

DNA芯片技术筛选 K562 肿瘤细胞特异性基因

彭桂福¹, 马文丽¹, 宋艳斌¹, 彭翼飞¹, 石 嵘¹, 毛向明¹, 郑文岭²(¹ 第一军医大学分子生物研究所, 广东 广州 510515; ² 广州军区广州总医院分子肿瘤研究所, 广东 广州 510010)

摘要:目的 应用 DNA 芯片技术筛选人白血病 K562 细胞中的肿瘤特异性基因。方法 提取正常人白细胞和 K562 细胞基因组 DNA, 并用限制性内切酶 *Sau3AI* 酶切。其中 K562 细胞基因组酶切产物经 DNA 聚合酶 I 补平加 A 后克隆到 T- 载体, 挑选阳性克隆, 用 PCR 扩增, 以纯化的 PCR 产物做探针, 制备 K562 细胞基因组 DNA 芯片。正常人白细胞基因组酶切产物加上人工通用接头, 用限制性标记技术标记上荧光标记物 Cy3, 与制备的 K562 细胞基因组 DNA 芯片杂交。结果 芯片杂交结果经扫描分析, 发现 42 个 K562 细胞肿瘤特异性基因, 进一步用序列分析证实, 其中有 1 个为 BCR(breakpoint cluster gene)基因。结论 我们自制的 K562 细胞基因组 DNA 芯片可以成功地用于筛选肿瘤特异性基因, 为更好地从基因组水平研究肿瘤发生的分子机制提供了新的技术途径。

关键词: 基因芯片; 白细胞, 正常人; K562 细胞; 差异基因

中图分类号: R378.61 文献标识码: A 文章编号: 1000-2588(2004)05-0525-04

Application of microarrays in screening the tumor-specific genes in the genome of K562 cells

PENG Gui-fu¹, MA Wen-li¹, SONG Yan-bing¹, PENG Yi-fei¹, SHI Rong¹, MAO Xiang-ming¹, ZHENG Wen-ling²

¹Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Institute of Molecular Oncology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China

Abstract: Objective To screen tumor-specific genes of K562 cells using DNA microarray technique. **Methods** The genomic DNA of normal white blood cells and cultured K562 cells were respectively purified and digested with *Sau3AI*, and the digested DNA fragments of K562 cells were cloned into TA cloning vector to construct the corresponding genomic DNA library. The insert genomic DNA fragments were amplified from the library to prepare the microarray using Cartesian 5500 Microarrayer. The digested genomic DNA fragments of normal white blood cells were labeled with fluorescent Cy3 by restriction display PCR (RD-PCR), followed by hybridization with the microarray, after which the slide was washed and scanned with ScanArray. **Results** Among the 426 target genes, 42 differential genes were identified in the genomic DNA of K562 cells in comparison with the normal white blood cells. One of the genes was identified as the breakpoint cluster gene (BCR) after sequence analysis. **Conclusions** The DNA microarrays we constructed may effectively identify the tumor-specific genes in K562 cells, and DNA microarray technique can be helpful in elucidating the molecular mechanisms of tumorigenesis at the genomic level.

Key words: DNA microarray; white blood cells, normal person; K562 cells; differential gene

恶性肿瘤是严重威胁人类健康的一种常见病, 肿瘤的发生是多基因参与的一个多阶段、多步骤的生物学过程。从基因组水平上, 了解肿瘤细胞与正常细胞基因的差异, 可加深对肿瘤发生、发展的分子机制的认识, 并为选择肿瘤治疗的靶基因提供线索。为此, 我们构建了包含 426 个基因片段的 K562 细胞基因组 DNA 芯片, 与 Cy3 标记的正常人白细胞基因组酶切

片段杂交, 以发现 K562 肿瘤细胞的特异性基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品来源 K562 细胞株由本实验室保存, 正常人白细胞分离自南方医院正常体检者的 EDTA 抗凝全血。

1.1.2 主要试剂设备 细胞培养基 1640、胎牛血清购自 Gibco-BRL 公司; 淋巴细胞分离液购自威佳生物技术公司; DNA 抽提试剂盒购自 Omega 公司; *Taq* 酶、dNTP、*Sau3AI*、DNA 连接酶、T- 载体购自 Takara 公司; 接头 SIP: 5'pGATCmCACACCAGCCAAACCA; SIR: GGTTTGGCTGGTGTG。接头通用引物(U) GTTTGGCTGGTGTGGATC 等 PCR 引物均由上海博亚公司合成。PCR 产物纯化试剂盒购自上海博彩

