

## mRNA 差异显示技术的改进及在肿瘤中的应用(续)

李友军 关勇军 综述 陈主初 审校

湖南医科大学肿瘤研究所 长沙 410078

(续第 4 期 212 页)等提出 cDNA 亲和捕获法<sup>(16)</sup>和 cDNA 点杂交法能有较地筛选出真正的阳性差异序列。对于已被克隆的多个差异片段,可以将克隆或其 PCR 产物点于膜上,通过差示筛选(Differential Screening)和 cDNA 点杂交而鉴别出阳性克隆。这样就可避免逐个做 Northern 杂交而耗费大量的 RNA,特别是微量 RNA;这样可以用同一探针就可筛选出多个克隆;还方便了后续步骤,如阳性克隆可直接测序和标记探针进行 cDNA 文库筛选<sup>(14)</sup>。

### 2.4 提高低拷贝 mRNA 的差异显示率

mRNA 差异显示对高拷贝 mRNA 有很强的倾向性,在标准的 PCR 反应中,引物与靶序列结合具有特异性,因而由非特异结合引导的竞争反应少,而在 mRNA 差异显示中模板极多,几乎所有模板的启动均有引物错配,而且 dNTP 的浓度极低(为标准反应 1%),因而造成竞争机制,使产物更倾向于高拷贝

mRNA,而对低拷贝检测较差<sup>(17)</sup>。然而许多重要的调控基因为低拷贝基因,因而提高这种技术对低拷贝 mRNA 的检测率就尤为重要。

有些研究者将 mRNA 差异显示 PCR 反应中 dNTP 的浓度及 5 端随机引物浓度提高 10 倍<sup>(18,19,20)</sup>,能降低由于竞争机制所造成的倾向性问题,然而这样做会增加背景。此外,可通过改进 PCR 反应,以减少竞争性及增加对低拷贝 mRNA 的敏感性,如适当延长引物长度和避免使用针对高拷贝 mRNA 的引物<sup>(21)</sup>,使其更具有选择性。

### 2.5 全长 cDNA 的克隆

由 mRNA 差异显示获得的 cDNA 片段一般长为 300 - 500bp,而且大多数都位于 3 端非翻译区,不同的有机体差异很大,这些序列常不能真正代差异表达的基因,因而必需克隆全长 cDNA<sup>(15)</sup>。对于部分 cDNA 序列,可从以下几方面克隆全长 cDNA:第一、

## 讨 论

本实验以小鼠骨髓 PCE 微核试验观察 ADK 的微核形成作用,所设最高剂量的为最大耐受量的 1/2,符合文献要求<sup>(2)</sup>。为排除 ADK 对骨髓细胞增殖的影响,除计算微核率外还求算了 PCE/RBC 比值。在动物的骨髓微核试验中,由于各种断裂剂引起的微核出现的高峰不一致,为增加实验的敏感性和准确性,常作微核率 - 时间效应,以确定合适的采样时间和适宜的标本制作时间<sup>(2)</sup>。由于在预试验中,ADK 自身诱发的微核率较低,且微核率 - 时间关系不显著,难以确定其峰值时间,所以为找出适宜的采样时间和局部提高实验的敏感性,我们首先建立了 IP 环磷酸胺的阳性模型。从第一步所获结果看,IP 环磷酸胺 18h 后,微核率开始提高,24h 后达到高峰,表明环磷酸胺很快分布到骨髓,并影响细胞的有丝分裂。我们以其峰值时间 24h 为实验组的采样观察时间,并在此基础上将所得的各组数据处理比较,保证了实验的准确性。

染色体断裂是形成微核的基础,微核率高反映了染色体损伤的遗传效应,已为国内外学者所公认<sup>(3,4)</sup>,故广泛用于诱变剂的短期快速检测。本实验表明,阴性对照组微核率为 2.33%左右,阳性组为 26.83%,符合实验设计要求<sup>(5)</sup>,而实验组微核率为 1.67% - 2.16%,各剂量组与阴性对照组比较无显著性差异( $p > 0.05$ ),而环磷酸胺阳性组与阴性对照组比较则有极显著的差异( $p < 0.01$ )。故本实验结果表明,ADK 无诱发小鼠骨髓微核率增加的作用。

## 参考文献

- 1 G. 克拉克. 生物染色程序. 第一版. 上海:科技出版社,1985
- 2 徐叔云. 药理学实验方法. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1994
- 3 Mutter B, Badwin GC, et al. Detection of the Chemical Mutagens. *Mutat Res*, 1974;23:239
- 4 Hallander A. Chemical Mutagens Principles and Methods for Their Detection Vol. 4, New York: Plenum, 1976:31 - 53
- 5 刘毓谷. 卫生毒理学基础. 北京:人民卫生出版社,1987:25 - 151  
(1998 - 10 - 28 收稿;1999 - 06 - 13 修回)

