中国科学(C 辑)
第26卷 第1期 SCIENCE IN CHINA (Series C) 1996年2月

化学致癌作用靶基因的分离与测序*

柯 杨[①] 徐国威[②] Koichi Hagiwara[②] 张建明[①] 宁 涛[①]
王 冰[①] 苏秀兰[①] 冯莉雅[①] 路桂荣[①]
吕有勇[①] Curtis C. Harris[②]

(① 北京市肿瘤防治研究所,北京医科大学临床肿瘤学院,北京 100034; ② 美国国立癌症研究所,马里兰州)

摘要 采用新的差异表达基因显示法,从一对处于不同癌变阶段的人类胃粘膜上皮细胞,显示和分离出了差别表达的基因. 其中8个基因片段克隆于质粒DNA,荧光标记测序分析并在基因库中查找比较,发现其中一个基因与人类"真核蛋白合成启动因子"EIF-4γ) 97.5%同源,另一个与大鼠SX1基因有86.2%的同源. 其余6个为未报道基因序列. 由于这对细胞的差别是化学致癌物MNNG所致,这些新分离的基因可能即为化学致癌剂的靶基因,与细胞的癌变相关.

关键词 差异显示法 化学致癌 人胃粘膜上皮细胞 基因克隆

流行病学的研究表明,胃癌的发生与不良的饮食习惯相关. 其中高盐,低维生素及微生物,化学致癌物前体污染等是重要因素. 在研究亚硝酰胺化学致癌的工作中,我们建立了永生性的人类胃粘膜上皮细胞GES-1,并用亚硝酰胺代表物MNNG处理,诱导出了部分恶性表型,如骨架结构的改变及软琼脂集落生长能力等. 采用从两组表型相异的细胞中分离未知基因的新方法"差异显示法"(Differential Display)[1, 2],展示出了这两组细胞基因表达的差别,并从中分离克隆出了8个基因片段,进行测序分析,深入研究其与化学致癌的关系.

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养

GES-1细胞来源于9个月的胎儿胃粘膜,经SV40转化获得永生性[3]. MC细胞源于GES-1,于20代经2×10^{-5} mol/L MNNG (N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍)处理24 h后存活细胞克隆的混合培养物. MC发生了形态改变,骨架微丝结构异常,克隆形成率增加,并获得了软琼脂形成克隆的能力(研究生论文待发表).

细胞培养在含多种生长因子和生长相关因子的151培养基中,每周1:6传代1次,消化液为0.5%胰酶0.002%EDTA[4].

1995-07-19收稿
* 国家自然科学基金、北京市高技术实验室、国家"八六三"高科技、美国Rockefeller基金会资助项目

1.2 RNA的提取及纯化

每种细胞取2个175 cm^2方瓶，在细胞长至70% ~ 80%汇成单层时，用PBS洗2遍，加入4 mL溶液D(0.11 mL二巯基乙醇加入16 mL胍嘧啶)，将裂解液收集于15 mL试管，加入0.55 mL 2 mol/L的醋酸钠及1体积的水饱和酚，0.2体积氯仿，混匀后4 000 g离心20 min. 后用1体积氯仿抽提1次，4 000 g离心20 min，将沉淀物转入Epphendorf管，加DEPC水后再重复常规酚：氯仿及氯仿抽提，乙醇沉淀，最终将RNA溶于DEPC水中.

为去除DNA污染，使用Gen Huntor公司的Messageclean Tm试剂盒，取总RNA5 μg加入反应缓冲液，及10个单位的DNaseI，总体积60 μL于37 ℃保温1 h，随后用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀后用70%的乙醇洗1遍，再将纯化的RNA溶于50 μL DEPC水中.

1.3 mRNA的逆转录反应

此步是将mRNA逆转录成第一条单链cDNA模板以便后面的PCR扩增反应. 根据mRNA3'端的poly A尾设计含10个寡聚T的引物(T12 mN引物)，再分别加上A.C.G.T，随机与各种mRNA复性，在逆转录酶的作用下合成cDNA. 具体反应如下：

(1) 10 μg RNA, T12 mN (A,C,T,G任一种) 10 μmol/L 6.5 μL加水41 μL, 65 ℃水浴5 min. 自然冷却至室温，使RNA polyA二级结构打开，引物与之结合.

