

文章编号: 0529-6579 (2000) 06-0192-05

用 cDNA 芯片技术快速鉴定 鼻咽癌组织消减文库中的差异基因*

马英红¹, 张林杰¹, 王秀清², 曾木圣¹, 李 冰³, 曾益新¹

(1. 中山医科大学肿瘤防治中心肿瘤研究所, 广东 广州 510060;

2. 深圳市人民医院; 3. 广州医学院)

摘 要: 迅速分离、鉴定鼻咽癌组织中差异表达基因是研究其发生、发展分子机制的基础。先用正常鼻咽组织和鼻咽癌组织进行抑制性消减杂交, 构建了消减文库。再用含有 14 000 个基因片段的 cDNA 芯片, 对此库进行了筛选, 结果发现了 417 个差异表达的基因, 其中在鼻咽癌组织中上调的 170 个, 下调的 247 个。抑制性消减杂交提供了一个差异基因的富集库, 而利用 cDNA 芯片同时筛选上万个基因, 是快速获得多个差异基因的有效方法。

关键词: 鼻咽癌; 抑制性消减杂交; cDNA 芯片

中图分类号: R739.63 **文献标识码:** A

鼻咽癌有明显的遗传倾向, 分子遗传学的研究已证明其染色体确实存在着复杂的改变, 如 1q、12 有扩增, 3p、9p、11q 丢失等^[1,2], 这些结果提示, 可能存在尚未发现的鼻咽癌相关基因, 从表达的差异性入手是获得相关基因的最佳途径之一, 目前, 常用的方法有 mRNA 差异显示^[3]、cDNA 代表性差异分析^[4]和抑制性消减杂交^[5], 其中抑制性消减杂交更适合于克隆低丰度基因, 而备受青睐^[6]。但这些方法所得到的差异片段必须经过克隆、筛选、测序和同源性比较等繁杂的过程, 才能获得有关的基因信息, 这已不能满足人类基因组时代迅猛发展的要求。

我们应用抑制性消减杂交技术, 成功的构建了鼻咽癌组织和正常鼻咽组织的消减文库, 并已从此库中筛选出 12 个阳性克隆。为了进一步高效获得更多的候选基因, 本研究选择了 cDNA microarray 技术, 对此文库进行了大规模的筛选, 得到了事半功倍的结果。

1 材料与方法

1.1 组织标本

鼻咽组织取自本院鼻咽癌科, 鼻咽活检组织, 取下后立即放入 RPMI1640 培养液中, 保持组织存活, 2~4 h 内于液氮保存, 经病理确诊后, 分为鼻咽癌组织或正常鼻咽组织。

1.2 RNA 提取

按 TRIzol 试剂说明书抽提总 RNA。将没有明显降解的 18 例鼻咽癌组织的总 RNA 和没有明显降解的 17 例正常鼻咽组织的总 RNA 分别混合, 按 mRNA Isolation System (GIBCO

* 基金项目: “973” 重点资助项目; 中山医科大学 “211 工程” 重点课题资助项目

收稿日期: 2000-09-18; 作者简介: 马英红 (1960~), 男, 博士后, 讲师; 研究方向: 鼻咽癌相关基因; 通讯联系人: 曾益新。

BRL)说明书从中纯化 mRNA,分别获得鼻咽癌组织 mRNA 和正常鼻咽组织 mRNA.

1.3 消减文库的构建

按 PCR-select cDNA Subtraction Kit (Clontech)说明书进行抑制性消减杂交.首先,将 mRNA 逆转录成 cDNA,用 *Rsa*I 酶切成平端;然后,将他们分成两份,一份为 tester,另一份为 driver.在筛选鼻咽癌相关癌基因时,用鼻咽癌的 tester 与正常鼻咽的 driver 进行消减杂交;在筛选鼻咽癌相关抑癌基因时,用正常鼻咽的 tester 与鼻咽癌的 driver 进行消减杂交;最后,经 2 轮杂交和 2 次 PCR 扩增,得到 2 个差异基因高度富集的消减文库.

1.4 探针的标记

用随机引物和 Klenow polymerase 对上述 2 个消减文库进行同位素标记.每 400 ng cDNA 加 100 u Ci^{33}P -dATP,酒精沉淀除去未掺入的同位素,放射性计数在 $6 \times 10^5 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上.

1.5 杂交、洗膜、显影

预杂交液 ($6 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS, $5 \times \text{Denhardt}$ 试剂, $10 \mu\text{g/mL}$ 已变性的鱼精 DNA) 中, 68°C 预杂交 3 h. 杂交液 ($6 \times \text{SSC}$, 0.5% SDS, $10 \mu\text{g/mL}$ 已变性的鱼精 DNA, 已变性的探针) 中, 68°C 杂交 20 h. 37°C 洗膜 1 h; 65°C 洗膜 1 h. 磷屏压片显影.

