

• 新技术 • 新方法 •

儿童急性淋巴细胞白血病差异表达
基因文库的构建和筛选

任玥 王彤 王杰

【摘要】 目的 克隆和分离儿童急性淋巴细胞白血病(ALL)差异表达基因,探讨小儿白血病的发病机制。方法 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞,抽取mRNA,逆转录成 cDNA;经 Rsa I 酶切,实验组 cDNA 被分成两组,分别与两种不同的接头连接后,与对照组 cDNA 进行两次消减杂交和两次抑制性聚合酶链反应(PCR),提取、纯化 PCR 产物,与 PT-Adv 载体连接构建 cDNA 消减文库,利用 PCR 扩增、测序和同源性分析差异表达的序列。结果 选取文库中 60 个克隆进行菌落 PCR 分析,可以检出大小为 200~600 bp 的插入片段。从中随机挑选 20 个克隆进行测序、生物信息学分析,其中 18 个克隆与已知基因有高度序列同源性,符合率为 98%~100%,共编码 17 种基因。这些基因大多涉及基因表达调控、DNA 损伤修复、细胞周期、物质代谢等,均与细胞增殖、分化有关。此外发现 2 个新基因。结论 本实验表明我们已成功构建小儿 ALL 相关消减 cDNA 文库,为小儿 ALL 发病机制的研究奠定了基础。

【关键词】 前体细胞淋巴瘤白血病淋巴瘤; 核酸杂交; 基因文库

Screening and cloning of differential expressed genes in child acute lymphocytic leukemia by suppression subtractive hybridization REN Yue, WANG Tong, WANG Jie. Continuing Education College, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China

Corresponding author: WANG Jie, Email: wangjie19932002@163.com

【Abstract】 Objective To clone and identify genes differentially expressed in child acute lymphocytic leukemia (ALL) by suppression subtractive hybridization. **Methods** A subtracted cDNA library of ALL was constructed by suppression subtracted hybridization (SSH) method. After screening, the clones that subtracted library were selected to identify by colony PCR and DNA sequencing. Nucleic acid homologies were performed using the BLAST program. **Results** Random analysis of 60 clones from subtracted cDNA library showed about 200-600 bp inserts confirmed by colony PCR, and 20 clones were confirmed by sequence analysis and blast analysis. The 18 clones encoding 17 genes were highly homologous with the partial sequences of known genes, the coincidence rates were 98%-100%. These genes were related with cell cycles, metabolism, and tumor development closely. Two new genes were found. **Conclusion** It was concluded that a subtractive cDNA library related to pediatric ALL was constructed successfully, which laid foundation for screening related genes in children ALL.

【Key words】 Child acute lymphocytic leukemia; Nucleic acid hybridization; cDNA library

急性白血病是儿童最常见的恶性肿瘤之一,其中急性淋巴细胞白血病(acute lymphocytic leukemia, ALL)发病率最高,约占 80%^[1],其发病机制尚未明了。随着分子生物学技术的发展,小儿 ALL 差异基因表达谱分析已成为小儿 ALL 机制研究的重要手段^[2]。抑制性消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)是一种鉴定、分离组织细胞中基因差异表达研究的一种新

技术,适用于疾病发生的相关基因及其功能分析^[3]。本研究应用 SSH 技术,分离小儿 ALL 白血病差异表达基因,为进一步探讨小儿白血病的发病机制和防治小儿 ALL 提供新思路 and 理论依据。

资料与方法

一、资料

1. 对象:试验组为 1 例未经血液专科治疗的 11.2 岁男性初诊儿童 ALL 患者,参照 FAB 诊断标准,根据临床表现、外周血涂片、骨髓细胞形态学、免疫学分型及骨髓活检等综合指标确诊。对照组为 1 例正常健康儿童,与试验组相比,在性别、年龄等一般临床特征上无明显差异。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.08.109

基金项目:沈阳市科技局科技计划(200614-34CG)