(2) 10× 缓冲液(在Kit中)5 μL, RNase block (在Kit中)1 μL, 逆转录酶RNase HRT 2 μL, 25 mm dNTP (Phamacia) 2 μL, 混匀后37 ℃ 60 min.

产物用常规酚及氯仿抽提最终溶于TE溶液中备用.

1.4 PCR反应

以上述4种cDNA为模板，用20种5'端随机引物，分别以对应的4种3'端引物进行PCR反应，这样从理论上基本可以扩增得到细胞中所有产物. 反应体系如下：10×PCR缓冲液: 2 μL,T12 mN(A,C,G,T任一种): 2 μL, 5'primer (1~20任一种): 2 μL, dNTP: 20 μmol/L 2 μL, ^{35}S-dATP: 1.5 μL, Ampli Taq: 0.2 μL. cDNA样品(以A.C.G.T任一种T12 mN逆转录的与所选T12 mN相对应)1 μL.

以上试剂除^{35}S-dATP为Phamacia公司产品外，其余均为Gen Huntor公司试剂盒. 将每一试管标清所用3'和5'引物号及样品号，用Perkin Elmer Cetus公司的PCR仪进行PCR反应：94 ℃ 3 min 1次，94 ℃ 30 s, 40 ℃ 2 min, 72 ℃ 30 s, 循环35次，72 ℃ 5 min 1次，4 ℃保存或直接走胶.

1.5 差别cDNA的显示，再扩增及克隆

取3.5 μL PCR产物加入2 μL测序胶样品缓冲液，90 ℃ 2 min后立即冰浴上样. 6%的DNA测序胶为Bio Red产，用前加入10%的APS(过硫胺酸)促凝，灌胶2 h后即可使用. 60 W走胶3 ~ 4 h，将胶在干胶器上转移干燥于3 mm滤纸. 压片，放射自显影24 ~ 48 h，压片时标记明确，以便日后带形和胶的位置能准确对齐. 洗出片子后即可看出两细胞之间在每对同样引物反应下扩增的带形差异. 选择差异明显(有或无的差异)，片段较大清晰的带，从胶上切下浸泡于50 μL水中4 ℃过夜. 次日用同样的引物再行扩增. 反应如下：10×PCR缓冲液2 μL, T12 mN (A,C,G,T任一种):2 μL(与原产物同), 5'primer (1~20任一种): 2 μL (与原产物同), dNTP (250 μmol/L): 1.6 μL, Ampli Taq: 0.2 μL, 胶浸出液: 2 μL, 水: 10.2 μL, PCR反应的时间和温度与前同.

再次 PCR 的产物走 1% 琼脂糖胶，查对片段大小．如产量很少，可以再重复 1 次或 2 次以得到足够的产物备作克隆或探针．

新鲜的 PCR 再次扩增产物，可以用 Invitrogen 产的 TA 克隆试剂盒进行直接克隆：先进行 cDNA 片段与试剂盒中提供的载体 PCR TmII 的连接反应：水：5 μL，10× 缓冲液：1 μL，载体：2 μL，PCR 产物：1 μL，T4 连接酶：1 μL．

12 ℃ 过夜，所有试剂均在 TA 试剂盒中提供．取 2 μL 反应物转化 100 μL 大肠杆菌 XLI-Blue 感受态细胞．涂于含 100 μg/mL 氨苄青霉素和 X-gal 的琼脂培养盘，37 ℃ 培养 16 h 后选择白色克隆于 5 mL LB 培养液中摇动培养 24 h 提取小量质粒走 1% 琼脂糖胶，快速检测重组体的存在于否，凡有重组的用 EcoRI 酶切，再走胶证实外源 cDNA 的插入，随后进行大量制备重组质粒．提取纯化的质粒溶于 TE 溶液中备作测序分析或制备探针．

1.6　荧光染料标记测序

使用 Applied Biosystems 公司的 Taq Dye Primer Cycles Sequencing 试剂盒对这 8 个重组质粒插入基因片段作荧光染料标记测序分析如下：

(1) 先将质粒 DNA 稀释调整浓度为 200 ～ 250 ng/μL.

