

mRNA差异显示法筛选大肠癌相关基因

大肠癌是一种发病率较高的消化道肿瘤，且容易转移和复发。许多研究表明，大肠癌的发生涉及一系列基因（包括显性癌基因、错配修复基因及众多的肿瘤抑制基因）的变化，但目前人们对大肠癌发生的分子机制仍不十分清楚。mRNA差异显示法[1] (Differential display polymerase chain reaction, DD-PCR) 是近年来检测细胞基因表达变化的新方法，因其具有操作简单、适用范围广、敏感性高、原料要求量少以及可以同时比较多个样品等优点，目前在基因研究领域已被广泛采用。

本研究采用DD-PCR筛选和克隆大肠癌相关基因，旨在从基因的分子水平探讨癌变机制。

1 材料和方法

1.1 材料

大肠癌标本取自大肠癌根治术中切除的肿瘤组织；正常大肠粘膜对照取自同一患者距肿瘤8~10 cm处的正常肠段。RNA提取试剂、Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶购自Boehringer Mannheim公司；DD-PCR引物由上海生物工程有限公司合成。锚定引物：T11MN (M=A, T, G, C; N=A, C, G)；随机引物：AP₁~AP₆、DH5 α 大肠杆菌及TA载体由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 总RNA的提取 从上述标本中各取50~100 mg新鲜组织置于玻璃匀浆器中，加1 ml RNA提取试剂，制备成匀浆，转入1.5 ml EP管中，加入200 μ l氯仿，以4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心15 min。取上清液，加等体积异丙醇，室温孵育10 min，以4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心10 min，沉淀RNA，用75%的乙醇清洗RNA沉淀后，将其溶解于经DEPC处理的50 μ l去离子水中，加10单位的RNasin，取5 μ l RNA样品进行琼脂糖凝胶电泳。其余样品-80 $^{\circ}$ C保存。

1.2.2 逆转录反应 取2 μ g总RNA样品，加入5单位无RNA酶活性的DNase I消化样品中残存的DNA至总体积为10 μ l，于37 $^{\circ}$ C孵育20 min，65 $^{\circ}$ C 5 min灭活DNase I活性。加5单位RNasin、4 μ l 15 \times Buffer、1 μ l 10 mmol/L dNTPs、1 μ l锚定引物及5单位MMLV-RT逆转录酶，加水至20 μ l，37 $^{\circ}$ C反应60 min，65 $^{\circ}$ C，5 min，灭活逆转录酶活性，样品-20 $^{\circ}$ C存放。

1.2.3 PCR扩增及分离差异条带 用锚定引物与随机引物作不同组合进行数十个PCR反应，PCR反应所用的锚定引物与逆转录的锚定引物相同。每一反应管中依次加入下列样品：逆转录产物2 μ l，10 \times PCR Buffer 2.5 μ l，25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ l，随机引物及锚定引物各1 μ l，10 mmol/L dNTPs 1 μ l，Taq DNA聚合酶1 μ l，加水至25 μ l，滴加1滴石蜡油，按下列条件进行PCR扩增：94 $^{\circ}$ C 2 min；94 $^{\circ}$ C 45 s，40 $^{\circ}$ C 50 s，72 $^{\circ}$ C 1 min，40个循环；72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR结束后，用琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果，若结果符合实验要求（即提取的RNA完整、未降解），在上述PCR反应体系加入[α -³²P]dATP后，同样的条件下进行PCR反应，通过6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，-60 $^{\circ}$ C于X线胶片上放射性自显影，分离差异条带。

1.2.4 差异条带的第二次PCR扩增 切取差异条带，加入100 μ l去离子水，100 $^{\circ}$ C水浴10 min，取2 μ l作为模板，用同样的引物在相同的条件下进行PCR扩增，低熔点琼脂糖凝胶电泳，回收目的条带。