1.6 图像分析

cDNA 芯片共有 14 000 个基因,每个基因 2 点.用 FLA-3000 信号记录仪对各点进行扫描,并作以下校正:

(1) 每一方阵中 ($7 \times 7 = 49$ 点) 的空白点为本底,校正本方阵的其余各点:

各点的校正值 = 各点的实测值 - 本底值

(2) 同一张膜上代表同一基因的两点的亮度差异必须小于 2 倍,否则,认为是不可靠点被剔除.

在此基础上,比较 2 张膜上同一点的亮度,差异在 3 倍以上者,认为其在 2 种组织中有明显的表达差异.

2 结 果

2.1 组织的总 RNA

鼻咽癌组织的总 RNA 和正常鼻咽组织的总 RNA,经电泳检测无降解 (见图 1) 后,纯化成 mRNA,用于构建消减文库.

2.2 消减文库

用鼻咽癌组织作 “tester”、正常鼻咽组织作 “driver” 和正常鼻咽组织作 “tester”、鼻咽癌组织作 “driver”,分别得到 2 个消减文库, C: cDNA-pool 和 N: cDNA-pool. 由于经过 *Rsa* I 酶切,长度在 500 ~ 2 000 bp (见图 2).

2.3 消减基因的表达谱

将 2 个消减文库所标记的 cDNA 探针,分别与含有 14 000 个基因的 cDNA 芯片杂交后显影,如图 3 所示.图中的 A 和 B 分别显示 1/2 芯片与 C: cDNA-pool 和 N: cDNA-pool 杂交的结果.

2.4 鼻咽癌组织中的差异基因

经扫描仪分析比较,发现了 417 个在鼻咽癌组织差异表达的基因,其中上调表达的有

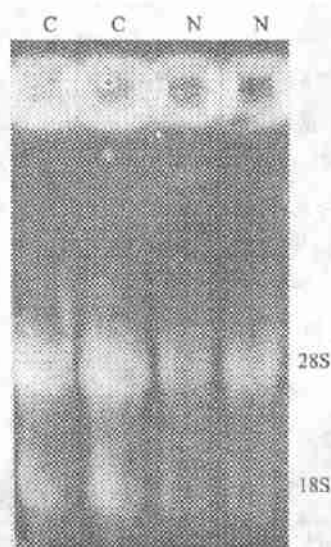


图 1 组织的总 RNA

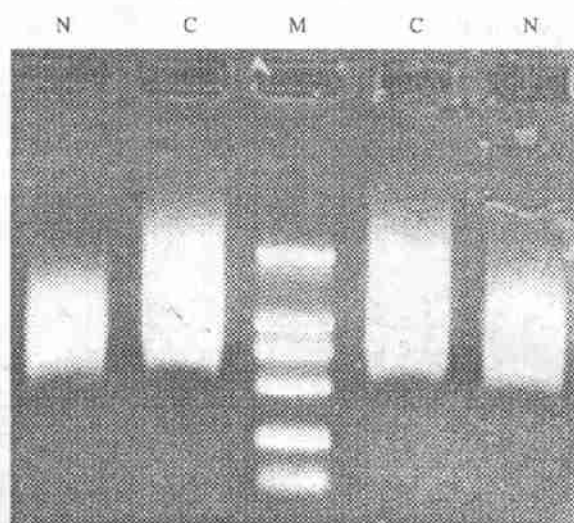


图 2 消减文库

C 鼻咽癌组织; N 鼻咽组织; M DNA 相对分子质量标准 (DL-2000)

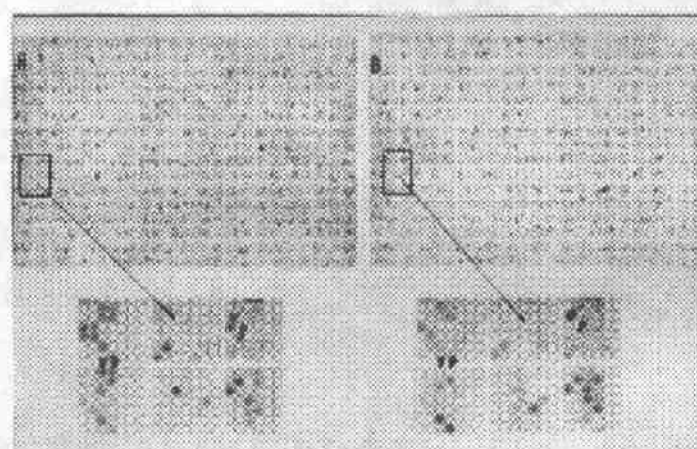


图 3 差异基因表达谱

A, C cDNA-pool 作探针; B, N cDNA-pool 作探针;
箭头: 表示基因 (两点/基因) 在 A 中的表达高于 B

170 个, 下调表达的有 247 个, 已知基因有 85 个, EST 有 224 个。表 1 列出了差异最显著的 10 个基因的名称和它们的染色体定位。

3 讨 论

研究肿瘤相关基因可为肿瘤的诊治找到新的突破口。在众多的方法中, 抑制性消减杂交有其独特的优势而被广泛运用^[7], 我们运用抑制性消减杂交方法, 构建了鼻咽癌组织和正常鼻咽组织的消减文库, 并用传统的差异筛选方法从 1/5 库中筛选出 12 个阳性克隆, 测序表明, 其中 2 个 cDNA 序列为新基因序列 (数据见另文)。但是, 经典的克隆技术,

