技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)11-1687-03

利用 T7 噬菌体展示技术构建人舌鳞癌细胞多肽文库

王景涛,季 平,邓 诚,伍明毅,刘 凯,孙守娟,邹 波
(重庆医科大学附属口腔医院口腔颌面外科,重庆 400015)

【摘 要】目的:本研究拟构建人舌鳞癌细胞株 Tca8113 的 T7 噬菌体展示多肽文库,为进一步筛选和鉴定与舌鳞癌相关的蛋白或多肽打下基础。方法:人舌癌细胞株 Tca8113,QiaGen 法提取细胞 mRNA,逆转录合成双链 cDNA 后与 T7Select 10-3 载体连接,体外包装并扩增得到 T7 噬菌体展示多肽文库。结果:构建了人舌鳞癌细胞株 Tca8113 的 T7 噬菌体展示多肽文库,原始文库重组滴度为鳞癌 1.7×10^6 pfu,扩增后滴度为 3×10^{10} pfu/mL。随机从文库中抽取 10 个克隆 PCR 扩增插入片断,电泳结果显示构建的文库中均有插入片段,文库插入率高达 100%。所构建的文库插入片断大小在(0.4~1.0)kbp 之间。结论:成功构建了人舌癌细胞株 Tca8113 的 T7 噬菌体展示多肽文库,为下一步筛选和鉴定与舌癌相关的蛋白或多肽奠定了基础。

【关键词】噬菌体展示;多肽库;人舌鳞癌;Tca8113
【中国图书分类法分类号】R322.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-04-28

Construction of a T7 phage display library of human tongue squamous carcinoma

WANG Jing-tao, et al
(*Department of Dentofacial Surgery, the Affiliated Stomatology Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To construction human tongue squamous carcinoma T7 phage display peptides library from the cell of human tongue squamous carcinoma cell line Tca8113. *Methods*: mRNA was isolated from the cells of human tongue squamous carcinoma cell line Tca8113 with the methods of QiaGen, and then mRNA was reversely transcribed into double stranded cDNA. After digestion, the cDNA was inserted into T7 Select 10-3 vector. The phage display peptides library was constructed by package reaction in vitro and plate proliferation. Plaque assay and PCR were used to evaluate the library. *Results*: T7 phage display peptides library was established. Plaque assay showed the titer of the library was 1.7×10^6. The phage titer of the amplified library was 3×10^{10} pfu/mL. PCR amplification of random plaque showed insert ratio of 100% in the library. With insert range from 0.4 kbp to 1.0 kbp. *Conclusion*: The phage display peptides library from human tongue squamous carcinoma cell line Tca8113was constructed.

【Key words】 Phage display; Peptides library; Human tongue squamous carcinoma; Tca8113

作者介绍:王景涛(1983-),男,硕士,
研究方向:口腔颌面部肿瘤及其靶向治疗。
通讯作者:季 平,男,主任医师,教授,E-mail:jiping@cta.cq.cn。
基金项目:重庆市科委自然科学基金资助课题(编号:CSTC,2005DB 5241);重庆市卫生局科研基金资助课题计划(编号:2008-2-231,2008-2-232);重庆市卫生局科研基金资助课题(编号:052153)。

[4] Byoung-Seob Ko, Soo Bong Choi, Seong Kyu Park, et al. Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from cortidis [J].Biol. Pharm. Bull,2005,28(8):1431-1437.
[5] Takahiro Horie, Koh Ono, Minako Kinoshita, et al. TG-inter-acting factor is required for the differentiation of preadipo-cytes[J]. Journal of Lipid Research,2008,49(6):1224-1234.
[6] Nelson B A,Robinson K A,Buse M G.High glucose and glucosamine induce insulin resistance via different mechanisms in 3T3-L1 adipocytes [J]. Diabetes, 2000,49:981-991.
[7] Livak K J,Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-△△CT Method[J].Methods, 2001,25(4):402-408.
[8] 杨桂枝,高小平,晏菊芳,等. GOD-POD 法微量化测定方法的建立及其在 3T3-L1 脂肪细胞和 HepG2 细胞糖摄取中的应用[J]. 四川解剖学杂志,2003, 11(1):12-15.
[9] 王振基,刘 泉,邹晨辉,等. PPAR 双激动剂 GCP-02 对细胞葡萄糖利用、前脂肪细胞分化和细胞活力的影响[J].南京医科大学学报,2007,31(9):916-980.
[10] 郭晓农,杨具田,牛 峰,等.胰岛素抵抗 3T3-L1 脂肪细胞模型的建立及鉴定[J].中药材,2008,31(2):258-261.
[11] Ge X M,Yu Q J,Qi Wei,et al. Chronic insulin treatment causes insulin resisitance in 3T3-L1 adipocytes through oxidative stress. Free Radical Research, 2008,42(6):582-591.