(2) 配制 A,C,G,T 4 种反应混合物

	A	C	C	T
试剂	ddATP	ddCTP	ddGTP	ddTTP
d/ddNTP 混合物/μL	1	1	2	2
染料标记的引物/μL	1	1	2	2
5 × 测序缓冲液/μL	1	1	2	2
质粒 DNA 模板/μL	1	1	2	2
稀释好的 Taq 酶溶液/μL	1	1	2	2
每种反应总体积 /μL	5	5	10	10

将 A,C,G,T 4 管反应物混匀后稍事离心加入 20 μL 石蜡油，在 Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler PCR 仪上进行合成反应：95 ℃ 30 s，55 ℃ 30 s，70 ℃ 1 min，循环 15 次后，95 ℃ 30 s，70 ℃ 1 min．再循环 15 次保存于 4 ℃．

(3) 样品的浓缩及走胶测序　用乙醇和醋酸钠将样品沉淀干燥，在加样走胶前重新溶于加样缓冲液：去离子甲酰胺/5 mmol/L EDTA (pH8.0)，体积比＝5/L，总体积 6 μL 混匀，短暂离心后 90 ℃ 加热 2 min 立即上胶，开启与电泳仪联接的电脑，按程序操作定标，设置电压，给样品命名，开启电泳仪，14 h 后电脑打印机会自动给出测序结果．

2　结果

2.1　GES-1 及 MC 细胞的 cDNA PCR 扩增产物的差别

经过 5'端 20 个随机引物及 3'端 4 个引物对 GES-1 和 MC 细胞的 cDNA 进行 80 个组合的 PCR 扩增，其中一些组合在 6% DNA 测序胶上反应出明显的差别带 (见图 1(a)，(b)).

2.2　差别 cDNA 片段的再扩增

将差别明显的条带从胶上切下，浸泡下 TE 缓冲液中过夜，取浸出物 1 ～ 2 μL 做模板，用

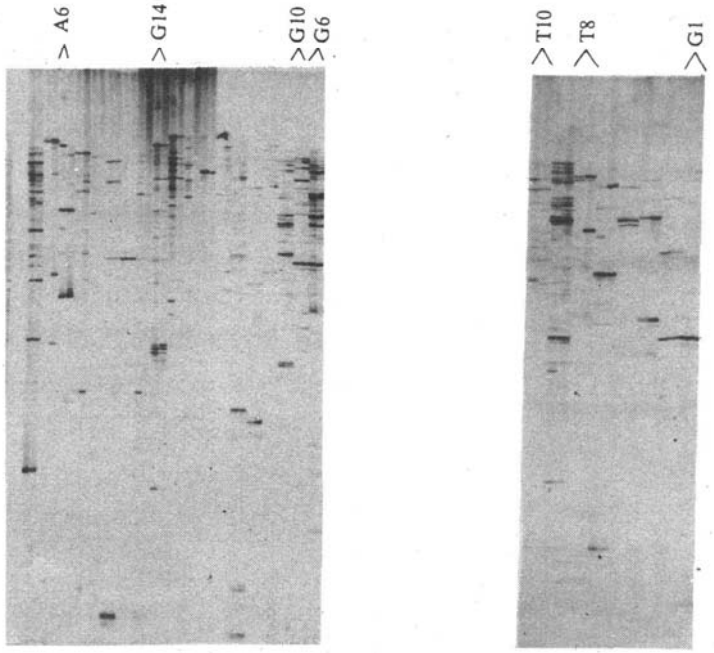


图1 Differential Display法显示GES-1和MC细胞表达片段的差异

6%测序胶电泳，字母代表5'primer，数字代表3'primer，每两泳道是GES1和MC在相同primers下的PCR产物的差别

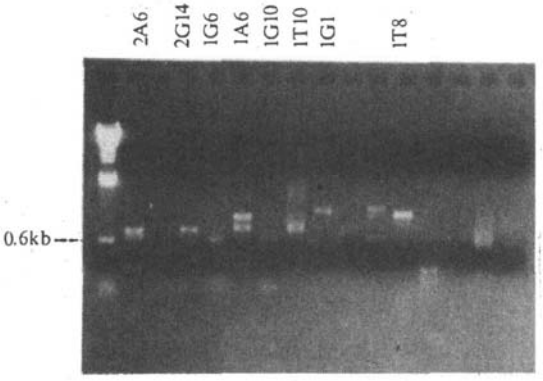


图2 GES-1和MC细胞差异表达的带型经从测序胶上切割浸泡重新PCR扩增产物

1%琼脂糖胶

同样的引物重复PCR过程，从其中16个切除物中得到了扩增的纯化片段．琼脂糖电泳显示其片段大小与切除部位吻合(图2)反应物或直接用于克隆，或再重复PCR反应，纯化后备做探针用于进一步在2细胞上的表达检测．