表 1 5 个上调和 5 个下调的差异表达基因及其染色体定位¹⁾

Clone	Unigene ID	Description	Fold change	Location in chromosome	
NPCBEG 01	Hs.153752	CDC25 Hu2 = cdc25 + homolog [human, mRNA 3118 nt]	+ 66.96	Chromosome: 20,	D20S97-D20S192, D20S117-D20S113
ADBAHB 06	Hs.84298	Human Ia-associated invariant gama-chain gene	+ 56.73	Chromosome: 5,	14D5S470-D5S487 D14S65-qTEL
NPCBNF 04	Hs.124983	Homo sapiens mRNA; cDNA DK-FZp564C142	+ 55.73	Chromosome: 8D8S518-D8S277	
TPAAFE 02	Hs.229276	oy38h12.x1 Homosapiens cDNA,	+ 55.02	Chromosome: 1,	4D1S2865-D1S418 D4S1581-D4S1536
	Hs.108661	3' end		Chromosome: 6	D6S422-D6S1665
ADBAKB 07	Hs.182825	Human ribosomalprotein L35 mRNA	+ 51.16		
CKCACG 04	N	N	- 65.07	N	
DCAAAA01	N	N	- 48.66	N	
BMFAPH 01	GbAC004656	Homo sapiens Xp22BAC GSHB-358P8 (Genome Systems Human BAC library)	- 47.66	N	
		Zw56f01.r1 Homosapiens cDNA,			
HTBAAH 09	Hs.256011	5' and	- 44.74	N	
ADAAAE 10	Hs.75415	Homo sapiens mRNA for beta 2-Microglobulin	- 44.00	Chromosome: 15D15S146-D15S117	

1) 差异表达基因共发现 417 个，上调 (+) 247 个，下调 (-) 170 个；N 为无信息

由于其工作量大、耗时、耗材，已经不符合现今的需求，如何利用人类基因组计划的丰富信息资源，来改善传统的克隆新基因的策略，是值得研究的课题。

基因芯片，尤其在国外，应用的非常广泛^[8]。我们是利用芯片来筛查我们构建的消减文库，由于通过消减杂交，已去除了绝大部分的同源基因，所以，减少了大部分的本底干扰，使我们的杂交信号更强，避免了假阳性的产生。在本实验中，即使将本底提高了 5 倍，还是得到了差异在 3 倍以上的基因 417 个。利用基因芯片，我们省去了 cDNA 克隆、转菌、铺板、筛选、测序、同源性比较找出同源 EST 克隆等过程，一步就可以得到 EST 或全长基因的信息，为后续工作打下了良好的基础。由此可见，将传统的抑制性消减杂交方法与新兴的基因芯片技术结合，优势互补，事半功倍。

参考文献：

[1] HUI A B, LO K W, LEUNG S T, et al. Detection of recurrent chromosomal gains and losses in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridization[J]. Int J Cancer, 1999, 82(4):498.

[2] 郭颖, 方如燕, 梁启万, 等. 47 例鼻咽癌遗传变异的研究[J]. 癌症, 1999, 18(1):5.

[3] TEDDER T F, STREULI M, SCHLOSSMAN S F, et al. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human B lymphocytes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85:208.

[4] HUDEBANK M, SCHATZ D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22:5640.

[5] DIATCHENKO L, LAU Y E C, CAMPBELL A P, et al. Suppression subtractive hybridization: A method for gen-

erating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 6025.

- [6] VON STEIN O D, THIES W G, HOTMANN M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25: 2598.
- [7] YOKOMIZO T, IZUMI T, CHANG K, et al. A G-protein-coupled receptor for leukotriene B₄ that mediates chemotaxis[J]. Nature, 1997, 387: 620.
- [8] LEHMAN T A, HAFFTY B G, CARBONE C J, et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer[J]. Cancer Res, 2000, 60(4): 1062.

Rapid Identification of Differentially Expressed Genes in Subtractive Library of Nasopharyngeal Carcinoma (NPC) Using cDNA Chip

MA Ying-hong^{*}, ZHANG Lin-jie, WANG Xiu-qing, ZENG Mu-sheng, LI Bing, ZENG Yi-xin

Abstract: Rapid Identification of differentially expressed genes is basic work for understanding molecular mechanism of pathogenesis of NPC. First, subtractive libraries were constructed using suppression subtractive hybridization (SSH) of NPC tissue and normal nasopharyngeal tissue. Then, these two libraries were screened by cDNA chip which contains 14 000 genes. The results show that total differentially expressed genes are 417, among which in NPC tissue upregulated genes are 170 and downregulative genes are 247. It is suggested that many differentially expressed genes can be simultaneously gained by combination of SSH and DNA chip.

Keywords: nasopharyngeal carcinoma; suppression subtractive hybridization; cDNA chip

^{*} Cancer Institute, Cancer center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China