



应用RD-PCR方法制备K562细胞表达谱芯片基因探针

K562细胞是从一慢性粒细胞急性变患者胸水中培养建株而成。该细胞恶性程度高，增殖快，但在培养过程中能被多种物质诱导向良性方向分化[1][2]，即在细胞中表达有正常红细胞特征的 β -珠蛋白，因此已被广泛应用于研究人的红系细胞分化调控。但细胞分化是一个多基因参与的共同结果，为能在基因水平上对K562细胞的分化进行综合研究，我们应用限制性显示PCR技术(RD-PCR技术)[3][4]制备K562细胞表达谱芯片所需的基因片段，并利用本实验室的芯片打印仪自行制作K562细胞表达谱芯片，以期在以后的研究中高通量地发现分化相关基因，探索肿瘤细胞逆分化的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

RPMI-1640培养基购自GIBCO/BRL，全RNA纯化试剂(Trizol)购自上海生工公司，mRNA纯化试剂盒、cDNA合成试剂盒购自Pharmacia，限制性内切酶Sau3AI、DNA连接试剂盒、Taq DNA聚合酶、dNTP延伸混合物及相关试剂、pMD18-T Vector、JM109感受态细菌均购自大连宝生物公司，QIAquick PCR纯化试剂盒购自德国QiaGen。

1.2 方 法

1.2.1 细胞系及培养条件 K562细胞株(ATCC)接种于含10%小牛血清、100 U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素的RPMI-1640培养液中，以 2×10^5 /ml的浓度接种培养。每2天换培养液1次，每4天进行传代。细胞在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵育箱中孵育。从细胞增殖到对数期时段收集细胞。

1.2.2 总RNA的抽提 参照Trizol Reagent试剂说明书，提取K562细胞的总RNA。用焦碳酸二乙酯(DEPC)处理过的水溶解，以美国Beckman公司DU530紫外分光光度计进行定量测定。

1.2.3 cDNA的合成 取上步操作的总RNA约200 μ g，参照mRNA纯化试剂盒与cDNA合成试剂盒的说明，合成cDNA双链。

1.2.4 DNA的酶切 取cDNA 2 μ g加入20 μ l去离子水中，加入2.4 μ l 10 \times Buffer、1.6 μ l Sau3AI，于37 $^{\circ}$ C反应2 h，取1~2 μ l反应液进行琼脂糖电泳，以检测酶解反应。

1.2.5 接头的制作与连接 采用PCR引物设计软件Oligo 5.0设计单链的DNA片段S1P(5' pGATC CAC ACC AGC CAA ACC CA)和S1R(5' GGT TTG GCT GGT GTG)并检测。上述片段通过上海生工合成、纯化及S1P 5'端磷酸化。将等量的S1P(500 μ g/ml)与S1R(600 μ g/ml)溶于TM缓冲液中，加热至90 $^{\circ}$ C，5 min之后，在30 min内使其温度逐渐降低至室温。形成的接头分装后，贮藏于-20 $^{\circ}$ C备用。取cDNA酶切反应液5 μ l和接头5 μ l(接头的物质的量浓度是cDNA浓度50倍以上)，参照TaKaRa DNA连接试剂盒说明，将cDNA片段和接头连接起来。以QIAquick PCR纯化试剂盒除去小于100 bp的片段及接头二聚物后，作为RD-PCR反应的底物。

1.2.6 DNA选择性引物的设计、合成与标记 引物5' GTT TGG CTG GTG TGG ATC N3'与5' GTT TGG CTG GTG TGG ATC NN3'是根据接头及内切酶的序列设计的，在其3'端引入1个N碱基(其中N为A、T、C或G)，以

下简称为引物A、T、C、G。所有引物经计算机设计软件Oligo 5.0设计与检测，由上海生工公司合成。

1.2.7 RD-PCR过程与条件 PCR反应按常规进行，分别用上述引物A、T、C、G两两组合进行限制性分组PCR，可分为10组：AA、AT、AG、AC、TT、TG、TC、GG、GC、CC。这样每个亚组扩增出的DNA片段数目减少为原来一组PCR反应的1/10。PCR条件为：(1) 95 °C变性2 min；(2) 95 °C变性 30 s，65 °C退火 30 s，72 °C延伸 1 min，35个循环；(3) 72 °C 5 min。