作者单位:110034 沈阳医学院继续教育学院(任玥、王杰);沈阳医学院生物化学及分子生物学教研室(王彤)

通讯作者:王杰,Email:wangjie19932002@163.com

2. 试剂:感受态大肠杆菌(*E. coli*) TOP10F'菌为本室保存;PT-Adv 质粒载体、PCR-Select cDNA Subtraction Kit、Advantage PCR Cloning kit 购自 BD Clontech;50 × PCR Enzyme Mix 购自 QIAGEN;PolyA Tract mRNA Isolation Systems III kit 购自 Promega;mRNA Purification 试剂盒购自 Omega;High Pure PCR Product Purification kit 购自 Boehringer Mannheim;淋巴细胞分离液购自天津灏洋生物制品科技有限公司;LB/X-gal/IPTG 购自 Gibco 公司;Trizol 购自 Invitrogen Life Science。引物、DNA 序列测定由大连宝生物制品公司完成。

二、方法

1. 单个核细胞的分离和总 RNA 提取:按照知情同意原则,抽取患者及健康供者骨髓或外周血 5 ml,肝素抗凝后采用 Ficoll 密度梯度离心法分离单个核细胞。利用 PolyA Tract mRNA Isolation Systems III 试剂盒(Promega 公司),按使用说明书抽提 mRNA,Beckman DU50 分光光度计和变性琼脂糖凝胶电泳进行样品 RNA 的定量分析和纯度鉴定。

2. cDNA 合成:取 poly(A) + RNA 4 μl、cDNA 合成引物 1 μl,70 °C 退火 2 min 后,加入 MMLV 逆转录酶 200 U 和 dNTP 组成单链 cDNA(sscDNA)反应体系,42 °C 延伸 1.5 h。立即加入 RNase H、DNA 聚合酶、dNTP、*E. coli* DNA 连接酶,组成总体积 80 μl 的反应体系,16 °C 孵育 2 h 后加入 6 U T4 DNA 聚合酶,再反应 30 min,合成双链 cDNA(dscDNA)。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

3. SSH:参照说明书,采用 PCR Select cDNA Subtraction Kit(Clontech 公司)进行 SSH;以儿童 ALL 患者 dscDNA 为试验方(Tester),正常儿童 dscDNA 为参照方。两者均用同一种限制性内切酶 Rsa I 切割,产生平滑末端的片段。将 Tester cDNA 分成 2 份,每份分别与寡核苷酸接头 Adapter 1 和 Adapter 2 连接。在确保连接效率 >25% 前提下,每个测试里加入过量 Driver cDNA 进行第一次杂交。将进行过首次杂交的两组样品直接混合,加入过量的 Driver-cDNA 进行第二轮消减杂交。对两轮消减杂交的产物进行 PCR 扩增,最终得到差异表达的 Tester dscDNA 片段。同时设计 GAPDH 特异引物,对消减后的第二轮 PCR 产物和未消减的 Tester cDNA 中的管家基因 GAPDH 进行扩增,分别为 20、25、30、35 循环。比较 GAPDH 扩增产物,检测消减效率。PCR 的引物序列均由试剂盒提供。

4. cDNA 消减文库的克隆与鉴定:在 T4 DNA 连接酶的作用下,将用 High Pure PCR Product Purification kit 回收的消减杂交后得到的 PCR 产物连接到 T 载体。取 15 μl 连接反应产物,加入 150 μl 感受态细胞 *E. coli*

TOP10F' 中,电穿孔法质粒导入大肠杆菌。将转化液种植于含 50 mg/ml 氨苄青霉素的 LB/X-gal/IPTG(QIAGEN)培养板上,静置 30 min 后,37 °C 倒置培养过夜。计数经蓝-白筛选后的白色菌落。随机挑选 60 个白色菌落,用获得差异片段时所使用的一对引物进行巢式 PCR,扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,观察插入片段有无及片段大小。挑选其中的 20 个阳性菌落,提取重组质粒 DNA,测序并进行 BLAST 同源性比较分析。本研究经过三次重复实验。

