

- National Cancer Institute, 1996, **88** (22): 1803~1805
- 5 Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, *et al.* Expression monitoring by hybridization to high density oligonucleotide arrays. *Nature Biotech*, 1996, **14** (6): 1675~1680
 - 6 Milosavljevic A, Zeremski M, Satrezoska Z, *et al.* Discovering distinct genes represented in 29 570 clones from infant brain cDNA libraries by applying sequencing by hybridization methodology. *Genome Res*, 1996, **6**: 132~141
 - 7 黎众魁, 谢鹭, 何志巍, 等 (Li Z K, Xie L, He Z W, *et al.*). 用 cDNA 表达阵列谱比较鼻咽癌与正常鼻咽组织的基因表达谱差异. *科学通报 (Chin Sci Bull)*, 1998, **16** (22): 2462~2463
 - 8 Schgal A, Boynton A, Young R, *et al.* Application of the differential hybridization of AtlasTM human expression arrays technique in the identification of differentially expressed genes in human glioblastoma multiforme tumor tissue. *J Surgical Oncology*, 1998, **67** (1): 230~241

Study of the Gene Expression Profile on Nasopharyngeal Carcinoma, Lung Cancer and Normal Adult Nasopharynx Tissues by High Density Microarray. HE Zhī Wei, XU Liang-Guo, REN Cai-Ping, XIE Lu, GAN Rur-Liang, YAO Kai-Tai (Key Laboratory of the Chinese Ministry of Public Health, Hunan Medical University, Changsha 410078, China).

Abstract To study the gene expression profile on nasopharyngeal carcinoma (NPC), lung cancer (LC) and normal adult nasopharynx (NP) tissue and to obtain the NPC-related gene, the total RNA extracted from these tissues were retro-transcribed and labeled with α -³²P isotope. The cDNA probes were hybridized to high density cDNA microarray GF200 with 5 184 genes and ESTs, then the signals were analyzed by Pathways software. The results showed that the low density signals were distributed in three types of tissues and the number of genes and ESTs with the density value over 200 was respectively 110, 134 and 158 among NPC, LC and NP tissue. The results indicated that the different expression genes existed among NPC, LC and NP tissues and some new genes could play an important role in NPC. The high-density microarray was a rapid and effective method to select the different expression genes.

Key words high-density microarray, gene expression profile, nasopharyngeal carcinoma

PCR 检定 OSM cDNA 转染细胞中基因组整合与转录*

吕星 邢瑞云 孙志贤 裴雪涛 吴祖泽

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 用 PCR 和 RT-PCR 方法对人 OSM cDNA 转染的小鼠黑色素瘤细胞进行基因组整合和 mRNA 转录的检定。基因组整合检定时, 采用与调控序列和 cDNA 序列相对应的上、下游引物, 以连续的转录单位进行扩增, 能够更准确地反映整合与表达的关系; mRNA 检定时, 采用与 cDNA 序列和质粒克隆位点与加 polyA 信号之间序列相对应的上、下游引物, 可以区分宿主细胞中内源性 & 外源性基因的转录。

关键词 基因组整合, 转录, 抑瘤蛋白, 黑色素瘤

学科分类号 Q784

基因组整合与 mRNA 转录的检定是确认外源基因转染宿主细胞后基因稳定表达的必要步骤。基因组整合检定时常用的方法是检测载体上的 neo 基因或 cDNA 序列。由于真核细胞基因组不存在 neo 基因, 以及绝大多数真核基因含有内含子, 一般将 neo 基因或 cDNA 序列检测阳性视为外源基因已整合入基因组。但 neo 基因毕竟不是外源基因, 基因组中也存在着 cDNA 的间断序列, 因此常有 neo 基因检测阳性而外源基因不表达或 cDNA 间断序列干

扰检测结果的问题。mRNA 转录检定通常是检测 cDNA 序列。这种方法在宿主细胞不表达与外源基因相同的基因的情况下是可行的, 反之则无法区分内源性与外源性基因的转录。

本项实验中, 我们用 PCR 和 RT-PCR 方法对人 OSM cDNA 重组质粒转染小鼠黑色素瘤细胞后

* 国家自然科学基金 (39670825) 资助项目。

收稿日期: 1998-06-25, 修回日期: 1998-12-15

的基因组整合与 mRNA 转录进行检定,但在引物位置上作了特殊的设计,从而避免了单纯针对 neo 基因或 cDNA 序列检测时可能出现的问题.

