库 cDNA 相同的序列, 使 RA 特异性单链 DNA 得到富集. 以 DNA 转化子数为评价尺度, 分别用 T7 通用引物 (17 mer) 和线性载体 DNA (pSPORT1/Not I-Sal I 酶切) 与 Klenow 酶及 Taq DNA 聚合酶反应体系组合, 对单链 DNA 回复为双链的反应条件进行优化选择, 发现线性载体

(pSPORT1) DNA 与 Taq DNA 聚合酶反应体系组合, 其效率分别是 Klenow 酶体系与 T7 通用引物、线性载体 DNA 组合的 95 (286/3) 倍和 14.2 (286/20) 倍, 是 T7 通用引物与 Taq 酶反应体系组合的 3.1 倍. 遂以线性载体 (pSPORT1) DNA 为引物, 选用 Taq DNA 聚合酶反应体系, 将消减杂交富集的 RA 特异性单链 DNA 回复为双链并转化感受态菌, 经含 X-gal/IPTG/Amp 的 LB 培养基筛选, 共得到 143 个 cDNA 克隆. b. 分别以 RA 诱导前后细胞的总 cDNA 为探针, 与 143 个克隆作加-减 (plus/minus) 法杂交差示筛选, 见全部克隆都与 RA 诱导细胞总 cDNA 探针结合, 出现很强的杂交信号 (图 2a), 而用未诱导细胞总 cDNA 探针与之杂交, 也有 19 个克隆出现较强信号 (图 2b), 说明这 19 个克隆为诱导前后文库所共有, 而其余 124 个克隆应为 RA 特异性 cDNA 消减克隆.

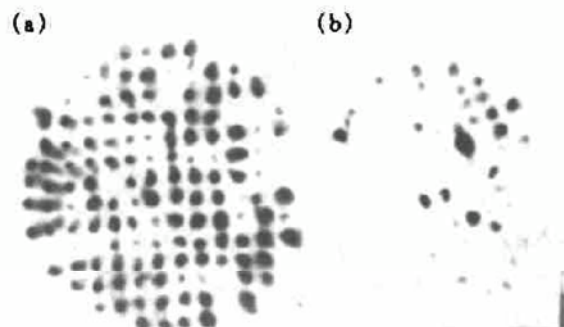


图 2 cDNA 消减克隆的菌落原位杂交/加-减法差异筛选

(a) 与 RA 诱导文库总 cDNA 探针杂交; (b) 与未诱导文库总 cDNA 探针杂交.

### 2.3 RA 特异性目的 cDNA 的筛选

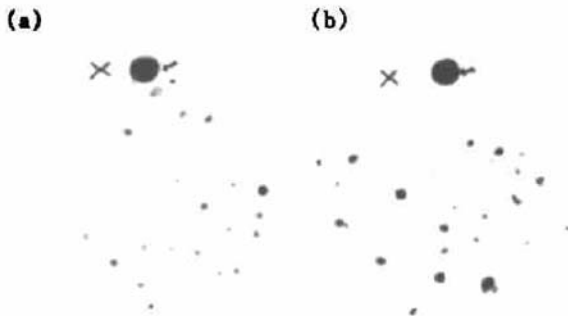
以第 42 号消减克隆 cDNA 为探针, 与全部消减克隆 DNA 杂交作同源性分析, 仅有部分克隆出现杂交信号 (图 3), 表明消减克隆 cDNA 来源于多个不同的基因.

根据同源性分析结果并按 cDNA 大小对消减克隆分组后, 依次与文库总 cDNA 作 DNA 印迹, 以判断消减克隆的存在状态, 去除共存于 RA 诱导前后 3 个文库中的非特异性序列, 选取仅存在于 RA 诱导文库中的克隆作进一步

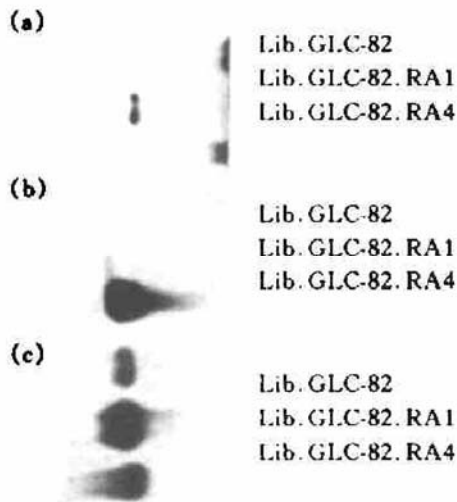


分析. 图 4a 示一个克隆仅存在于 RA 诱导 1 d 的 cDNA 文库 (Lib. GLC-82. RA1) 中, 图 4b 为存在于 RA 诱导 1 d (Lib. GLC-82. RA1) 和 4 d (Lib. GLC-82. RA4) 文库中的克隆, 图 4c 是共存于诱导前后 3 个文库中的非 RA 特异性克隆.