收稿日期: 2003-12-24

基金项目: 国家自然科学基金(39880032)

Supported by National Natural Science Foundation of China (39880032)

作者简介: 彭桂福 (1970-), 男, 第一军医大学在读硕士研究生, 研究方向: DNA 芯片技术及应用研究, 电话: 020-61640114-89098

通讯作者: 马文丽, 电话: 020-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

Corresponding author: MA Wen-li, Tel: 020-61648210, E-mail: wenli@fimmu.com

公司;荧光标记物 Cy3 购自发玛西亚公司;氨基化玻片购自 Corning 公司;Cartesian5500 芯片打印仪和扫描分析仪 Scanarray Lite 分别购自美国 Cartesian、GSI Lunibucus 公司;3700DNA 测序仪购自 ABI 公司。

1.2 方法

1.2.1 K562 细胞和正常人白细胞基因组 DNA 的提取 参照 Omega DNA 抽提试剂盒说明书进行。

1.2.2 K562 细胞基因组芯片探针的收集和制备 K562 细胞基因组 DNA 经 *Sau3AI* 限制性内切酶酶切完全后,用 *Taq* 酶补平切口,连接至 T- 载体,转化 JM109 大肠杆菌,筛选阳性克隆,阳性克隆保种并贴上条形码保存。PCR 扩增阳性克隆的基因片段,制备探针,共收集了 426 个 K562 细胞基因组随机探针片段,大小 250~800 bp。纯化的探针以 DMSO 和水调整浓度至 500 ng/ μ l,以看家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因片段为阳性对照,水稻基因组克隆基因片段为阴性对照,50%DMSO 为空白对照,用 Cartesian 5500 芯片打印仪打印在 Corning 公司氨基化玻片上,每个探针重复打印 3 点形成 39 \times 36 的点阵,打印后的玻片经紫外交联,80 $^{\circ}$ C 干烤 2 h,放置暗盒保存备用。

1.2.3 正常人白细胞基因组 DNA 杂交样品的制备 正常人白细胞基因组 DNA 经 *Sau3AI* 酶切后接上人工接头,用 Cy3 标记的接头通用引物(U)扩增 20 个循环^[1],PCR 产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化,测定其 D(λ)值及浓度,作为标记样品与 K562 细胞基因组芯片杂交。

1.2.4 预杂交 将预杂交液(25%甲酰胺、5 \times SSC、0.1% SDS)放入杂交缸中,液面高度与杂交芯片同高,并水浴预热至 42 $^{\circ}$ C。小心从杂交盒中取出芯片,放入预热的预杂交液中,42 $^{\circ}$ C 温育 1 h。预杂交后在灭菌水中洗涤 5 次,每次 1 min。水洗完毕后浸入异丙醇中洗涤 1 min,空气干燥。

1.2.5 杂交 标记好的样品 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后,加至预杂交过的芯片阵列上,轻轻盖上盖玻片,放入杂交盒内,42 $^{\circ}$ C 杂交 18 h。

1.2.6 杂交后的洗脱 先用 42 $^{\circ}$ C 预热的洗脱液 I (2 \times SSC,0.2% SDS)洗涤 10 min,转移至洗脱液 II (0.1 \times SSC,0.2% SDS),室温下轻轻振荡洗涤 4 min。再在洗脱液 III (0.1 \times SSC)中洗脱 1 min,重复 4 次。无水乙醇脱水,空气干燥。

1.2.7 芯片杂交的检测与分析 用 ScanArray 芯片扫描仪扫描芯片,运用 Quantarray 软件分析 Cy3 荧光信号的强度和比值。用如下两个条件作为判定阴阳性的标准^[2]:(1) Cy3 阳性点的荧光信号平均值超过阴性点信号的 3 倍;(2)阴性荧光信号值 <800,阳性荧光信号减去阴性信号值 >400。

1.2.8 差异基因片段的序列分析 根据对应的条形码,从保种的阳性克隆中挑选出差异基因的克隆,接种 5 ml 含 AMP 的培养基,培养过夜。抽提质粒,质粒用 ABI 公司的 3700 测序仪测序。