1 材料与方法

1.1 人 OSM cDNA 表达质粒的构建

取携带人 OSM cDNA 的 pO/OM 质粒 (美国 Bristol Myers 药物研究所 Malik 博士惠赠),用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳分离纯化 OSM cDNA (769 bp),插入至 pCF-neo 真核表达质粒 (Promega 公司,美国) *EcoR* I-*Xba* I 克隆位点,构成 pCF-neo-hOSM (记为 pO) 重组质粒. pO 质粒用 *Sgf* I 和 *I-Ppo* I 双酶切,切去 pCF-neo 质粒中 CMV 启动子序列,再与经 *Sgf* I 和 *I-Ppo* I 双酶切的小鼠 *Egr-1* 基因调控序列 (*Egr-1R*) 连接,构成 pCF-neo-*Egr-1R*-hOSM (记为 pEO) 重组质粒.

1.2 细胞培养、基因转染与筛选

小鼠 B-16 黑色素瘤细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 培养. 1.8×10^5 细胞数接种 35 mm 培养皿,待细胞长至 70%~80% 密度,用 Lipofectamine (Gibco RBL 公司,美国) 分别进行 pCF-neo、pO 和 pEO 质粒 DNA 转染. Lipofectamine 用量: 4 μ l (2 g/L); 质粒 DNA 用量: 2 μ g; 转染时间: 4.5 h. 转染细胞按 1/10 的比例分置于 60 mm 培养皿,用含 G418 (800 mg/L) 的 DMEM 进行筛选培养,每 3 天换液一次,约 3 周后,出现单克隆细胞集落. 显微镜下吸取细胞集落,分置于 24 孔板. pCF-neo 转染细胞筛出克隆 5 个 (记为 p1~5); pO 转染细胞筛出克隆 18 个 (记为 pO-1~18); pEO 转染细胞筛出克隆 16 个 (记为 pEO-1~16). 待 24 孔板中细胞生长至 70%~80% 密度时,用 PBS 洗 3 遍,加 1 ml 无血清 DMEM 继续培养 48 h,吸取 9 μ l 细胞上清液在硝酸纤维膜上点样,用羊抗人 OSM 抗体进行免疫印迹实验,检测 OSM. 结果表明, pEO-1、5、6、9 号和 pO-10、12、17 号克隆细胞有 OSM 分泌; pCF-neo 转染细胞及 B-16 细胞上清中未检出 OSM.

1.3 OSM cDNA 基因组整合的 PCR 检定

取 pO-12、pO-17、pEO-1、pEO-9 及 p1 和 B-16 细胞,用基因组 DNA 提取试剂盒 (Promega 公司) 分别提取基因组 DNA,按 *Egr-1R* 和 pCF-neo 质粒中 CMV 启动子序列合成上游引物: 5'-CGT-GCTGTTCCAGACCCTTG A-3' (*Egr-1R*), 5'-

CGTTTAGTGAACCGTCAGATG-3' (CMV 启动子); 按 OSM cDNA 序列合成下游引物: 5'-CAGCTGTCCCCTGGTCATGAG-3'. 取 3 μ g 基因组 DNA 进行 PCR, 94 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 68 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 120 s, 共 35 次循环. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后转移至 Hybond-N⁺ 膜 (Amersham 公司, 英国), 按《分子克隆》方法^[1], 用 α -³²P dCTP 标记的 OSM cDNA 探针进行 DNA 印迹实验. 探针标记采用 PCR 方法^[2]. 按 OSM cDNA 序列合成引物, 上游引物: 5'-CTCCTTGGCCAGCTCCAGAAG-3'; 下游引物: 5'-TGAGTGCATGAAGCGATGGTAG-3'. 引物位置在 OSM cDNA 序列中段, 即基因组整合和 mRNA 转录检测时所用引物的内侧.

1.4 OSM 基因 mRNA 转录的 RT-PCR 检定

取 pO-12、pO-17、pEO-1、pEO-9 及 p1 和 B-16 细胞,用 RNA 提取试剂盒 (Gibco BRL 公司) 分别提取总 RNA,用 cDNA 合成试剂盒 (Gibco BRL 公司) 合成 cDNA,按 OSM cDNA 序列合成上游引物: 5'-GGGGTACTGCTCACAGAGAGG-3', 按 pCF-neo 质粒克隆位点与加 polyA 信号之间序列合成下游引物: 5'-TAGAGTCCGCCGGGCGGCCGCTTG-3', 取 1 μ l cDNA 产物进行 PCR, 94 $^{\circ}$ C 60 s \rightarrow 70 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 35 次循环. PCR 产物的 DNA 印迹实验同 1.3.