结 果

一、mRNA 质检分析

高质量的 mRNA 是保证 cDNA 高产量的前提。Beckman DU50 分光光度计测定患者及健康供者 poly(A) + RNA 分别为 4.91 μg 和 4.35 μg,纯度(A260/A280)分别为 1.87 和 1.93。2% 变性琼脂糖凝胶电泳见 mRNA 呈 >500 bp 的彗尾状带。证实提取的 mRNA 能满足消减杂交试验的质量要求。

二、消减效率鉴定

消减效率鉴定是评价抑制性消减文库价值的最关键步骤。取消减后的第二轮 PCR 产物和未消减的 Tester cDNA 各 1 μl,应用 GAPDH 特异引物分别在 20、25、30、35 循环进行扩增,扩增进行电泳鉴定。未消减组 PCR 扩增 20 循环即可见特异性扩增条带,而消减组扩增至 35 循环才可见特异性扩增条带(图 1)。说明构建的消减文库具有很高的消减效率。

三、消减文库扩增及鉴定

将消减杂交后的第 2 次抑制性 PCR 产物插入载体质粒并转化大肠杆菌克隆化,经蓝-白筛选后得到消减文库共 960 个克隆。随机选取其中 60 个克隆,用获得差异片段时所使用的一对引物进行菌落 PCR,扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳。91% 的克隆可见大小为 200 ~ 600 bp 的插入片段(图 2)。

四、测序与同源性分析

随机挑取 20 个含有插入片段的阳性克隆进行测序、生物信息学分析。表 1 可见,20 个阳性克隆中 18 个克隆与已知基因的部分序列高度同源,符合率 98% ~ 100%,共编码 17 种基因。这些已知基因大多涉及基因表达调控、DNA 损伤修复、细胞周期等,均与细胞增殖、分化有关。另外发现 2 个新基因。

讨 论

国内外学者对小儿 ALL 的研究甚多,但仍未完全阐明其发生机制。从分子水平来看,相关基因的表达可能是小儿 ALL 产生的基础。因此,小儿 ALL 患者和

表1 20个含有插入片段的阳性克隆测序结果

克隆	插入片段(bp)	同源基因	符合基因[bp, (%)]
2-10	370	Zonula occludens-1, ZO-1	370(100)
1-4	334	019d08 My023 colony protein	333(99)
2-5	258	NADH Dehydrogenase subunit 2	258(100)
5-10	310	mitochondrial gene	301(97)
1-9	313	Ribosomal protein L7a	311(99)
3-10	417	retinoic acid-induced gene G, RIG-G	417(100)
4-5	298	Glicopholin-C	297(99.67)
2-9	405	methyl transferase	405(100)
6-3	275	Anion channel related to potentation	275(100)
7-3	395	Fms-like tyrosine kinase 3	397(98)
8-4	590	Src homology-2 domain-containing phosphatase-2, SHP-2 Unknown gene	590(100)
4-10	437	nuclear protein SA-1	
5-5	512	Death-associated protein kinase 1, DAPK1	490(96)
4-6,9-6	257	LYL1 gene	257(100)
8-9	342	Unknown gene	342(100)
6-7	497	Outcome Predictor in Acute Leukemia 1, OPAL1	
7-10	340		339(99)

正常人群间差异表达基因的分析是阐明其发生机制的有效手段。

SSH是以抑制性PCR反应为基础,鉴定、分离组织细胞中选择性表达基因的一门技术,具有简便易行、灵敏度高、重复性好等优点。我们在本研究中使用SSH方法成功分离和克隆了ALL患者和正常人群差异表达基因文库,并对其中20个阳性克隆进行了测序、生物信息学分析,最终确定了与小儿ALL的发生、发展相关的基因共19种,其中包括2种GenBank中无同源序列的新基因。