(责任编辑:关蕴良)

舌癌是一种严重危害人类健康的恶性疾病,其发病率和死亡率在口腔癌中最高,而且舌体具有丰富的淋巴管和血液循环,加之舌的机械运动频繁,使舌癌常发生早期颈淋巴结转移,且转移率较高,舌癌一般恶性程度较高,生长快,浸润性强。临床上治疗常以综合性治疗为主。早期诊断对舌癌的治疗效果及预后有着十分重要的意义[1]。近年来研究者将噬菌体展示技术与细胞膜表面蛋白多肽结合起来,构建肿瘤的噬菌体展示多肽文库并进行肿瘤特异性抗原或靶向蛋白的筛选[2-5],在对肿瘤的诊断和靶向治疗方面取得了重大突破。应用噬菌体肽库技术筛选出与肿瘤特异性结合的多肽片段为寻找和开发新的特异性靶向多肽提供了广阔的前景。本研究的目的就是利用 T7 噬菌体展示技术构建人舌癌细胞系 Tca8113 细胞多肽库,为下一步筛选出能够与人舌鳞癌细胞株中的肿瘤表面受体特异性结合多肽片段奠定基础,并通过鉴定其在体内体外结合的特异性,进而指导临床诊治和改善预后。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

1.1.1 细胞株 人舌癌细胞株 Tca8113 有重庆医科大学生命科学研究院基础研究所提供。

1.1.2 主要试剂 T7Select® 10-3b 噬菌体载体,BLT5615 菌株, MerkT 7Select® 10-3Orient Express Random Primer cDNA Synthesis Kit,EcoRI/Hind III End Modification Kit,DNA Ligation Kit,Mini Column Fractionation Kit,T7Select10-3 Cloning Kit),德国 QiaGen 公司的 Oligotex Direct mRNA Mini Kit 试剂盒。

1.2 实验方法

1.2.1 人舌癌细胞株 Tca8113 的培养 用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基,在 37℃、50 ml/L CO_2 条件下培养。离心消化,收集约 1×10^7 个细胞。

1.2.2 mRNA 的分离和纯化 根据 OligotexR mRNA Mini Kit 试剂盒的要求,按说明从细胞中提取、分离纯化 mRNA。

1.2.3 mRNA 纯度的检测 甲醛变性电泳及紫外分光检测 mRNA 的纯度。

1.2.4 cDNA 合成 cDNA 文库的构建使用 Novagen 公司的 cDNA Synthesis Kit,以 mRNA 为模版,按试剂盒说明进行 cDNA 第一、第二链的合成,等体积苯酚/氯仿/异戊醇抽提反应物,乙醇沉淀。

1.2.5 cDNA 末端处理 T4 DNA 聚合酶补平 cDNA 末端,双链 cDNA 20 μl、10 × 修补缓冲液 3 μl、10mmolDTT 聚合酶 1.5 μl、1 mmol/L dNTP 混合物 3 μl、T4 DNA 聚合酶 1.5 μl,加水至总体积 30 μl。混匀,11℃孵育 20 min。等体积苯酚 / 氯仿/异戊醇抽提反应物,乙醇沉淀,彻底干燥后重新溶解于 10 μl TE 中。反应体系中加入平末端 cDNA10 μl、10 × 修补缓冲液 2 μl、1 mmol/L ATP2 μl、100 pmol/L 接头 2 μl、T4 核苷酸磷酸化酶 5 U,混匀,37℃孵育 5 min。冰上冷却,再加入 T4 DNA 连接酶,16℃作用 16 h 连接 *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ接头。*EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ酶切后得到具有粘端的 cDNA 片段,使用 Mini Column Fractionation 试剂盒(Novagen)去除未连接及长度在 300bp 以下的 cDNA 片段。