1.2.5 目的条带的克隆

1.2.5.1 制备感受态细菌 用划线法将DH-5 α 菌种接种于不含抗生素的LB培养板中，37 $^{\circ}$ C孵育20 h，挑单菌

落到3 ml不含抗生素的LB培养液中，37 °C 孵育12 h。取1 ml菌液接种于100 ml LB培养液中，37 °C 振荡4 h (D_{600} 约为 0.4)，冰浴10 min，4 °C 4 000 r/min离心10 min，弃上清。菌体悬浮于10 ml 0.1 mol/L冰预冷的CaCl₂溶液中，冰浴30 min，4 °C 4 000 r/min离心10 min，弃上清。再用2 ml冰预冷的0.1 mol/L CaCl₂液重悬细菌，置于4 °C 15 h后，可应用于转化。

1.2.5.2 连接 TA载体及目的条带 将TA载体及目的条带按1: 3的比例加至连接反应体系中，再加入10×缓冲液1 μl和T4 DNA连接酶1 μl (3单位)进行粘端连接，16 °C连接15 h。

1.2.5.3 转化 取100 μl感受态细菌与4 μl连接反应产物混匀，冰浴30 min，42 °C热休克90 s后，迅速冰浴2 min，再加入800 μl LB液混匀，于37 °C 170 r/min振摇45 min以复苏细菌。

1.2.5.4 DNA重组质粒的筛选及鉴定 含氨苄青霉素抗性的LB培养板表面均匀涂布40 μl (20 g/L) X-gal和4 μl (200 g/L) 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷溶液，室温干燥。将复苏后的菌液100 μl涂布到平板上，菌液吸收后，于37 °C培养16 h。于4 °C放置平板数小时，充分显色。带有β-半乳糖苷酶活性的菌落中间为淡蓝色，外周为深蓝色。插入片段破坏了质粒LacZ基因，菌株不能产生β-半乳糖苷酶，菌落为白斑。挑选白斑，接种于5 ml含氨苄青霉素的LB液体培养基中，37 °C振荡培养15 h。取3 ml细菌培养液，小量提取质粒，用TA载体上含有的酶切位点，选用合适的限制性内切酶切割质粒，1%琼脂糖凝胶电泳显示结果。

1.2.5.5 阳性重组质粒的测序及序列分析 阳性重组质粒经过纯化后经大连宝生生物有限公司测序，将序列分析所获得的数据与Genebank数据库资料进行比较(BCBI同源性比较的网址: gov WWW.ncbi.nlm.nih.gov)。

1.2.5.6 差异序列的斑点杂交 将上述差异片段制备成地高辛标记的探针，与大肠癌及癌旁正常大肠粘膜组织所提取的RNA样品进行杂交。

2 结果

2.1 总RNA样品的制备

用硫氰酸胍一步法提取的RNA经甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳图谱显示，所提取的RNA完整、未降解，符合实验要求，28 S/18S的比值约为2.0，同时用紫外分光光度法对RNA的纯度及浓度进行了测定，其 D_{260}/D_{280} 的值接近2.0。

2.2 mRNA差异条带的显示

以随机引物AP₁~AP₆与锚定引物HT11C/A/G配合，扩增cDNA。6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳，-60 °C于X线胶片上放射性自显影，可见数条差异条带(图1)。

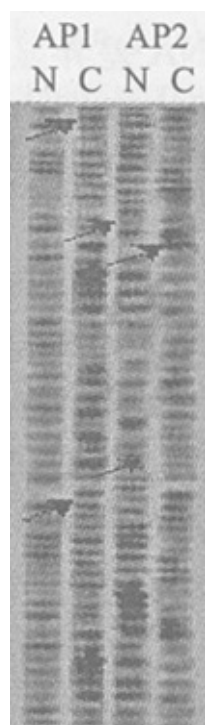


图1 PCR扩增产物电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of PCR amplification products
 AP1, AP2: Different arbitrary primers; N: Normal colorectal mucosa; C: Colorectal carcinoma;
 The arrowheads indicate the differentially expressed band