1.2.8 基因片段克隆 将上述10组的PCR扩增产物电泳鉴定后，分别用QIAquick PCR纯化试剂盒除去小于100 bp的片段。纯化后产物与pMD18-T Vector连接，转化JM109感受态细菌。快速PCR筛选重组克隆后，培养细菌，提取质粒，并编号索引。

1.2.9 探针制备 以含有目的片段的质粒为模板，以原引物进行PCR，大量扩增基因片段。异丙醇纯化后，用10 μl 水溶解。

1.2.10 基因芯片制作 共制备了200个探针，用PixSys 5500型基因打印仪，以4根针分别取样的方式将探针有序的打印在玻片上。探针中包含了所制备的K562细胞基因片段探针、阳性对照探针[选用3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)，β-globin]、阴性对照探针(选用HIV与HCV的基因片段)和空白对照。每个探针平行地打两个点，最后的结果是形成400个基因点阵的芯片。

2 结果

2.1 K562细胞的总RNA与mRNA

自 2×10^7 个细胞中可以得到200 μg左右的总RNA。取1 μg总RNA加样于1%甲醛变性的琼脂糖凝胶上电泳，余下的总RNA，利用Pharmacia mRNA纯化试剂盒纯化mRNA，得5 μg mRNA。取1 μg mRNA跟总RNA一同电泳，结果见图1。4 μg mRNA利用Pharmacia cDNA合成试剂盒反转录为双链cDNA。

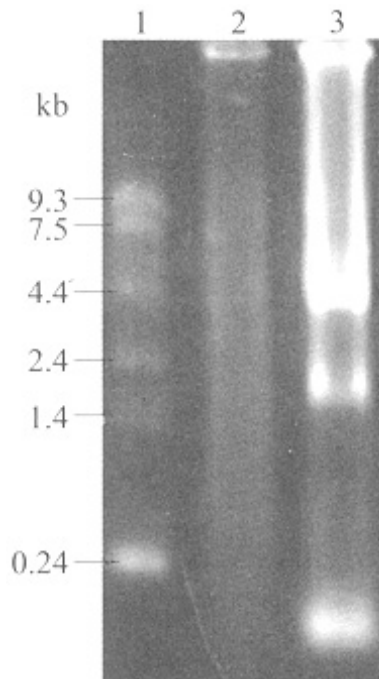


图1 总RNA与mRNA电泳图

Fig.1 Electrophoresis of total RNA and mRNA
Lane1: Marker; Lane2: mRNA; Lane3: Total RNA