1.5 OSM 分子质量测定

分别取经抗体检测有 OSM 分泌的 pO-12、pO-17、pEO-1、pEO-9 及 p1 和 B-16 细胞上清液,用蒸馏水充分透析,除去盐分和小分子有机物,再用旋转蒸发器蒸发掉水分,残存物用 20 μ l SDS 样品处理液溶解,进行 15% 聚丙烯酰胺凝胶 SDS 电泳,电泳后蛋白质电转移至硝酸纤维膜,用羊抗人 OSM 抗体 (R&D 公司,美国) 进行免疫印迹实验,测定 OSM 分子质量.

2 结果与讨论

2.1 人 OSM cDNA 真核表达质粒的构建

图 1 显示已构建的两种人 OSM cDNA 真核表达质粒. OSM (oncostatin M, 抑瘤蛋白) 是一种对黑色素瘤、肺癌、乳腺癌、卵巢癌等多种实体瘤显示抑制作用的细胞因子^[3], *Egr-1R* 具有感受电离辐射刺激诱导下游基因表达的功能^[4]. 构建 *Egr-1R* 连接人 OSM cDNA 表达质粒,转染肿瘤细胞,可实现在对肿瘤进行局部放疗时诱导 OSM 表达,通过射线与 OSM 的双重作用杀伤肿瘤.

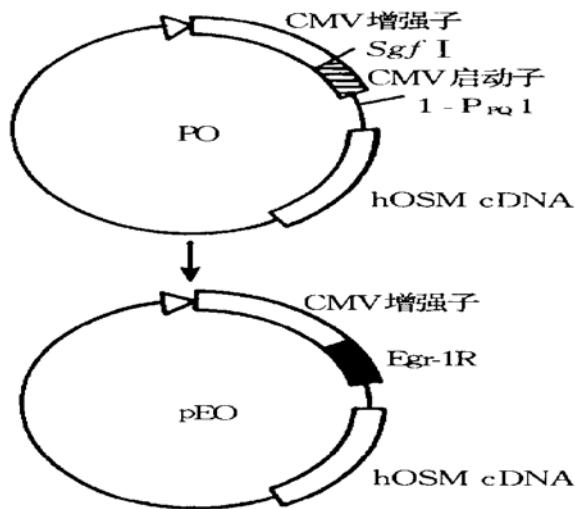


图1 pO和pEO重组质粒示意图

pO: pCf-neo hOSM cDNA; pEO: pCf-neo Egr-1R-hOSM cDNA.

2.2 PCR 检定 OSMcDNA 的整合与转录

用 PCR 和 RT-PCR 方法检定 pEO 和 pO 细胞中 OSM cDNA 的基因组整合与 mRNA 转录的结果见图 2、图 3 和图 4. 基因组整合检定中, pEO 的扩增片段长 1 087 bp (图 2a), pO 扩增片段 1 122 bp (图 3a); mRNA 转录检定中, pEO 和 pO 的扩增片段同为 792 bp (图 4a). 以上扩增片段的大小均与预期相符. pCf-neo 空质粒转染细胞 (p-1) 和 B-16 细胞 PCR 和 RT-PCR 检定时均为阴性.

