

## 正常细胞与镉转化细胞抑制消减 cDNA 文库构建\*

董丽娜, 王敏, 雷毅雄

**摘要:**目的 构建正常人支气管上皮细胞(16HBE)与氯化镉诱导转化 16HBE 细胞间差异表达基因的消减 cDNA 文库。方法 以 16HBE 为驱动子,氯化镉诱导转化 16HBE 细胞为检测子,应用抑制性消减杂交(SSH)方法构建 cDNA 文库,经 2 次消减杂交和 2 次 PCR 后,将巢式 PCR 产物插入载体,随机挑选克隆进行鉴定。结果 得到纯度高及完整性好的总 RNA 和 mRNA,并扩增出良好的双链 cDNA,cDNA 与接头的连接效率 >25%,最终使差异表达基因得到富集;经蓝白菌落筛选,获得 1 200 余个白色阳性克隆;随机挑选 50 个白色克隆进行 PCR 扩增,显示 96% 克隆均有 100~600 bp 的插入片段,这些片段可能是差异表达基因 cDNA 片段,提示用 SSH 法及 T/A 克隆技术有效构建了两细胞株间差异表达基因的消减 cDNA 文库。结论 成功创建正常 16HBE 细胞与镉转化 16HBE 细胞差异表达基因消减 cDNA 文库。

**关键词:**氯化镉;人支气管上皮细胞(16HBE);抑制性消减杂交(SSH);cDNA 文库

中图分类号: R 994.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)04-0512-03

## Construction of suppression subtractive cDNA libraries of normal and cadmium-transformed cells

DONG Li-na, WANG Min, LEI Yi-xiong (Laboratory of Hygienic Toxicology, School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong Province 510180, China)

**Abstract:** **Objective** To construct a subtractive cDNA library of differentially expressed genes in normal and cadmium-transformed cells. **Methods** The human bronchial epithelial cells (16HBE cells) transformed by cadmium chloride was used as a tester, and the normal 16HBE cells as a driver, to construct a cDNA library using suppression subtractive hybridization (SSH). The products were inserted into TA vector after two subtractive hybridization and nested PCR. The clones were picked up randomly and analyzed with PCR. **Results** The total RNA and mRNA of purity and good integrity were extracted, and the double-stranded cDNA was well produced. The link efficiency of cDNA and connector was greater than 25%. And finally the differentially expressed genes were enriched with subtractive hybridization and nested PCR. After blue-white screening, the amplified library contained more than 1 200 white positive clones, and fifty of them were selected randomly and analyzed with PCR. Totally 96% of the clones had the inserted 100–600 bp segment and the segments might be the gene cDNA segments with differential gene expressions. **Conclusion** The subtractive cDNA library of differential genes in transformed 16HBE cells induced by cadmium was successfully established.

**Key words:** cadmium chloride; human bronchial epithelial cell (16HBE cells); suppression subtractive hybridization; cDNA library

镉及其化合物是一类工业毒物 and 环境污染物,可引起多种器官和系统损害,甚至导致肿瘤发生<sup>[1]</sup>。根据国际癌症研究组织报告,镉及其化合物是确认的第一类致癌物,是人类危害最大的金属毒物之一<sup>[2]</sup>,但目前镉致癌的机制尚未完全阐明<sup>[3]</sup>。人支气管上皮细胞(16HBE)是镉化合物作用的主要靶细胞之一,前期研究已建立氯化镉诱发 16HBE 细胞恶性转化模型<sup>[4-5]</sup>,本研究应用抑制消减杂交(suppressive subtractive hybridization, SSH)方法<sup>[6]</sup>,构建正常 16HBE 细胞与氯化镉诱导转化 16HBE 细胞间差异表达基因的 cDNA 消减文库,为进一步大

量筛选和克隆镉相关特异性表达新基因奠定基础。

### 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 Trizol 试剂(美国 Gibco BRL 公司), rTaq 酶(日本 TaKaRa 公司); Oligotex Direct mRNA 试剂盒(德国 QIAGEN 公司), PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒(美国 Clontech 公司), TOPO TA Cloning Kit(美国 Invitrogen 公司); 核酸蛋白定量仪(德国 Eppendorf BioPhotometer 公司), PCR 扩增仪(美国 Bio-RAD 公司), 分子杂交仪(美国 UVP 公司)。