2.3 差异条带的第二次PCR扩增

取2条从图1中分离出来的差异条带作为模板(引物均为AP₂, 且为大肠癌所特有的差异条带)再次进行PCR扩增, 2%琼脂糖凝胶电泳, 证实为一单一条带(图2)。

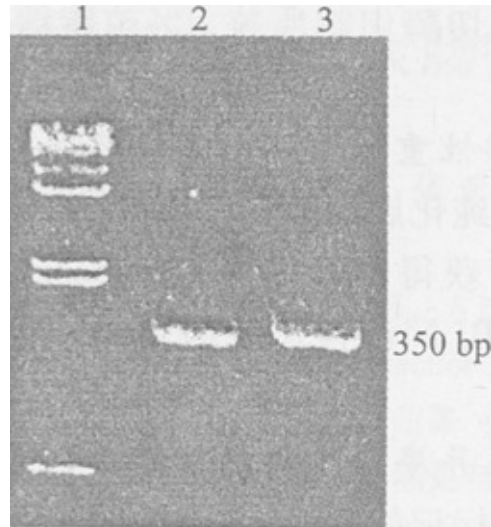


图2 PCR再次扩增产物电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of the second PCR amplification products
 Lane 1:PCR marker; Lane2: N321; Lane 3: N322

2.4 DNA重组质粒的构建及鉴定

按方法1.2.4把第二次PCR扩增产物回收, 同时把产物连接入TA载体内, 质粒转化DH-5 α 细菌, 通过蓝白斑初步筛选, 挑选白色菌落, 克隆后小量提取质粒, 通过限制性内切酶酶切质粒, 电泳分析, 鉴定了重组质粒中含有插入的目的片段。

2.5 差异显示条带的序列分析及比较

对上述2个差异显示片段进行了测序, 并通过BLAST 数据库进行了序列的同源性比较。比较结果显示这2个片段均为新基因片段, 分别命名为N321与N322, 在数据库中查询未见同源序列。2个差异显示片段的数据库查询部分结果如下, N321与HUAC002038序列相比: Score=291, E value=5e-77; N322与HSAF002995序列相比: Score=72, E value=9e-11。

N321和N322的cDNA片段序列如下。

N321: AAGGTACCTTTGCTCAGGGTCTCAGGAATGTTGCCTTCTCACACTTCATGCACATGTTTATTTTTGTGCACCTAT
 GTTTTGTAAAGATTAACAGCTAGTTTAAACAGAAACAATGGAAGCCAAGAGGTAGGAGGATAATATATTCAAAAATGCAAA
 GGAAAAAAACTGTCAGCCACCAATTCCTTATCCAGCAATTAGTTTTCAAAAATGAAGATAACACAAAGACTGACCCAGA
 GAAACAGAAATATTAGCTGAAGTTGTTGCTGGCAGACCTACCAAACAAAAAAGGTACCTT

N322: AAGGTACCTTTGCTCAGAGGGCTAAATCTTTGGCCAGGCTAGTCCAGAACTAGGCTGAGAGACCTGCAGAGAG
 CATGTGGGCTATTCTCCAGGGTGGGCCTACAGAGCCTAATGTGAGTACATTTCTCAAGAGAGCAAGCCACAGATGGCAC
 TTTATAGTGTGAATGCCACCTGTCCATGCTGACTGTTAGGCAAGGGTCTATCCTTCTGCAGAGTTAAATAAGATCACAAG
 ATTTGTTAGGTGAATAAAGAACTCCAGACACAAGATTAGTCCTCATCCTTAGGGCTGTTTCTTGAAAGTTGCAGAATCA
 AAATGGAGTCACTAATCCAAAAAAGGTACCTT

2.6 差异序列的斑点杂交

将上述差异片段制备成地高辛标记的探针，与大肠癌及癌旁正常大肠粘膜组织所提取的RNA样品进行杂交，结果显示这2条大肠癌cDNA差异显示片段在大肠癌组织所提取的RNA中表达丰度均较高，而在正常肠粘膜组织所提取的RNA中的表达丰度较低。