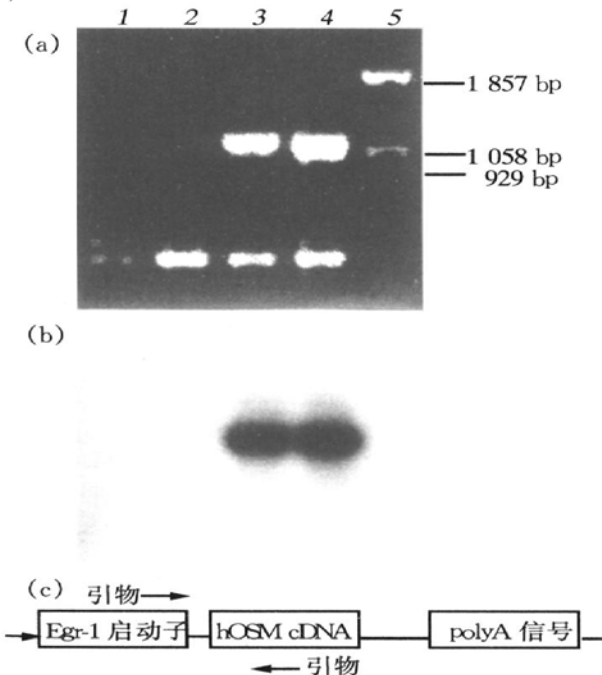


图2 PCR 检定 pEO 细胞中 OSM cDNA 基因组整合 (a) PCR 产物, 1~4: 依次为 B-16、p-1、pEO-9 和 pEO-1 细胞; 5: DNA 分子质量标准 (pBR 322/ Bst N I); (b) DNA 印迹图谱; (c) 引物位置示意图.

DNA 印迹的结果进一步确证扩增片段的序列特异性 (图 2b、图 3b 和图 4b). PCR 标记探针采用与检测时不同的内侧引物, 是为避免探针与扩增片段中包含的引物序列杂交.

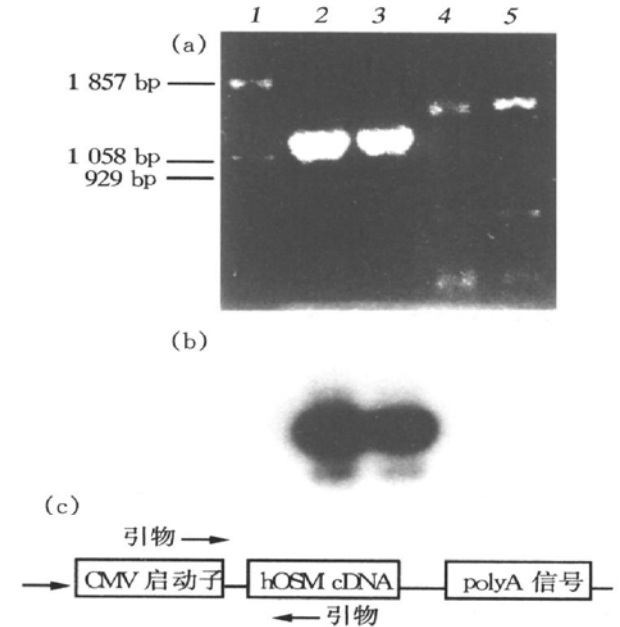


图3 PCR 检定 pO 细胞中 OSM cDNA 基因组整合 (a) PCR 产物, 1: DNA 分子质量标准 (pBR322/ Bst N I); 2~5: 依次为 pO17、pO-12、p-1 和 B-16 细胞; (b) DNA 印迹图谱; (c) 引物位置示意图.

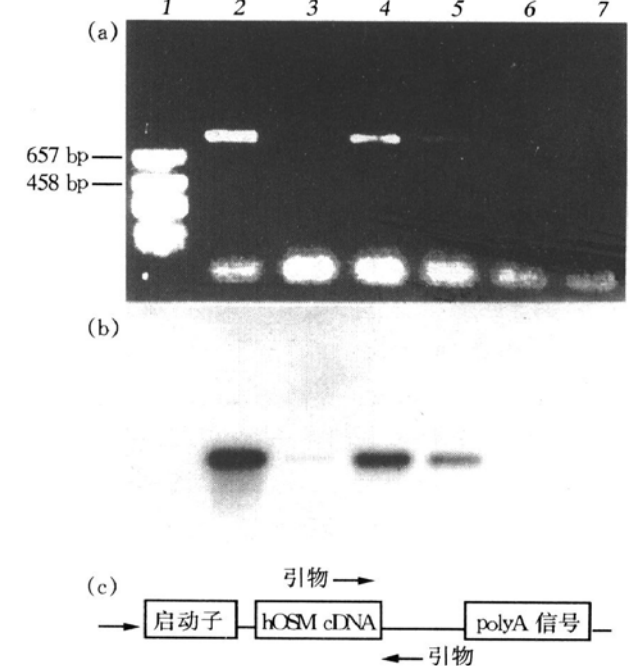


图4 RT-PCR 检定 OSM 基因 mRNA 转录 (a) PCR 产物, 1: DNA 分子质量标准 (pGEM-7Z (+) / Hae III); 2~7: 依次为 pO17、pO-12、pEO-1、pEO-9、p-1 和 B-16 细胞; (b) DNA 印迹图谱; (c) 引物位置示意图.