1.2 细胞培养 氯化镉体外诱导转化 16HBE 细胞模型<sup>[5]</sup>, 应用正常 16HBE 细胞与氯化镉转化 16HBE 细胞,以 10% (V/V) 的基础培养基, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度环境下进行培养。

1.3 RNA 提取和纯化 细胞总 RNA 提取采用 Tr-

\* 基金项目: 国家自然科学基金(81072322, 30771781); 广东省自然科学基金(06022672)

作者单位: 广州医学院公共卫生学院卫生毒理实验室, 广东广州 510182

作者简介: 董丽娜(1985-), 女, 洛阳人, 硕士在读, 研究方向: 环境毒理和化学致癌。

通讯作者: 王敏, E-mail: hildawang03@yahoo.com.cn

izol 试剂进行,并对 mRNA 按照 Oligotex Direct mRNA 试剂盒说明书进行纯化。提取总 RNA 和 mRNA 用核酸蛋白定量仪定量及检测其纯度,以 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性。

1.4 抑制性消减杂交 采用 PCR-Select™ cDNA Subtraction 试剂盒,以正常 16HBE 细胞为驱动子 (driver),镉诱导转化 16HBE 细胞为检测子 (tester),按说明书操作。取正常及镉转化 16HBE 细胞 mRNA 各 2 μg 为模板,合成双链 cDNA。纯化浓缩后分别酶切,鉴定酶切效率。将酶切后 Tester cDNA 分为 2 组,分别与接头连接。确认接头连接效率后,用过量 Driver cDNA 进行第 1 轮杂交,将上述 2 个反应产物混合,加入过量新鲜变性 Driver cDNA 中,进行第 2 轮杂交,补平 cDNA 分子末端。取 2 μL 2 轮消减杂交后的产物,进行第 1 次 PCR 扩增;最后将第 1 次 PCR 产物作为模板进行第 2 次 PCR 扩增;有效扣除非特异性表达基因,进一步富集差异表达基因。取第 2 轮 PCR 反应产物同未消减 tester (1 和 2R) 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测消减结果。

1.5 cDNA 消减文库构建 采用 TOPO TA Cloning Kit,用第 2 轮 PCR 产物建立连接体系。拿一支 One Shot TOP10 chemically competent cells,加上上述反应液 4 μL,冰浴 5 min,取出 50 μL 至一预热的 Luria-Bertani 平板上(含 50 ~ 100 μL 氨苄青霉素),37 °C 培养过夜。计数平板上蓝色及白色菌落,随机挑取 50 个白斑克隆,将挑取的菌落以 250 r/min、37 °C 摇菌过夜,取 1 μL 菌液作为扩增模板,以 T7 和 T3 序列为引物进行 PCR 扩增。1.0% 普通琼脂糖凝胶电泳观察是否有插入片段,并鉴定消减文库克隆的插入片段大小及分布范围。

## 2 结果

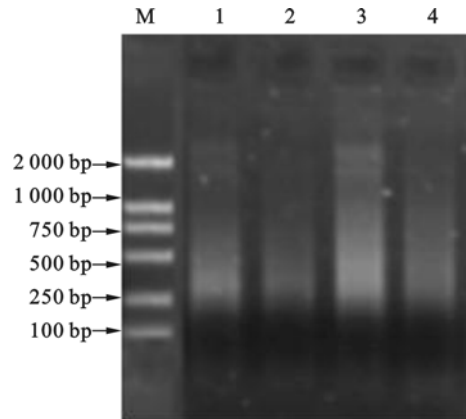
2.1 总 RNA 及 mRNA 纯度及完整性分析 总 RNA 检测结果显示  $A_{260}/A_{280}$  在 1.8 ~ 2.0;经 1% 琼脂糖凝胶电泳,28S 与 18S 条带亮度比值约为 2:1; mRNA 的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果显示为一条彗星尾状条带,主要集中在 0.5 ~ 2.0 kb,完整性良好。

### 2.2 双链 cDNA 生成和 RsaI 酶切效率分析 (图 1)

取未消化双链 cDNA 2.5 μL 和消化后双链 cDNA 5 μL 于 1.0% 琼脂糖凝胶上作电泳分析,结果显示酶切前双链 cDNA 为 (0.5 ~ 10) kb 之间片状影,而经 Rsa I 酶切后,cDNA 片断变小,主要分布在 0.1 ~ 2.0 kb。