3 讨论

分离新基因的方法较多，mRNA差异显示方法被广泛采用并藉此发现了大量新基因[2][3][4]，但mRNA差异显示方法有假阳性率较高的缺点[5]。为克服这些缺点，研究人员往往采用无DNA污染的RNA样本和多次重复电泳的方法[6]。本研究在逆转录前用DNA酶I对样本进行消化，对逆转录结果进行两次以上的PCR及电泳，严格回收在每次电泳中所显示的不同差异条带，再将回收的重扩增产物与首次PCR产物同时电泳并进行比较，以进一步证实扩增的特异性。

我们利用mRNA差异显示方法筛选出数条大肠癌差异表达产物的cDNA片段，并对其中的2条大肠癌差异cDNA片段进行了克隆、测序及序列分析，结果发现这2条大肠癌cDNA差异显示片段在Genebank中无同源序列。且它们在大肠癌组织所提取的RNA中表达丰度较高，而在正常肠粘膜组织所提取的RNA中表达的丰度较低。故初步推测该序列可能为大肠癌相关的基因。我们下一步的主要工作是进行Northern杂交分析，预测全长的mRNA的长度；组织切片的原位杂交，分析其在大肠癌组织中的表达情况；通过RACE扩增的方法，获得全长的cDNA；通过氨基酸序列推导预测它们的功能，并进行一系列的功能分析。

本研究表明，mRNA差异显示技术可简捷、快速地筛选出正常大肠粘膜与大肠癌之间的差异表达基因，是研究大肠癌分子生物学基础的较好方法。

(责任编辑：段咏慧)

参考文献：

- [1] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. *Science*, 1992, 257: 967-71.
- [2] Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, et al. TM7XN1, a novel human EGF-TM7-like cDNA, detected with mRNA differential display using human melanoma cell lines with different metastatic potential[J]. *FEBS Lett*, 1999, 446(2-3): 292-8.
- [3] Schroeder AA, Lawrence CE, Abrahamsen MS. Differential mRNA display cloning and characterization of a cryptosporidium parvum gene expressed during intracellular development [J]. *J Parasitol*, 1999, 85(2): 213-20.
- [4] Livesey FJ, Hunt SP. Differential display cloning of genes induced in regenerating neurons[J]. *Methods*, 1998, 16(4): 386-95.
- [5] Sompanyrac L, Jane S, Burn TC, et al. Overcoming limitations of the mRNAs differential display technique[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 33: 4738-9.
- [6] Wang X, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. mRNA differential display: application in the discovery of novel pharmacological targets[J]. *Tips*, 1996, 17(276): 6276-9.

参考文献：

- [1] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction[J]. *Science*, 1992, 257: 967-71.
- [2] Zendman AJ, Cornelissen IM, Weidle UH, et al. TM7XN1, a novel human EGF-TM7-like cDNA, detected with mRNA differential display using human melanoma cell lines with different metastatic potential[J]. *FEBS Lett*, 1999, 446(2-3): 292-8.
- [3] Schroeder AA, Lawrence CE, Abrahamsen MS. Differential mRNA display cloning and

characterization of a cryptosporidium parvum gene expressed during intracellular development [J]. J Parasitol, 1999, 85(2): 213-20.

[4] Livesey FJ, Hunt SP. Differential display cloning of genes induced in regenerating neurons[J]. Methods, 1998, 16(4): 386-95.

[5] Sompariyac L, Jane S, Burn TC, et al. Overcoming limitations of the mRNAs differential display technique[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 33: 4738-9.

[6] Wang X, Ruffolo RR Jr, Feuerstein GZ. mRNA differential display: application in the discovery of novel pharmacological targets[J]. Tips, 1996, 17(276): 6276-9.

[回结果列表](#)