在作基因组整合检定时, 采用与 Egr-1R 序列 (或 pCF-neo 质粒中 CMV 启动子序列) 对应的上游引物和与 OSM cDNA 序列对应的下游引物 (图 2c 和图 3c), 扩增出的片段是连续的转录单位. 这样既比单纯检测 neo 基因更能准确地反映整合与表达的关系, 也可避免直接检测 cDNA 时因基因组中也存在 cDNA 间断序列而可能出现的非特异扩增. mRNA 转录的检测, 采用与 OSM cDNA 序列对应的上游引物和与 pCF-neo 质粒序列对应的下游引物 (图 4c), 这样做的好处是可以区分宿主细胞中外源性与内源性 mRNA 的转录 (本项实验中黑色素细胞不产生 OSM). pCF-neo 质粒的克隆位点距加 polyA 信号尚有一段序列, 按此段序列合成引物, 可以检测到 mRNA 转录, 我们的实验是成功的.

2.3 OSM 分子质量

天然来源的人 OSM 是由 228 个氨基酸组成的单链糖蛋白, 分子质量为 28 ku^[3]. 但用重组基因在真核细胞中表达的 OSM 分子质量在 32~ 36 ku 之间, 原因可能与肽链 C 端的翻译后加工有所不同有关^[5]. 我们构建的质粒在黑色素瘤细胞中表达的 OSM 分子质量为 32 ku (图 5), 与文献报道一致.

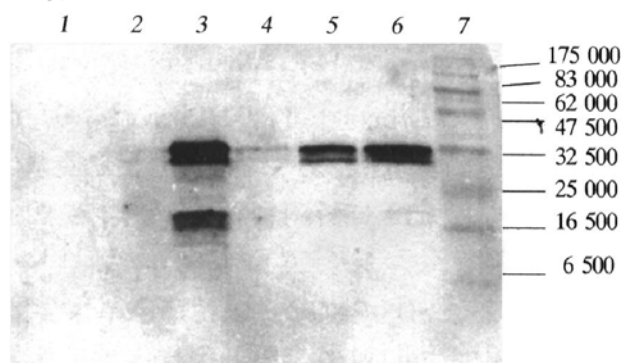


图 5 SDS 电泳-免疫印渍法测定 OSM 分子质量

1: B-16; 2: p-1; 3: pO-17; 4: pO-12; 5: pEO-9; 6: pEO-1; 7: 标准分子质量蛋白.

参 考 文 献

1 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T eds. Molecular Cloning. 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 9. 31~ 9. 58

- 2 Gregory W K, Laszkiewicz I, Grubiska B, *et al.* Generation of labeled DNA probes by PCR. In: Griffin H G, Griffin A M, eds. PCR Technology. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., 1994. 37~ 42
- 3 Zarling J M, Shoyab M, Marquardt H, *et al.* Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, **83** (24): 9739~ 9743
- 4 吕 星, 邢瑞云, 孙志贤等 (Lu X, Xing R Y, Sun Z X, *et al.*). 小鼠 Egr-1 基因调控序列的克隆及其辐射诱导特性的鉴定. 中国肿瘤生物治疗杂志 (Chin J Cancer Biother), 1998, **5** (1): 16~ 19
- 5 Linsley P S, Kallestad J, Ochs V, *et al.* Cleavage of a hydrophilic C-terminal domain increases growth-inhibitory activity of oncostatin M. Mol Cell Biol, 1990, **10** (5): 1882~ 1890

Identification of Human OSM cDNA Integrated into Genome of Mouse Melanoma Cells and Its mRNA Transcripts by PCR Methods. L Ü Xing, XING Rui-Yun, SUN Zhī Xian, PEI Xue-Tao, WU Zu-Ze (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Genomic integration and mRNA transcripts of human OSM cDNA in transfected mouse melanoma cells were identified by PCR and RT-PCR methods. A sense primer for the regulatory sequence in carrier vector paired with an antisense primer for cDNA was used in integration analysis, a continuous transcription unit was amplified with the expected size in OSM cDNA transfected cells but not in the wild type or vector control cells, reflecting a more accurate relationship between integration and expression. In transcription analysis, a sense primer for cDNA paired with an antisense primer for a sequence between the multiple cloning site and polyA signal in carrier vector was used to distinguish exogenous transcripts from endogenous gene products. This method is convenient and specific in determining exogenous gene integration and expression in transfectants.

Key words integration, transcription, oncostatin M, melanoma