传统的 cDNA 文库筛选,但必需有高质量的 cDNA 文库,且费时,适合于少量基因的研究;第二、cDNA 末端快速扩增(RACE)。近几年来,RACE 的成功应用充分显示了它是一种快速、有效地克隆全长 cDNA 的手段,特别是从微量 mRNA 和低丰度转录本中克隆全长 cDNA<sup>(22)</sup>;第三、利用生物信息学,使用公共数据库中的资料进行 EST 查找,构建重叠群,拼接。所得结果尚需实验证实,如 Northern 杂交或 RT-PCR,以防假阳性。

### 3 mRNA 差异显示在筛选肿瘤相关基因中的应用

1992 年,Liang 等首创该技术时,就将其应用于乳腺癌相关基因的筛选。他们比较了正常乳腺细胞系(76N)和转移乳腺癌细胞系(21MT-2)的基因表达,获得 3 个表达不同的 cDNA 片段<sup>(4)</sup>。此后,该技术在肿瘤分子生物学中得到更广泛的应用,已在许多肿瘤中筛选到相应的相关基因。如表 2。

表 2 应用 mRNA 差异显示筛选肿瘤相关基因

基 因	RNA 来源	基因潜在功能	参考文献
Integrin -6	正常乳腺细胞和乳腺癌细胞系	候选抑瘤基因	(23)
Mob - 1	鼠胚胎成纤维细胞和突变 P53 基因及 Ha-ras 基因转化的衍生细胞系	介导 ras 基因活化	(24)
延长因子 1 基因	皮肤癌鳞状细胞及 <sup>60</sup> Co 照射后	辐射后,参与机体细胞恢复	(25)
CD24	正常肝组织和肝癌组织	肝癌恶性转化的早期标志	(26)
PMA16	原位直肠癌和转移癌细胞系	调控直肠癌转移表型	(27)
ZnF20	正常甲状腺组织和甲状腺癌组织及细胞系	候选瘤基因	(28)
Hevin	非转移前列腺癌细胞系和转移癌细胞系	抑制前列腺癌转移	(29)
Di12	正常乳腺细胞系和乳腺癌细胞系	乳腺癌预后有关	(30)
RAIG1 - 2	头颈部鳞状细胞癌细胞系和维甲酸诱导后	介导维甲酸与 G 蛋白信号传导	(31)

### 4 结语

mRNA 差异显示是一种比较灵活、全面的检测细胞和组织差异表达基因的方法。近年来,这项技术

已被许多实验室应用于筛选肿瘤相关基因,尤其是新的肿瘤相关基因。毫无疑问,这将有助于发现肿瘤新的早期诊断标志、药物治疗靶分子和了解肿瘤发病的分子机制。然而必需注意的是新基因片段的获得,仅是许多步骤中的第一步,因为新的基因的功能还是未知的。因此,发现新基因片段后,下一步就必须研究差异表达基因的功能,包括全长 cDNA 克隆、表达产物功能分析、在肿瘤发病过程中的作用及作为肿瘤早期诊断标志和药物治疗靶分子的有效性等。

### 参考文献

- 1 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning*. a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 2 Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 1992;257:967
- 3 Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*, 1993;259:946
- 4 Hubank M, Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Res*, 1994;22:5640
- 5 Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression. *Science*, 1995;270:484
- 6 Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, et al. Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science*, 1997;276:1268
- 7 Okubo K, Hori N, Matoba R, et al. Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nature Genet*, 1992;2:173
- 8 Adams MD, Soares MB, Kerlavage AR, et al. Rapiel cDNA Sequencing from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genet*, 1993;3:373
- 9 Itoh K, Matsubara K, Okubo K, et al. Identification of an active gene by using large-scale cDNA sequencing. *Gene*, 1994;140:295
- 10 Ito T, Kito K, Adati N, et al. Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS-Lett*, 1994;351(2):231
- 11 Diachenko LB, Ledesma J, Chenchik AA, et al. Combining the technique of RNA fingerprinting and differential display to obtain differentially expressed mRNA. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996;219(3):824
- 12 Maarten HK, Jum Li Feng, Andrews WH, et al. Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display. *Nucleic Acids Res*, 1995;23(16):3244
- 13 Sun Y, Hegamyer G, Nancy H. Molecular cloning of fine messenger RNAs differentially expressed in preneoplastic or neoplastic JB6 mouse epidermal cells: one is homologous to human tissue inhibitor of metalloproteinases-3. *Cancer Res*, 1994;54(5):1139