经过文库总 cDNA 的 DNA 印迹筛选, 选取仅存在于 RA 诱导文库中的 cDNA 克隆作 RNA 印迹, 见 5、28 和 42 号克隆 cDNA 在 RA 诱导的细胞中特异表达, 而在未诱导细胞中无表达. 其中, 5 号 (RA5) 和 28 号 (RA28) 仅在 RA 诱导 1 d 的细胞中表达 (图 5a, b), 42 号 (RA42) 在 RA 诱导早期

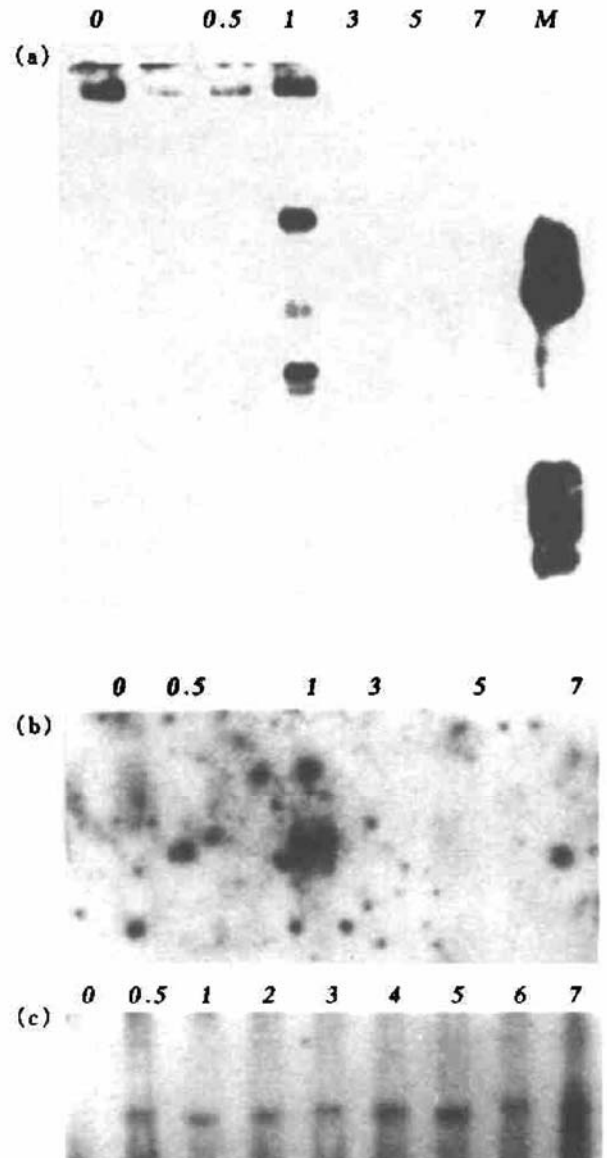


**图 3 消减克隆 cDNA 的同源性分析**  
随机引物法标记第 42 号克隆 cDNA 探针, 与消减克隆作菌落原位杂交. (a) 1~62 号克隆; (b) 63~124 号克隆. → 示阳性对照, × 示阴性对照.



**图 4 消减克隆 cDNA 与文库总 cDNA 的 DNA 印迹分析**

3 个 cDNA 文库的质粒 DNA 各 10  $\mu$ g, 经 Not I/Sal I 双酶切后, 转印于 Zeta-Probe 尼龙膜, 以消减克隆 cDNA 为探针进行杂交. (a) 仅存在于 Lib. GLC-82. RA1 中的消减克隆; (b) 存在于 Lib. GLC-82. RA1 和 Lib. GLC-82. RA4 中的 42 号消减克隆; (c) 共存于 RA 诱导前后 3 个 cDNA 文库中的非特异性克隆.