1.2.9 序列的生物信息学分析 将所测得的基因序列递交至 NCBI 网站(www.ncbi.nih.gov),进行人基因组和全核酸序列的 BLAST 分析。

2 结果

2.1 K562 细胞和正常人白细胞基因组 DNA 的电泳图

从电泳图中可以看到抽提的基因组 DNA 大小均在 20 kb 以上,无 RNA 污染,结果表明抽提的基因组 DNA 质量很好(图 1)。

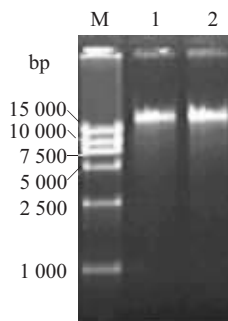


图 1 K562 细胞和正常人白细胞基因组 DNA 的电泳图

Fig.1 0.6% gel electrophoresis of the genomic DNA extracted from K562 cells and normal white blood cells

M: DL1500 marker; Lane 1: Genomic DNA of K562 cells; Lane 2: Genomic DNA of normal white blood cells

2.2 K562 细胞基因组 DNA 探针的制备

抽提的 K562 细胞基因组 DNA 经 *Sau3AI* 限制性内切酶酶切完全后,加入 dNTP 和 *Taq* 酶,72 $^{\circ}$ C 温育 15 min,补平酶切缺口,然后连接至 T- 载体,转化 JM109 大肠杆菌,筛选阳性克隆,阳性克隆进行 PCR 扩增制备探针,部分结果见图 2。由图可见探针片段比较均一,大部分在 250~750 bp 之间。



图 2 PCR 扩增制备的 K562 细胞基因组探针片段
Fig.2 Fragments of the probe for K562 cell genomic DNA amplified by PCR

M: DNA marker DL2000; 183-205: The number of the probe

2.3 基因芯片杂交结果及分析

正常人白细胞 DNA 酶切片段用限制性标记技术进行 Cy3 荧光素标记,与 K562 细胞基因组芯片杂交,经扫描仪扫描,结果见图 3A。图 3B 为芯片探针打印示意图。杂交结果经 Quantarray 软件分析和统计学处理,共得到 42 个差异基因克隆。

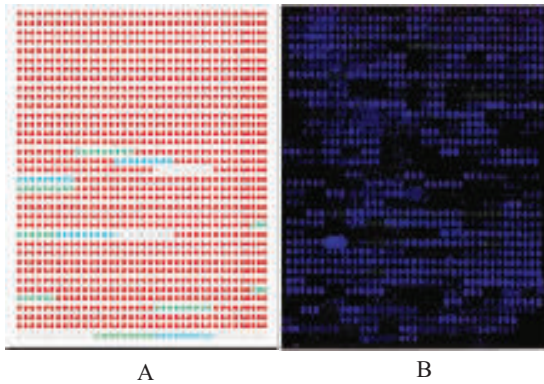


图 3 K562 细胞基因组 DNA 探针芯片打印示意图及芯片杂交结果扫描图

Fig.3 Sketch of K562 cell genomic DNA microarray and result of microarray hybridization

A: The sketch of k562 genomic DNA microarray; B: Result of microarray hybridization

● Probes of k562 cells genomic DNA; ● Positive control; ● Negative control; ○ Blank control

2.4 部分差异基因克隆的序列分析

从筛选出来的 42 个差异基因克隆中,随机挑选多个克隆进行序列分析和生物信息学比较分析。发现其中 17 号差异基因与 GenBank 的 HSU07000 基因高度同源, 同源性 92%, 此序列编码 human break-point cluster (BCR)基因,序列见图 4A。22 号差异基因位于人 13 号染色体上,此处编码 1 个新的离子通道蛋白,该序列与 AL138707.10 序列 96%同源,序列见图 4B。

3 讨论

K562 细胞是由 Lazzio 培养建株的人红白血病细胞系,来自于慢性粒细胞性的白血病患者急性变时胸水中。该细胞系可以向红系、单核系或者巨核系分化,具有增殖快、易于培养等优点,被广泛用于细胞分化、凋亡调控、抗肿瘤药物筛选等研究^[3-5]。基因芯片技术是 90 年代中期快速发展起来的分子生物学高新技术。其原理是采用光电原位合成或显微打印的方法,将成千上万的 DNA 探针片断有序地固化于支持物表面,然后与标记的 DNA 生物样品杂交,通过对杂交信号的检测分析,达到大规模分析生物样品遗传信息的目的,因而它具有高通量、特异性好、快速等特点^[6-8]。因此本研究选择 K562 细胞为材料,运用 DNA