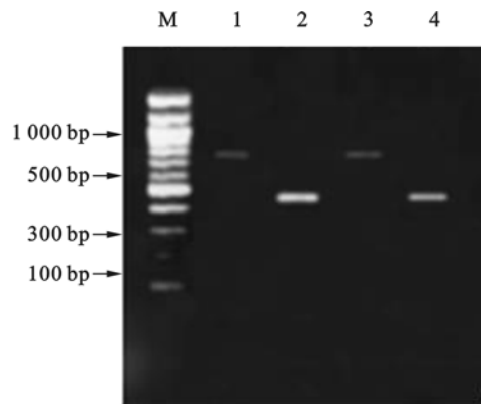
2.3 cDNA 连接效率鉴定 (图 2) 分别以连有 Adaptor1 和 Adaptor2R 的 cDNA (tester-1 和 tester-2R) 为

模板,以管家基因甘油三磷酸 G3PDH 3'Primer 为一侧引物,以 G3PDH 5'Primer 或 Primer1 为另一侧引物,对 G3PDH 进行 PCR 扩增。只有包含了 Primer1 序列的 Adaptor1 和 Adaptor2R 才能扩增 Primer1 与 G3PDH 3'Primer1 之间的双链 cDNA 片段。结果显示连接效率均 > 25%,符合理论上要求。



注:1,2:分别为未消化、酶切消化后 16HBE 细胞双链 cDNA;3,4:分别为未消化、酶切消化后氯化镉诱导转化 16HBE 细胞双链 cDNA;M:DL2000 marker。

图 1 酶切效率分析



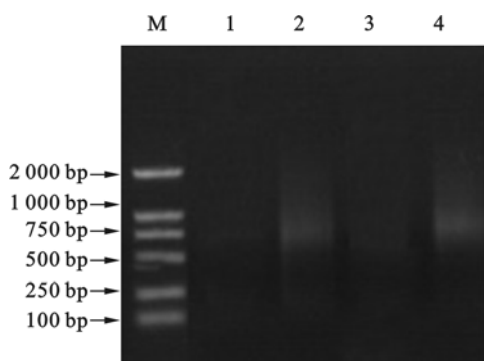
注:1,2:用 tester-1 为模板,G3PDH 3'和 PCR 引物 1 和 G3PDH 3'和 5'为引物的 PCR 产物;3,4:用 tester-2R 为模板,G3PDH 3'和 PCR 引物 1 和 G3PDH 3'和 5'为引物的 PCR 产物;M:1 000 bp DNA Ladder。

图 2 接头连接效率 1% 琼脂糖电泳图

2.4 巢式 PCR 产物鉴定 (图 3) 经 2 轮消减杂交和抑制性 PCR 扩增,Tester cDNA 中低丰度差异表达基因得以富集,取第 2 轮 PCR 反应产物同未消减 Tester (1 和 2R) 经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果显示,成功消减后的第 2 轮 PCR 反应产物表现为 0.2 ~ 1.5 kb 之间弥散状,与 Rsa I 限制性内切酶消化双链 cDNA 产生片段大小基本一致,比未消减 tester 条带短,且范围更加集中,提示 SSH 技术有较高消减效率。

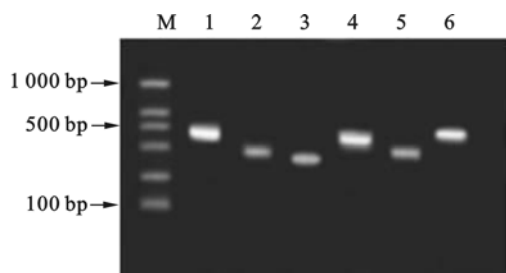
2.5 消减文库质量鉴定 (图 4) 在培养平板里,可见多个白色和蓝色菌落生长,以白色菌落为主,约

1 200 余个,表明消减 cDNA 文库基本构建成功。在白色阳性克隆中,随机挑选 50 个白色克隆,摇菌过夜后以 nest primer1 和 nest primer2R 为引物进行 PCR 扩增,1.0% 普通琼脂糖凝胶电泳观察,文库有 48 个克隆均有 100 ~ 600 bp 插入片段,阳性率为 96%,这些片段可能是差异表达基因 cDNA 片段。与 cDNA 酶切片段结果相符。