**图 5 消减克隆 cDNA 的 RNA 印迹放射自显影图**  
RA 诱导前后的 GLC-82 细胞 RNA 各 30  $\mu$ g, 经甲醛变性后于 1.2% 琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳分离, 转印于 Zeta-probe 膜, 随机引物法标记消减克隆 cDNA 探针与之杂交. (a)、(b) 5 号和 28 号克隆 cDNA 在 RA 诱导 1 d 的细胞中特异表达; (c) 42 号克隆 cDNA 在 RA 诱导的细胞中持续表达. 0~7: RA 诱导时间 (d); M: RNA 分子量标记物.

(12 h) 开始持续表达 (图 5c). 酶切这 3 个克隆的质粒 DNA, 分出 1.8、1.5 和 0.7 kb 的 cDNA 插入片段 (资料未显示).

#### 2.4 序列测序及功能分析

RA5、RA28 和 RA42 号克隆 cDNA 全序列已为 NCBI 的核苷酸序列数据库 (nucleotide sequence database) 收录 (序号分别为 U28249、U28250 和 U34343). 经同源性比较, 发现 RA5 与两个 cDNA 表达标志 (expressed sequence tags, ESTs) —— 人的部分 cDNA 高度同源, RA28 和 RA42 未见同源序列. 将 cDNA 亚克隆进真核表达载体 pMSG, 转入亲本 GLC-82 细胞诱导表达后, 细胞生长被明显抑制.

### 3 讨 论

在正常或肿瘤细胞分化过程中, 涉及一些分化相关基因 (differentiation associated gene) 的特异表达. 应用消减杂交技术, 本室曾从 RA 诱导分化的食管癌细胞系中分离出具有抑癌活性的 cDNA 克隆 RA538<sup>[6]</sup>. Steinman 等<sup>[7]</sup>应用该方法从诱导分化的黑色素瘤细胞中分离到一些 cDNA 克隆, 称为黑色素瘤细胞分化相关基因 (mda), 而其中一个为 P<sub>21</sub>, 即 WAF1/CIP1 (野生型 p53 激活因子), 该基因在 RA、DMSO 诱导分化的 HL-60 细胞中呈即刻快速表达<sup>[8]</sup>.

cDNA 消减杂交是在 mRNA 水平分离两种状态下特异诱导表达或表达抑制基因 cDNA 的有效策略. 但以往所用方法不同程度地存在诸如对作为驱除子 (driver) 的 mRNA 需要量大、易于为 RNase 污染、靶 DNA (target) 得率低、信息获取量小以及操作繁复、耗资费时等问题, 因而制约了该技术的普及应用. 针对这些问题, 实验采用了在文库间进行直接系统比较的策略并建立了有效的 cDNA-cDNA 消减杂交体系. 通过选用可制备单链 DNA 的噬菌粒 (phagemide) 载体和含 F' 因子的宿主菌构建 cDNA 文库, 经用辅助病毒 (M13K07 helper phage) 感染 RA 诱导文库提取单链重组

DNA (target), 与共价结合于 APT 膜上的未诱导文库的单链 cDNA (driver) 进行消减杂交, 避免了经典方法需用大量 mRNA 驱除子所带来的不便和易于为 RNase 污染所带来的困扰. 采用这种方法, 单链 DNA 和共价结合于 APT 膜上的 cDNA 都可以重复使用, 这对于 mRNA 来源困难者尤为适用. 同时, 由于构建了 RA 诱导不同时间细胞的系列 cDNA 文库, 且按比例加大了诱导文库单链靶 DNA 的投入量, 从而增加了获得由低丰度 mRNA 转录而来的 cDNA 的机率, 因而可望发现在 RA 诱导不同时间, 即细胞分化的不同阶段被激活而特异表达的基因. RA 特异性 cDNA 消减文库的建立, 使细胞分化过程中基因表达变化的信息得到富集, 使得反映癌细胞诱导分化过程中基因表达的动态变化特征成为可能, 并为进一步筛选分化相关基因 cDNA 提供了方便, 这是本文所用策略和体系的最大优越性所在. 在构建 cDNA 文库时, 采用了定向克隆技术, 重组子中 cDNA 取向相同, 避免了 RA 诱导文库单链 DNA 自身序列间的同源互补, 通过用羧基磷灰石柱层析<sup>[4]</sup>和限制性内切酶消化, 除去单链靶 DNA 中残留的双链 DNA, 提高了消减杂交效率, 从而有效地去除了非特异性序列. 此外, 实验对单链 DNA 回复双链反应的条件进行了优化选择, 提高了富集的目的 DNA 的得率, 保证了有效信息量的获取.