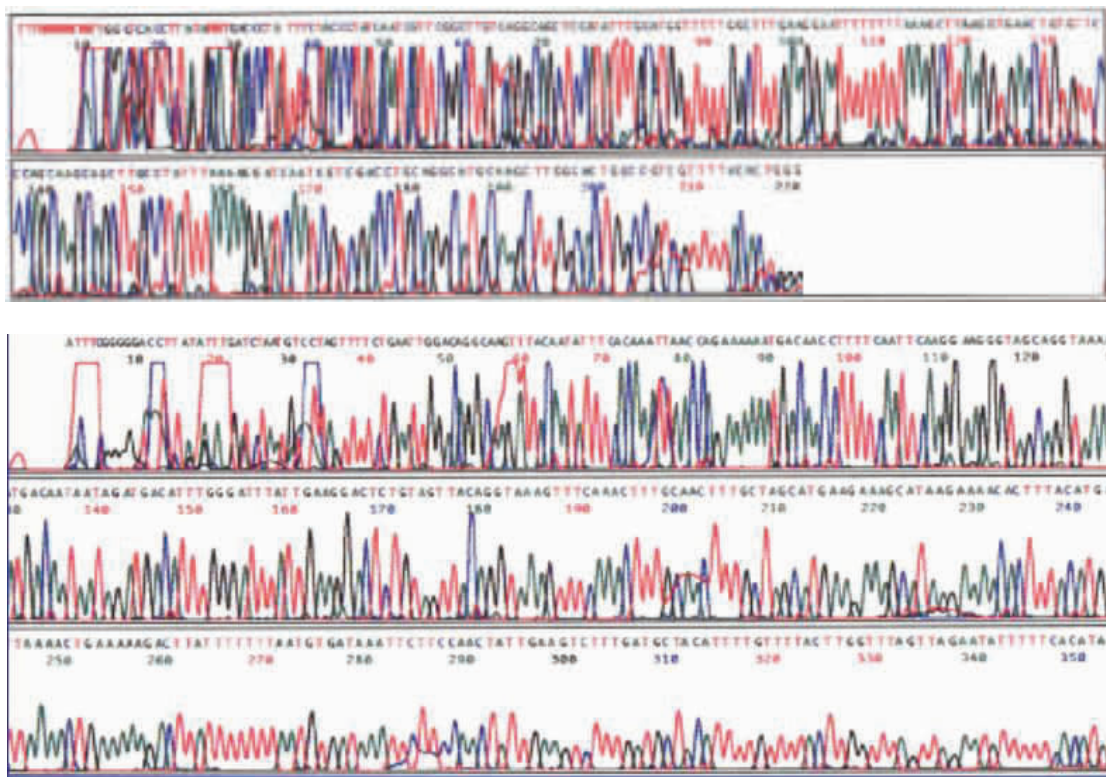


图 4 差异基因克隆的序列分析图

Fig.4 Sequence analysis of the differential genes

A: No.17 differential gene clone; B: No.22 differential gene clone

芯片技术筛选 K562 细胞的肿瘤特异性基因。

肿瘤细胞基因组经常发生大量的基因突变和重排,其机制目前尚未完全阐明。寻找和鉴定肿瘤相关基因、抗肿瘤相关基因,从分子水平上阐明肿瘤发病机制,是一个研究热点和难点。肿瘤的发生、发展往往是多个基因结构和功能异常改变的结果。而传统的研究方法,如差异显示、PCR、消减杂交等方法或是假阳性较高^[9,10],或是过程繁琐,而且都只局限于基因表达水平的研究^[11],对基因组水平的突变无能为力。针对以上的问题,本研究采用 DNA 芯片技术,从基因组水平来研究,以期对 K562 恶性细胞特异性的基因进行筛选分离。结果表明,采用 DNA 芯片技术进行基因组片段的分析,与传统技术方法相比,有更加简单、快速和高通量的特点。