2.3 差别cDNA片段的克隆

将上述PCR产物与PCR TmII载体连接后转化大肠杆菌，将白色克隆做小量制备，每个转化挑4个克隆，走胶快速检测，凡有插入的其分子量较未插入者大．将其中连接插入成功的(图3)进一步酶切验证其插入片段的存在(图4)，结果有8个克隆成功地插入了外源片段．将重组的质粒进行大量制备，提纯备做测序分析．

2.4 测序结果

将电脑打印的测序结果选择本底低，可读部位，约150～330个bp的片段输入电脑DDBJ FASTA E-Mail Server TEST version 1.1程序，与已发表的基因片段进行比较，来源于GES-1细胞的6个基因片段1A6, 1G1, 1G6, 1G10, 1T8, 1T10均未找到相似的已知基因．来源于MC细胞的2A6与基因库中的HUME IF 4G (Human Eukaryotic Initiation Factor

4Gamam) 有 97.3% 同源 (图 5)．2G14 与 Rat (SHR Strain) 的 SX1 基因 86.2% 同源 (图 6).

3　讨论

传统的从两组表型相异的细胞中分离差别表达基因的方法是差减克隆法 (cDNA Subtraction Library)．其基本原理是将两组细胞制备 cDNA 文库，然后插入到 ZapII