本文用以分离分化相关基因 cDNA 的策略和技术路线, 为研究基因转录的调控机制、发现基因诱导表达中的应答元件 (response elements) 和克隆表达抑制或过度表达 (over-expression) 基因的 cDNA, 提供了有益借鉴.

### 参 考 文 献

- 1 Feng L, Wang X Q, Wu M *et al.* Science in China, Series B, 1992; 35 (4): 445
- 2 黎伯铨, 张雪艳, 吴 旻等. 中华医学杂志, 1995; 75 (11): 683
- 3 Vieira I, Messing J. Methods Enzymol, 1987; 153: 3
- 4 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd. New York: Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 1990: 970~974

- 5 Shweinfst C W, Kelly W H, Gu J R *et al.* Genet Annal Tech Appl, 1990; 7: 64
- 6 冯 骆, 王秀琴, 吴 旻等. 中华医学杂志, 1990; 70 (4): 228
- 7 Steinman R A, Hoffman B, Irol A *et al.* Oncogene, 1994; 9: 3389
- 8 Jiang H P, Lin J, Su Z *et al.* Oncogene, 1994; 9: 3397

**A Strategy for Isolating Differentially Expressed Gene From Human Cells.** Li Baiquan, Wu Min (*National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China*).

**Abstract** A subtractive hybridization system for isolating differentiation associated gene from human cancer cell line is developed. By using the strategy of differentiation-inducing in combina-

tion with cDNA-cDNA subtractive hybridization, a subtracted cDNA library from human lung adenocarcinoma cell line before and after treatment with all-*trans* retinoic acid (RA) was established. Three cDNAs response to RA treatment were obtained by screening of the subtracted cDNA library. The results of sequencing and function analysis show that three cDNAs are novel cDNAs of differentiation associated genes in human lung adenocarcinoma cell line. This system is also suitable for isolating cDNAs representing deleted or overexpressed gene in human cells.

**Key words** subtractive hybridization, differentiation associated gene, cDNA clone, retinoic acid, lung neoplasm

## 有机溶剂中固定化脂肪酶催化硅醇的酯化反应\*

邱树毅 姚汝华 宗敏华 伍 红<sup>1)</sup>

(华南理工大学生物工程系, 广州 510641)

**摘要** 固定化 *Mucor miehei* 脂肪酶可催化有机硅醇和脂肪酸的酯化反应. 对固定化酶用量、脂肪酸链长、不同有机硅醇底物、有机溶剂极性和水含量等影响因素进行了初步研究.

**关键词** 固定化脂肪酶, 有机溶剂, 硅醇, 酯化反应

有机溶剂中酶的催化反应是酶工程研究的热点之一. 酶在有机溶剂中的催化反应有许多优点<sup>[1,2]</sup>, 已应用于有机合成<sup>[3]</sup>、手性合成或光学拆分<sup>[4]</sup>、油和脂肪的修饰改造<sup>[5]</sup>、多肽合成<sup>[6]</sup>等各方面. 许多酶如脂肪酶、蛋白酶、脱氢酶、氧化酶等均可在有机溶剂中催化反应.

具有 Si—C 结构的有机硅化合物是非天然的人工合成物质. 利用酶对这类非天然物质的生物转化合成, 提供了酶反应和识别非天然物质的有关信息. 同时, 研究发现许多有机硅

化合物具有特殊的生物学活性, 作为药物比相应的碳结构类似物有更佳药理效果和更低的毒副作用, 因而引起人们的研究兴趣<sup>[7,8]</sup>. 在有机溶剂中利用酶催化有机硅化合物的生物转化已有报道<sup>[9~11]</sup>, 但未见有用来自 *Mucor miehei* 的脂肪酶催化酯化反应的报道. 本文主要介绍利用上述脂肪酶催化有机硅醇与脂肪酸的酯化反应及其影响因素.

\*国家自然科学基金和广东省自然科学基金资助项目.

<sup>1)</sup>华南理工大学造纸国家重点实验室.

收稿日期: 1995-10-19, 修回日期: 1996-02-18