ZO-1属于膜结合鸟苷酸激酶(MAGUK)家族。以往的研究表明,ZO-1具有将闭锁蛋白和细胞内骨架系统连接,形成稳定结构的功能,在维持正常胞旁屏障通透性、细胞信号转导、基因转录及调节细胞增殖分化和周期中发挥着非常巨大的作用^[4]。因此,ZO-1表达沉默和蛋白缺失与肿瘤疾病的发生发展密切相关。我们发现该基因在小儿ALL中有异常表达。因此,可以断定,ZO-1很可能在小儿ALL形成中起作用。SHP-2是一种由蛋白酪氨酸磷酸酶N11(PTPN11)基因编码的蛋白酪氨酸磷酸酶,其分子结构中两个Src同源区(N-SH2和C-SH2)是其发挥作用的基础^[5]。在乳腺癌^[6]、胃癌^[7]等疾病中,均存在SHP-2的异常。SHP-2激活可影响各种信号传导通路,如激活Rho家族GTP酶、JNK、NF-κB、MAPK和Ras等通道^[8]。最近在白血病中也发现了SHP-2体细胞错义功能活性突变^[9],提示

正常造血细胞中该基因可能在白血病肿瘤细胞的恶性转化中起重要作用。DAPK1是一种肿瘤抑制基因,广泛存在于各种细胞的凋亡系统中,该基因正常情况下有助于触发细胞在发生癌变前就死亡。但异常的DNA甲基化作用会关闭控制细胞生长的DAPK1基因,从而造成肿瘤生长^[10]。DAPK1基因突变会导致基因关闭,并引发慢性淋巴细胞白血病^[11]。FLT3(Fms-like tyrosine kinase 3)是Ⅲ型受体酪氨酸激酶(RTK)家族成员,在骨髓中仅表达于造血干/祖细胞。FLT3与其配体(FL)在造血干/祖细胞的增殖和分化中起重要的调节作用。我们的前期研究表明,FLT3基因发生突变,有可能破坏正常血细胞的增殖分化与凋亡,导致白血病发生^[12-14]。RIG-G基因是从全反式维A酸(ATRA)诱导的急性早幼粒白血病细胞系NB4中分离克隆到的一种新基因,它与IFI54、IFI56、IFI58等基因有着很高的同源性,均属于干扰素诱导基因(interferon-induced gene,IFI)家族的成员^[15]。研究发现RIG-G基因能在上皮样细胞WISH、宫颈癌细胞Hela、头颈鳞状癌细胞以及非小细胞肺癌细胞H460和A549等实体瘤细胞中被干扰素快速诱导表达,具有抑制细胞增殖和促进细胞分化的能力^[16]。

最近的研究显示,在NB4、HL60、U937等髓系白血病细胞中,该基因的表达也被诱导^[17]。本研究发现,RIG-G基因在小儿ALL中异常表达,其在小儿ALL发生、发展中的作用及机制值得进一步研究。

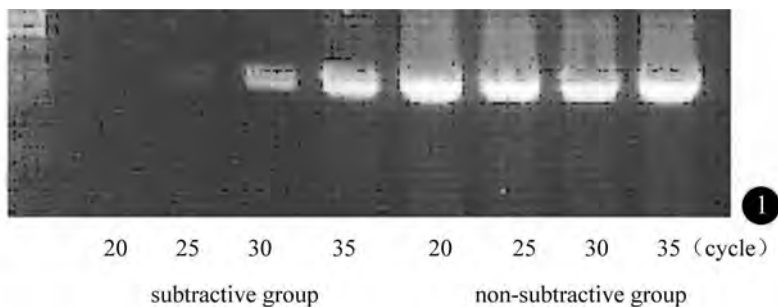
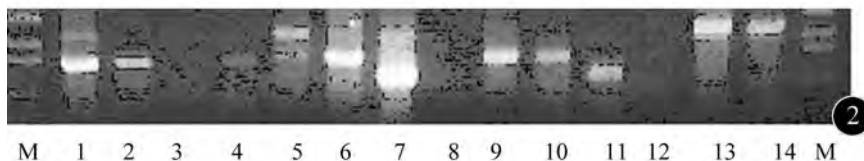