2.2 RD-PCR

将合成的cDNA经限制性内切酶Sau3AI消化后，与设计好的接头相连接，形成一个两端带有相同序列的

cDNA片段库。用两两组合的限制性引物分组进行PCR扩增，产物在常规的1.5%琼脂糖凝胶上电泳，可得清晰的RD-PCR图谱(图2)。

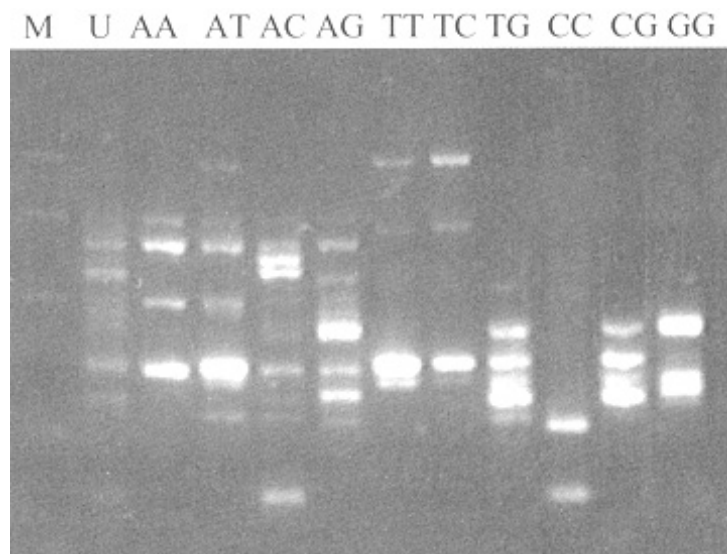


图2 RD-PCR产物电泳图
Fig.2 Electrophoresis of RD-PCR product

2.3 PCR产物

图3为鉴定后扩增的部分PCR产物按分子量大小排列的电泳图。异丙醇纯化后，用10 μl 水溶解。溶解后的基因片段浓度应不小于1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 。

2.4 表达谱芯片的制备

制备的K562细胞表达谱基因芯片上共有200个探针，包含K562细胞探针、阴性对照探针、阳性对照探针及空白对照探针，每个探针平行地打印两个点，最后的结果是制备了共有400个探针点阵的表达谱基因芯片(图4)。