# DNA 芯片技术及其在突变检测中的应用

姚群峰 徐顺清 周宜开

同济医科大学环境医学研究所 武汉 430030

## 1 引言

肿瘤和遗传病发生的根本原因都是由于遗传物质发生了改变,这些改变包括基因的点突变、缺失及插入等多种形式,其中点突变是基因突变的最主要形式,其本质都是 DNA 分子的结构发生了改变。检测分析 DNA 分子的这些变化,对于阐明肿瘤及遗传病的分子机理、疾病的早期诊断具有重要意义。基因突变的检测方法自从 PCR 技术问世以来,已取得了很大的进展<sup>(1)</sup>,目前常用的基于 PCR 技术的检测方法

包括:异源双链分析(HA)、单链构象多态性分析(SS-CP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)、化学错配裂解(CMC)、限制性片段长度多态性分析(RFLP)等,如果突变位点已知,除上述方法外还可采用等位基因特异性寡核苷酸探针(ASO)、等位基因特异性扩增(ASA)技术等。这些方法大多都是用于检测突变是否存在,而不能确定突变性质,ASO 和 ASA 法虽然可以确定突变的类型,但也不适于分析突变位点较多的

- 14 Zhang H, Zhang R, Liang P. Differential screening of gene expression difference enriched by differential display. *Nucleic Acids Res*, 1996;24(12):2454
- 15 Sompayrac L, Jane S, Burn TC, et al. Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Res*, 1995; 23(22):4738
- 16 Li FS, Barnathen ES, Kariko K. Rapid method for screening and cloning cDNAs generated in differential mRNA display: application of Northern Blot for affinity capturing of cDNAs. *Nucleic Acids Res*, 1994;22(9):1764
- 17 Bertioli DJ, Schlichter UH, Adams MJ, et al. An analysis of differential display shows a strong bias towards high copy number mRNA. *Nucleic Acids Res*, 1995;23(21):4520
- 18 Guimaraes MJ, Lee F, Zlotnik A, et al. Differential display by PCR: novel findings and applications. *Nucleic Acids Res*, 1995;23(10):1832
- 19 Moclil, Miller H, Li J, et al. Improvements to the differentiated display technique reduce back ground and increase Sensitivity. *Anal Biochem*, 1995;226:383
- 20 Hadman M, Adam BL, Wright GL, et al. modifications to the differential display technique reduce back ground and increase Sensitivity. *Anal Biochem*, 1995;226:383
- 21 Ikononov OC, Jacob MH. Differential display protocol with selected primers that preferentially isolates mRNAs of moderate to low abundance in a microscopic system. *Biotechniques*, 1996;20(6):1030
- 22 Sugimoto M, Suzuki YK. Molecular Cloning, sequencing and expression of a cDNA encoding glucosidase from mucor javanicus. *J Biochem*, 1996;119(3):500
- 23 Sager R, Anisowicz A, Neveu M, et al. Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J*, 1993;7(10):965
- 24 Liang P, Averboukh L, Pardee A, et al. Ras activation of genes: Mob-1 as a model. *PNAS*, 1994;91:12515
- 25 Jung M, Kondratyev AD, Dritschilo A. Elongation factor 1 is enhanced following exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*, 1994; 54(10):2541
- 26 Lan-Ru Huang and Hey-Chi HSU. Cloning and expression of CD24 gene in human hepatocellular carcinoma: A potential early tumor marker gene correlates with P53 mutation and tumor differentiation. *Cancer Res*, 1995;55:4717
- 27 Cajot JF, Sordat I, Sulvestre T et al. Differential display cloning identifies motility related protein(MRP1/CD9) as highly expressed in primary compared to metastatic human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 1997;57:2593
- 28 Gonsky R, Knauf JA, Elise R, et al. Identification of rapid turnover transcripts overexpressed in thyroid tumors and thyroid cancer cell lines: use of a targeted differential RNA display method to select for mRNA subsets. *Nucleic Acids Res*, 1997;25(10):3823
- 29 Nelson PS, Plymate SR, Frue LD, et al. Hevin, an antiadhesive extracellular matrix protein, is down-regulated in metastatic prostate adenocarcinoma. *Cancer Res*, 1998;58:232
- 30 Burger A, Li H, Zhang XK, et al. Breast cancer genome anatomy: correlation of morphological changes in breast carcinomas with expression of the novel gene product Di12. *Oncogene*, 1998;16(3):327
- 31 Cheng Y, Lotan R. Molecular cloning and characterization of a novel retinoic acid-inducible gene that encodes a putative G protein-coupled receptor. *J Bio Chem*, 1998;273(52):35008

(1999-02-26 收稿;1999-04-26 修回)