图1 消减效率PCR鉴定



M: marker 1-14: Partial colonies containing different sized fragment

图2 扩增后引物PCR鉴定

综上所述,本项目在国内首次应用抑制性消减杂交技术筛选小儿 ALL 特异基因,建立小儿 ALL 差异表达基因文库,成功构建小儿 ALL 相关消减 cDNA 文库,为筛选小儿 ALL 相关基因奠定了基础。

参考文献

[1] 郭晔,陈玉梅,邹尧,等. 688 例儿童急性白血病群体生物学特征现况调查-单中心小样本研究. 中国当代儿科杂志, 2009, 11: 793-796.

[2] Hart SM, Feroni L. Core binding factor genes and human leukemia. *Haematologica*, 2002, 87: 1307-1323.

[3] Diatchenko L, Lau YC, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93: 6025-6030.

[4] Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, et al. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell*, 2009, 20: 3930-3940.

[5] Kim HY, Park SJ, Joe EH, et al. Raft-mediated Src homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) regulation in microglia. *J Biol Chem*, 2006, 281: 11872-11878.

[6] Dawson MI, Xia Z, Jiang T, et al. Adamantyl-substituted retinoid-derived molecules that interact with the orphan nuclear receptor small heterodimer partner: effects of replacing the 1-adamantyl or hydroxyl group on inhibition of cancer cell growth, induction of cancer cell apoptosis, and inhibition of SRC homology 2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2 activity. *J Med Chem*, 2008, 51: 5650-5662.

[7] Hishida A, Matsuo K, Goto Y, et al. Associations of a PTPN11 G/A polymorphism at intron 3 with *Helicobacter pylori* seropositivity, gastric atrophy and gastric cancer in Japanese. *BMC Gastroenterol*, 2009, 9: 51.

[8] Miyamoto D, Miyamoto M, Takahashi A, et al. Isolation of a distinct

class of gain-of-function SHP-2 mutants with oncogenic RAS-like transforming activity from solid tumors. *Oncogene*, 2008, 27: 3508-3515.

[9] Zhuang G, Hunter S, Hwang Y, et al. Regulation of EphA2 receptor endocytosis by SHP2 lipid phosphatase via phosphatidylinositol 3-Kinase-dependent Rac1 activation. *J Biol Chem*, 2007, 282: 2683-2694.

[10] Lin Y, Hupp TR, Stevens C. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death. *FEBS J*, 2010, 277: 48-57.

[11] Röhrs S, Romani J, Zaborski M, et al. Hypermethylation of Death-Associated Protein Kinase 1 differentiates natural killer cell lines from cell lines derived from T-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 2009, 23: 1174-1176.

[12] 王杰,李树,王彤. 伴有染色体异常白血病患者 FLT3 基因检测的临床意义. *中国实验血液学杂志*, 2007, 15: 700-704.

[13] 王彤,王杰. 白血病患者 FLT3 基因突变及其与白血病发生、预后的关系检测. *中国组织工程研究与临床康复杂志*, 2007, 11: 7509-7512.

[14] 王杰,王彤,李树,等. 儿童白血病患者 FLT3/ITD 突变分析及其临床意义. *癌症*, 2007, 26: 58-63.

[15] Xiao S, Li D, Zhu HQ, et al. RIG-G as a key mediator of the antiproliferative activity of interferon-related pathways through enhancing p21 and p27 proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16448-16453.

[16] Lou YJ, Pan XR, Jia PM, et al. IRF-9/STAT2 functional interaction drives retinoic acid-induced gene G expression independently of STAT1. *Cancer Res*, 2009, 69: 3673-3680.

[17] Jing Y, Hellinger N, Xia L, et al. Benzodithiophenes induce differentiation and apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Res*, 2005, 65: 7847-7855.

(收稿日期:2013-01-05)

(本文编辑:梁雷)