注:1,3:未消减组巢式 PCR 产物;2,4:消减组巢式 PCR 产物;M:DL2000 marker。

图 3 巢式 PCR 产物分析



注:M:1000 bp DNA Ladder;1-6:cDNA 插入片段 PCR 产物。

图 4 PCR 插入片段鉴定

### 3 讨论

肿瘤的发生与发展是多因素多步骤作用过程,其中环境与肿瘤相关基因表达失调起着重要作用<sup>[7-8]</sup>。目前已知的环境致癌基因还不足以完全揭示肿瘤发生机制,能用于肿瘤基因治疗的基因数目并不多。镉及其化合物是环境毒物和致癌物,镉相关基因特别是新基因探索是目前环境致癌防治研究的热点<sup>[8]</sup>。SSH 是抑制性 PCR 与消减杂交技术相结合,从而更简单、快速的分离差异基因方法。因假阳性低、高敏感性和程序相对简单,操作简便易行等优点而被广泛应用<sup>[6,9]</sup>。本研究以正常和镉转化 16HBE 细胞作为对比材料,严格检测 mRNA 分离质量,cDNA 合成、酶切、接头连接,2 轮消减杂交及 2 次抑制 PCR 等反应步骤,使检测子 (tester) 与驱

动子 (driver) 中共有基因的 cDNA 片段得到有效消减,而存在于 Tester 中的特异表达基因则得到特异性扩增,最后利用 T/A 克隆技术,将特异性扩增 PCR 产物直接与 T 载体进行连接,并以蓝白斑菌落对消减文库质量进行鉴定,成功创建了镉诱导转化 16HBE 细胞抑制消减 cDNA 文库。目前,利用此技术来探讨环境基因在肿瘤不同发展阶段的表达差异,是常用的环境毒作用和致癌基因的克隆策略,有利于揭示环境肿瘤发生的分子机制,为环境相关肿瘤防治提供更多标记物和治疗靶点<sup>[6,10]</sup>。本研究方法不仅减少了用 RT-PCR、DNA 测序等技术进一步筛选、鉴定差异基因的盲目性,提高特异性,而且有利于克隆出低丰度稀有基因。此方法可为环境镉毒作用相关新基因进一步筛选和克隆提供参考,同时也为其他环境毒物的研究提供了新途径。

### 参考文献

- [1] Swaddiwudhipong W, Mahasakpan P, Funkhiew T, et al. Changes in cadmium exposure among persons living in cadmium-contaminated areas in northwestern Thailand: a five-year follow-up [J]. J Med Assoc Thai, 2010, 93:1217-1222.
- [2] Arita A, Costa M. Epigenetics in metal carcinogenesis: nickel, arsenic, chromium and cadmium [J]. Metallomics, 2009, 1(3): 222-228.
- [3] Zhou ZH, Lei YX, Wang CX. Analysis of aberrant methylation in DNA repair genes during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium [J]. Toxicol Sci, 2012, 125(2): 412-417.
- [4] Lei YX, Wei L, Wang M, et al. Malignant transformation and abnormal expression of eukaryotic initiation factor during human bronchial epithelial cells induced by cadmium chloride [J]. Biomed Environ Sci, 2008, 21(4): 332-338.
- [5] 王敏,魏莲,雷毅雄. 氯化镉诱发人支气管上皮细胞系恶性转化 [J]. 中国职业医学, 2005, 32(6): 2-4.
- [6] Murat C, Zampieri E, Vallino M, et al. Genomic suppression subtractive hybridization as a tool to identify differences in mycorrhizal fungal genomes [J]. Fems Microbiol Lett, 2011, 318(2): 115-122.
- [7] 白图雅,常福厚,王敏杰,等. GSTT1 及 CYP1A1 基因多态性与肺癌易感性关系 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(6): 723-725.
- [8] Lei YX, Wang M, Wei L, et al. Alternative expression and sequence analysis of human elongation factor-1 $\delta$  during malignant transformation of human bronchial epithelial cells induced by cadmium chloride [J]. Biomed Environ Sci, 2010, 23(2): 151-157.
- [9] Zhang L, Cilley RE, Chinoy MR. Suppression subtractive hybridization to identify gene expressions in variant and classic small cell lung cancer cell lines [J]. Journal of Surgical Research, 2000, 93(1): 108-119.
- [10] Shin HJ, Park KK, Lee BH, et al. Identification of genes that are induced after cadmium exposure by suppression subtractive hybridization [J]. Toxicology, 2003, 191(2-3): 121-131.