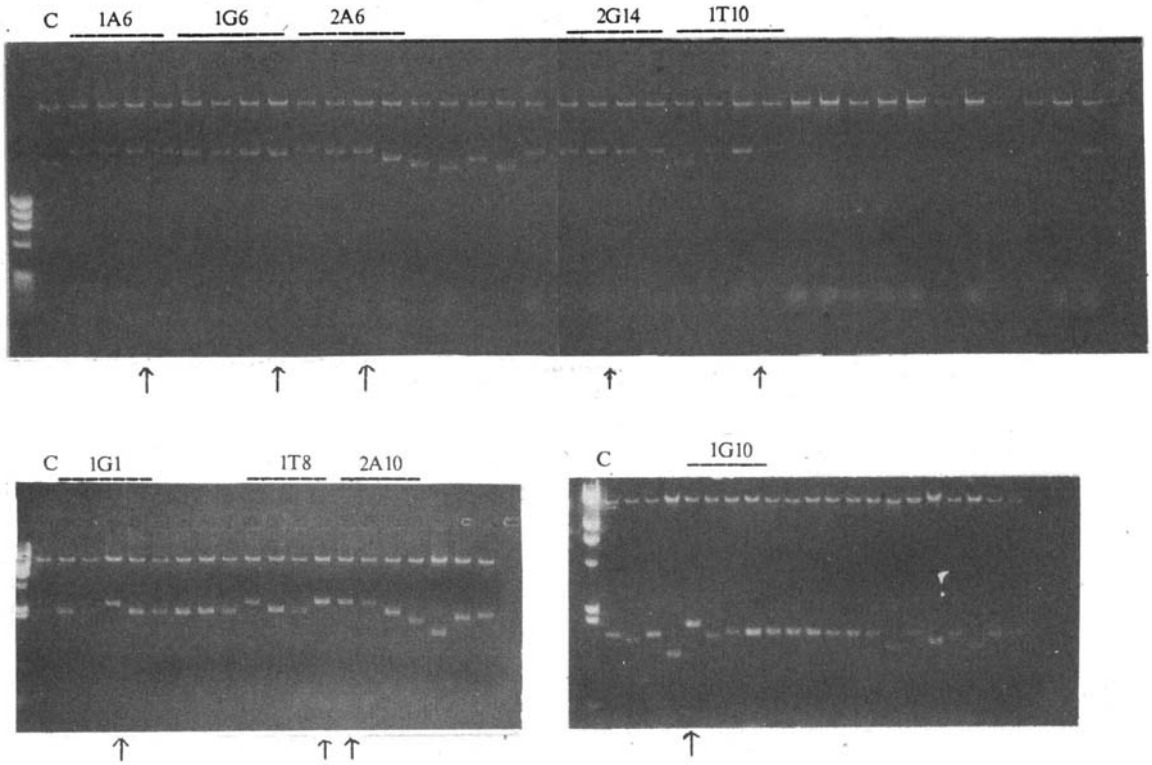


图 3　经再次 PCR 扩增的差异片段被构建入质粒后快速检测
1% 琼脂糖电泳，C 为对照空质粒

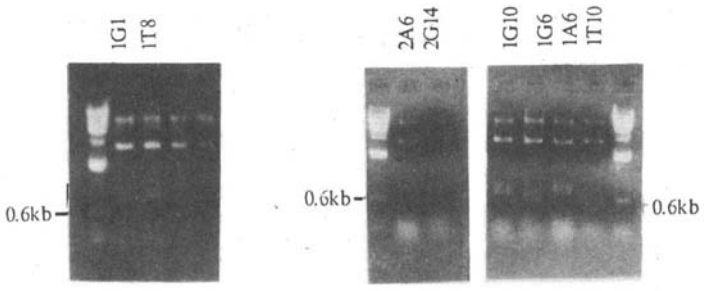


图 4　构建成功的新质粒 (图 3 箭头所指)
经 ECORI 酶切后证明插入片段的存在，1% 琼脂糖电泳

载体系统，对 M13 或 R408 辅助噬菌体诱导的单链 cDNA 作生物素标计，与来自另一细胞的单链 cDNA 进行杂交．只在其中一个细胞表达的 cDNA，因为无杂交对象而被纯化分离．此

```
2A6 (se                                    GCAATCGATGTCAGAAGGAGTTTGAGAAAGAC
                                           ::::::::::::::::::::::::::::::
D12686 GTGACTGTGAACTTCCGAAAGCTGTTGTTGAATCGATGTCAGAAGGAGTTTGAGAAAGAC
          2290       2300       2310       2320       2330       2340

            40         50         60         70         80         90
2A6 (se AAAGATGATGATGAGGTTTTTAAGAAGAAGC-AAAAGAGATGGATGAAGCTGCTACGGCA
        :::::::::::::::::::: ::::::::: X:::::::::::::::::::::::::
D12686 AAAGATGATGATGAGGTTTTTGAGAAGAAGCAAAAAGAGATGGATGAAGCTGCTACGGCA
          2350       2360       2370       2380       2390       2400
            100        110        120        130        140        150
2A6 (se GAGGAACGAGGACGCCTGAAGGAAGAGCTGGAAGAGGCTCGGGACATAGCCCGGCGGCGC
        :::::::::: :::::::::::: :::::::::::::::::::::::::::::::  :: :
D12686 GAGGAACGAGAACGCCTGAAGGAGGAGCTGGAAGAGGCTCGGGACATAGCCCGGCGCTGC
          2410       2420       2430       2440       2450       2460

            160        170        180        190        200        210
2A6 (se TCTTTAGGGAATATCAAGTTTATTGGAGAGTTGTTCAAACTGAAGATGTTAACAGAGGCA
        ::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::::
D12686 TCTTTAGGGAATATCAAGTTTATTGGAGAGTTGTTCAAACTGAAGATGTTAACAGAGGCA
          2470       2480       2490       2500       2510       2520
2A6 (se ATAATGCATGACTGT
        ::::::::::::::X
D12686 ATAATGCATGACTGTGTGGTCAAACTGCTTAAGAACCATGATGAAGAGTCCCTTGAGTGC
          2530       2540       2550       2560       2570       2580
```