K562 细胞的分子生物学特性之一是染色体发生移位:t(9;12),导致融合基因 *bcr/abl* 形成^[12]。研究表明融合基因 *bcr/abl* 与抑制 K562 细胞凋亡相关,因而它的形成也是引发肿瘤的一个重要因素^[13]。在本研究中发现的 42 个差异克隆中,经过进一步的序列分析发现,其中第 17 号差异基因克隆即为 BCR 基因克隆,这说明本方法用来筛选肿瘤特异性基因是敏感、特异、可行的。另外序列分析还发现有些差异基因克隆是非编码序列或者编码一些新的功能未知蛋白,这提示这些非编码序列可能参与基因的调控,未知蛋白的功能可能与肿瘤的发生发展相关。其他相关基因片段的分析正在进行中。

综上所述,DNA 芯片技术应用于肿瘤差异基因的筛选,操作可以更简单、迅速,为高通量识别肿瘤特异性基因提供了新的技术途径,从而可为肿瘤的基因诊断、基因治疗靶基因选择以及肿瘤发生机制的阐明提供基因组水平的线索。

参考文献:

- [1] 马文丽,郑文岭,James FB,等.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,1998.89-113.
- [2] 赵伟,刘全俊,刘伟,等.DNA 芯片技术诊断乙、丙型肝炎的研究[J].东南大学学报(医学版),2002,21(1):75-80.

- Zhao W, Liu QJ, Liu W, *et al.* Clinical application of DNA microarray technique to recognition of hepatitis B and C[J]. J Southeast Univ (Medical Science Edition), 2002, 21(1): 75-80.
- [3] 姜立,马文丽.人红白血病 K562 细胞与红系分化的调控[J].第一军医大学学报 (J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao), 2001, 21(6): 461-3.
- [4] 陈汉春,孟巧.K562 细胞中氯化血红素诱导性表达基因的研究[J].中华血液学杂志,2003,24(4): 185-9.
- Chen HC, Meng Q. Study of hemin induced gene express in k562 cells[J]. Chin J Hematol, 2003, 24 (4): 185-9.
- [5] 冯春琼,马文丽,李凌,等. As₂O₃ 处理前后 K562 细胞基因表达变化的基因芯片检测[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 772-5.
- Feng CQ, Ma WL, Li L, *et al.* Analysis with DNA chips of the gene expression in K562 cells in response to As₂O₃ treatment[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 772-5.
- [6] 朱利娜,马文丽,毛向明,等.人胎盘基因表达谱芯片的初步研究[J].第一军医大学学报,2002,22(5): 400-2.
- Zhu LN, Ma WL, Mao XM, *et al.* Preliminary study of DNA microarray of human placenta gene expression profile[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22 (5): 400-2.
- [7] 毛向明,马文丽,姜立,等.应用 RD-PCR 方法制备 K562 细胞表达谱芯片基因探针[J].第一军医大学学报,2002,22(6): 548-53.
- Mao XM, Ma WL, Jiang L, *et al.* Application of restriction display PCR in preparing the probes of the gene chip for investigating gene expression profile of K562 cells[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(6): 548-53.
- [8] Lajos P, Mark A, James S, *et al.* Clinical application of cDNA microarrays in oncology[J]. Oncology, 2003, 8(2): 252-8.
- [9] 张强,朱志文.抑制性消减杂交技术与肿瘤相关基因克隆新进展[J].国外医学·肿瘤学分册(Foreign Med Sci·Section of Oncology),2000,27(6): 362-4.
- [10] 孙立军,黄强,王爱东,等.应用差异显示技术克隆胶质瘤细胞诱导分化相关基因[J].中华神经外科杂志,2003,19(2): 89-92.
- Sun LJ, Huang Q, Wang AD, *et al.* Clone the genes associated with induced differentiation of glioma with RAP-DD[J]. Chin J Neurosurg, 2003, 19(2): 89-92.
- [11] Ciro M, Bracken AP, Helin K. Profiling cancer[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(2): 213-20.
- [12] Daley GQ, van Etten RA, Baltimore D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210 *bcr/abl* gene of the Philadelphia chromosome[J]. Science, 1990, 247(243): 824-30.
- [13] 王春红,孙秉中,袁跃传. *bcr-abl* 融合基因抑制 K562 细胞凋亡的研究[J].中华肿瘤杂志,1998,20(5): 340-1.
- Wang CH, Sun BZ, Yuan YC. Inhibition of apoptosis by *bcr-abl* fusion gene in k562 cells[J]. Chin J Oncol, 1998, 20(5): 340-1.