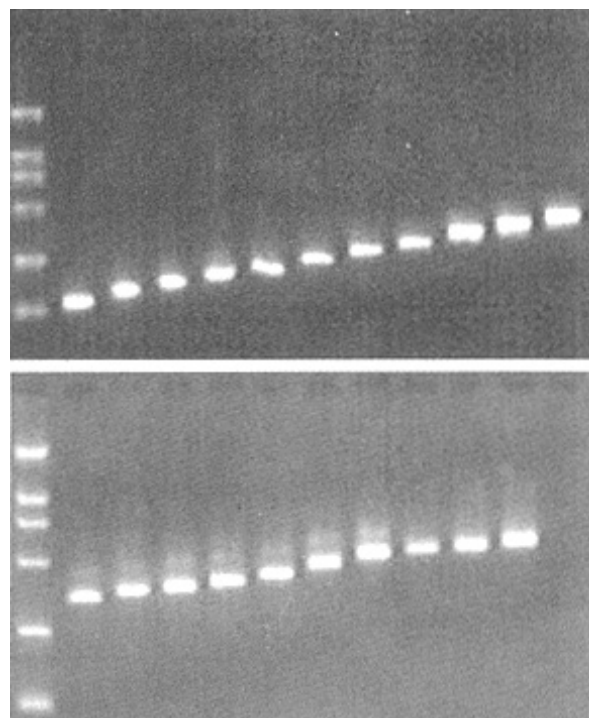


图3 鉴定后的PCR产物
Fig.3 PCR products after identification

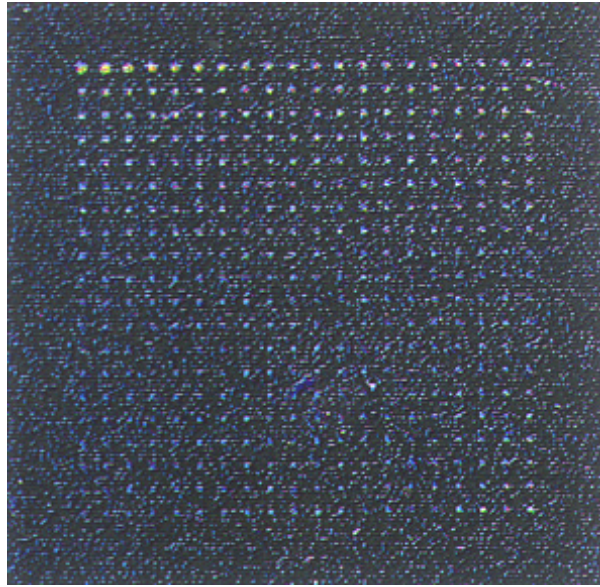


图 4 K562细胞基因芯片
Fig.4 Gene chip of K562 cell

3 讨论

基因芯片的制作根据其制作材料主要可以分为两大类：第一类为固定在载体上的较短的寡核苷酸片段，长度一般不超过50个碱基；第二类是将较长的DNA或cDNA片段固定在载体上，长度一般为数百个碱基[5]。第一类芯片的制作主要是用原位合成的方法，这种方法可以合成的碱基长度为30 bp左右，每一次缩合的效率为95%，最终的产率只有20%。原位合成还有另一种方式，称为原位喷印合成，是根据所需探针序列的要求，由喷头将不同的碱基喷印在载体的既定位置，从而合成特定的寡核苷酸。此方法合成30 bp的产率可高达74%，比光刻法效率要高得多。第二类芯片的制作是直接点样，多用于片段较长的DNA或cDNA片段。该方法需要事先制备好基因片段以及一套特殊的芯片打印装置，通过机器臂的来回移动，将基因片段直接打印到载体上。我室制作的芯片采用第二种方法，因此需要事先制备大量的基因片段。人类虽然有多至4万个以上的基因，但已明确序列、功能的基因少之又少。因此收集大量的基因探针就成为制作基因芯片的先决条件。通过商业途径购买基因成本太大，而且都是已知的基因，常常缺乏再研究的意义。

我室应用的RD-PCR技术是马文丽教授等设计的，这种方法收集的基因都是不完整的基因片段，长度主要集中在300~500 bp，都编码有效的基因信息。在cDNA酶切之后加接头再扩增，可以在扩增的片段中去除mRNA 5'和3'端所转录的无意义区，而这些无意义区的序列，在基因之间的同源性较高，若保留在片段中作为探针的一部分，会加深背景，影响特异性。但是这种方法是在假设反转录后的cDNA中至少含有两个或以上的Sau3AI酶切位点而设计的。若该cDNA只有一个酶切位点，那么该基因就只能加上一个接头，在接下来的PCR中便不被扩增从而丢失基因信息。考虑到Sau3AI识别4个碱基，常规的每 $4^4=256$ 个碱基序列中就应该存在有一个这样的酶切位点，而一般的cDNA都有数百至数千个碱基，所以丢失信息的可能性虽然存在，但几率很小。RD-PCR的另一个特点是在引物的3'端锚定一个碱基，这样就可以使扩增产物有序归类。相类似的，采用延伸两个碱基的限制性引物，可以产生136个PCR反应亚组。实际应用中，对于延伸任何数目(n)的碱基，其产生的PCR组数(N)可以按以下的公式来计算： $N=4^n(4^n+1)/2$ 。按照这一过程设计限制性PCR引物进行相应的PCR扩增，可以限制每一亚组中片段的数目，以达到在凝胶电泳中清晰显示的目的。

如何从RD-PCR产物中分离出单独的基因片段是芯片制作的前提，也是问题的关键所在。最直接的方法就是将产物在测序用聚丙烯酰胺凝胶上电泳，经染色后切割回收[6]。此法对于染色的要求较高，且在手工切割时，易造成相邻带间的相互污染。我室采用的是转化克隆法，优点是每一个克隆包含的都是纯单基因片断，缺

点是克隆间重复性较高。最佳方法是通过毛细管电泳仪进行分离并收集[7]，理论上可以达到相差一个碱基的片段间的分离。

促进肿瘤细胞向良性方向分化是治疗癌症的一大策略，K562细胞不仅在体外培养可以被一系列诱导分化剂(如六亚甲基双乙酰胺[8]、全反式维甲酸等)诱导分化，还能被一些哺乳类动物细胞的胞质因子[9]所影响，出现血红蛋白的表达。马文丽与薛社普[10]曾将K562细胞与兔网织红细胞相融合，发现融合后形成的K-RRneo细胞也可以进入红系分化状态。K562细胞的这种可以被多种物质诱导分化的特点，使之成为研究红系肿瘤细胞恶性表达调控的极好模型。本实验就是以K562细胞为研究对象，通过RD-PCR方法，获取K562细胞的cDNA基因片段，制作K562细胞的基因表达谱芯片，以求在今后的工作中应用该芯片对K562细胞分化的分子机制和恶性表达调控作进一步研究。

参考文献:

[1]Cortesi R, Gui V, Osti F, et al. Human leukemic K562 cells treated with cytosine arabinoside: enhancement of erythroid differentiation by retinoic acid and retinal[J]. Eur J Haematol, 1998, 61(5): 295-301.