图 5 2A6 与 D12686 基因的比较分析

方法因技术要求高，工作量大，步骤繁杂耗时，一般不易开展．差异显示法是近年来发展起的新方法，由于其程序简单灵敏，重复性好，省时而在国外广泛应用，成为分离未知新基因的常用手段．我们用这一先进的分子生物学技术从 GES-1 和 MC 中克隆了 8 个基因片段，其中 6 个是 GES-1 单独表达的产物，2 个是 MC 单独表达的产物，序列分析表明，其中一个来源于 MC 的基因片段与人类真核启动因子相关[2]，这一基因是由 Yan 等人于 1992 年报道的人 5.1 kb cDNA 全长序列，其编码 154 ku 的含 1 396 个氨基酸残基的蛋白．该蛋白在调节 mRNA 翻译时参与 mRNA 帽区识别，依赖于 ATP 使 mRNA 的 5′端二级结构展开与核糖体 RNA 的结合．另一基因与大鼠血管紧张素相关，在基因库中查出时尚无正式文章对其报道．其余基因则为未报道基因．

细胞癌变是个涉及多基因多步骤的过程．在无法进行整体实验的情况下，利用体外培养的人类细胞，尤其是癌变的靶—— 上皮细胞进行研究尤为重要．不致瘤的永生性人胃粘膜上皮细胞 GES-1 经胃癌相关化学致癌剂 MNNG 处理发生了进一步的表型改变，其中软琼脂集落生长能力的改变说明 MC 细胞向癌变方向又进了一步．这一对细胞系来源于同一个体，具有相同的遗传背景，它们的差异只是由于 MNNG 处理造成的，因此是研究化学致癌物所至基因改变的较为理想的材料．经差别显示法分离出的多个克隆，来源于 GES-1 的有可能是新抑癌基因之候选基因，而来源于 MC 的则可能是癌基因．深入的工作将用这些基因片段作为探针，在细胞系和胃癌组织中检测表达的规律，以进一步证实其与癌变的关系．

```
2G14 (a                                    TAAACAACCTATC-GAACTGCCTTTACATG
                                           :::::: ::::::  ::::: :      :
D00384 TACACTCACGTGCTTGGATGTATCCATCTTTAAACAGCCTATCAAAACTGTC------TA
            950        960        970        980        990
       30         40         50         60         70         80
2G14 (a GTGCACTGCTGGCTATAAATGTGCAATACCTGATGGGGGGNAAATTCCAGGAGNGCTTAT
        :  X:::::::::::::::::::: ::::::::  ::: :.:::::::::.:: .: ::::
D00384 GCACACTGCTGGCTATAAATGTGCTATACCTGACAGGGAGAAAATTCCATGAAAGATTAT
       1000       1010       1020       1030       1040       1050

      90         100        110        120        130        140
2G14 (a AAAAGCATGCTAGAAGCATTAAAATTTTCCAGCCATTTCATTATTTGTCATTCAGCAAAT
        :::::: ::::::::::::::::::  :::::::::::::::::::::::::::::::: :
D00384 AAAAGCTTGCTAGAAGCATTAAAAAATTCCAGCCATTTCATTATTTGTCATTCAGCAACT
       1060       1070       1080       1090       1100       1110

     150        160        170        180        190        200
2G14 (a GTTAATATTTCTCTTTGTATTCTTAGTGAAGCTTGAAATTAACATGGCTTTTTGTTTATT
        ::::::::: :. ::::::::: :: ::::::::::::::::::::::::::::::::
D00384 GTTAATATTACTTTTTGTATTCTTAGTGAAGCTTGAAATTAACATGGCTTTTTGTTTATT
       1120       1130       1140       1150       1160       1170

     210        220        230
2G14 (a TCTTCATTTCTGCCTCCTTGTCAGCCCATT
        :::::::::::::  :::::::::X :::
D00384 TCTTCATTTCTGCACCCTTGTCAGCTAATCTCAGGAATGCAGTTTGTTAGCTGGCTTACT
       1180       1190       1200       1210       1220       1230
```

图 6　2G14 与 D00384 基因的比较分析

参　考　文　献

1 Ling P, Pardee A B. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science, 1992, 257: 967～971

2 Yan R, Rychlik W, Etchison D *et al*. Amino acid sequence of the human protein syntehsis initiation factor eIF-4γ. J Biol Chem, 1992, 267(32): 23 226～23 231

3 柯　杨，宁　涛，王　冰等．人胃粘膜上皮细胞 GES-1 的建立及其生物学特性．中华肿瘤杂志，1994, 16(1): 7～10

4 Lechner J F, Laveck M A. A serum-free method for culturing normal human bronchial epithelial cells at clonal density. J Tissue Culture Methods, 1985, 9(2): 43～47