[2]Nakajima O, Iwasaki S, Hashimoto Y. Hemin-induced erythroid differentiation of human myeloleukemia K562 cell line and its modification by bioresponse modifiers[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1997, 43(1): 115-34.

[3]郑文岭, 马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达显示[A]. 见: 叶鑫生, 沈倍奋. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.

[4]马文丽, 郑文岭, James FB. 限制性显示(RD-PCR):一种新的差异显示技术[A]. 见: 孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 99-113.

[5]Schena M, Shalon D, Davis R, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 467-70.

[6]Wilton S, Lim L, Dye D, et al. Bandstab: a PCR-based alternative to cloning PCR products[J]. Biotechniques, 1997, 22(4): 642-5.

[7]Baba Y, Tshukako M, Sawa T, et al. Effect of urea concentration on the base-specific separation of oligodeoxynucleotides in capillary affinity gel electrophoresis[J]. J Chromatogr B, 1993, 652(1): 93-9.

[8]黄河, 张世馥, 刘群, 等. 六亚甲基双乙酰胺及其衍生物对人红白血病K562细胞的诱导分化作用[J]. 解剖学报, 1999, 30(3): 276-9.

Huang H, Zhang SF, Liu Q, et al. Effect of HMBA and its derivatives on the differentiation of human leukemia K562 cells [J]. Acta Anat Sinica, 1999, 30(3): 276-9.

[9]薛社普. 哺乳类红细胞分化调节因子对骨髓瘤细胞恶性调控的研究[J]. 解剖学报, 1991, 22(3): 225-34.

[10]马文丽, 薛社普. K-Rrneo细胞生长与分化特性的检测[J]. 科学通报, 1994, 39(8): 757-61.

参考文献:

[1]Cortesi R, Gui V, Osti F, et al. Human leukemic K562 cells treated with cytosine arabinoside: enhancement of erythroid differentiation by retinoic acid and retinal[J]. Eur J Haematol, 1998, 61(5): 295-301.

[2]Nakajima O, Iwasaki S, Hashimoto Y. Hemin-induced erythroid differentiation of human myeloleukemia K562 cell line and its modification by bioresponse modifiers[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1997, 43(1): 115-34.

[3]郑文岭, 马文丽, Cater VW. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达显示[A]. 见: 叶鑫生, 沈倍奋. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.

- [4] 马文丽, 郑文岭, James FB. 限制性显示(RD-PCR):一种新的差异显示技术[A]. 见:孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 99-113.
- [5] Schena M, Shalon D, Davis R, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235): 467-70.
- [6] Wilton S, Lim L, Dye D, et al. Bandstab: a PCR-based alternative to cloning PCR products[J]. Biotechniques, 1997, 22(4): 642-5.
- [7] Baba Y, Tshako M, Sawa T, et al. Effect of urea concentration on the base-specific separation of oligodeoxynucleotides in capillary affinity gel electrophoresis[J]. J Chromatogr B, 1993, 652(1): 93-9.
- [8] 黄河, 张世馥, 刘群, 等. 六亚甲基双乙酰胺及其衍生物对人红白血病K562细胞的诱导分化作用[J]. 解剖学报, 1999, 30(3): 276-9.
- Huang H, Zhang SF, Liu Q, et al. Effect of HMBA and its derivatives on the differentiation of human leukemia K562 cells [J]. Acta Anat Sinica, 1999, 30(3): 276-9.
- [9] 薛社普. 哺乳类红细胞分化调节因子对骨髓瘤细胞恶性调控的研究[J]. 解剖学报, 1991, 22(3): 225-34.
- [10] 马文丽, 薛社普. K-Rrneo细胞生长与分化特性的检测[J]. 科学通报, 1994, 39(8): 757-61.

[回结果列表](#)