1.2.6 文库构建 为了使构建的文库能展示较大的多肽,同时拷贝数也能满足后续筛选和富集工作的需要,选用 T7Select10-3b 作载体。插入序列与载体摩尔比为 1:1.5 的比例即 400 ng cDNA 片段(约 0.02 pmol),加入 0.5 μg *EcoR* Ⅰ和 *Hind* Ⅲ双酶切的 T7Select10-3b 作载体,T4 连接酶 16℃连接过夜。5 μl 重组 DNA 加入 25 μl T7 噬菌体包装物中,22℃温育 2 h 进行体外包装,反应结束后加入 270 μl 的 LB 终止。原始文库加入 20 μl 氯仿 4℃保存,并取少量进行噬菌斑扩增文库加入 10%灭菌甘油,-70℃保存。

1.2.7 噬菌斑试验测定文库滴度 使用 M9TB 培养基 37℃振荡培养 BLT5403 至 A_{600}=0.8~1.0,用灭菌 LB 稀释原始文库102~107 倍。100 μl 稀释物与 250 μl 宿主菌、3 ml 预热的上层琼脂混匀,铺于 LB(加有羧苄青霉素苄)琼脂平板上,37℃、(3~4) h,计算文库库容。

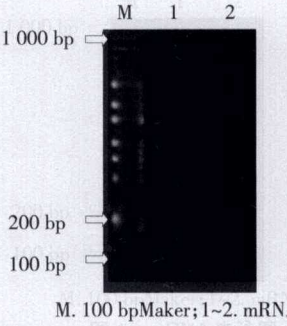
1.2.8 PCR 鉴定重组子 从平板上随机挑选分离良好的单个噬菌斑,用牙签沾取少量噬菌体加入 100 μl、10 mmol/L EDTA 中,涡旋震荡混匀。65℃、14 000 r/min 离心 10 min 去除不溶物,取 1.5 μl 进行 PCR 扩增。上游引物:5-GGAGCTGTCCG TATTCCAGTC-3',下游引物:5'-AACCCCTCAAGACCCGTT TA-3'。80℃热启动,加入 Taq 聚合酶。PCR 循环参数:94℃、50 s,50℃、60 s,72℃、60 s,35 个循环后延伸 72℃延伸 7 min。1%琼脂糖电泳 PCR 产物鉴定文库重组体插入效率。

1.2.9 文库的扩增 参照试剂盒说明书的方法,将初始文库平均分成 2 份进行扩增,计算其滴度。

2 结 果

2.1 mRNA 的提取和分离

人舌癌细胞株 Tca8113 细胞 mRNA 的分离提取:所提取的 mRNA 经 1.2%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳图谱检测其质量(图 1),电泳结果显示成功分离的 mRNA,OD_{260}/OD_{280}=1.951,分子量分布由 0.2~6 kbp(图 1),mRNA 质量和浓度能够满足文库构建的要求。



M. 100 bpMaker;1~2. mRNA

图 1 mRNA 电泳图

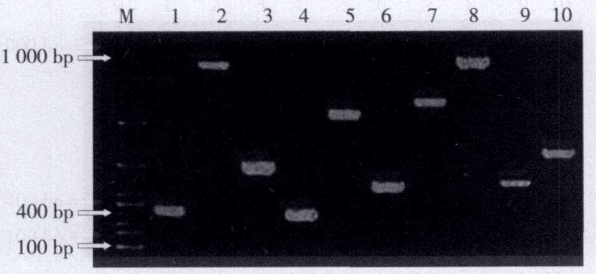
2.2 cDNA 文库构建和鉴定

cDNA 产物经酶切修饰后连接到 T7 噬菌体载体 T7Se-

lect® 10-3b 载体上，构建了 Tca8113 的 T7 Select cDNA 噬菌体展示文库。舌鳞癌细胞株 T7 噬菌体展示 cDNA 原始文库重组克隆数为 1.7×10^6 pfu，经扩增后高达 3×10^{10} pfu/ml。

2.2 PCR 检测重组噬菌斑 cDNA 片段的大小

通过 PCR 反应检测随机挑取的 10 个克隆，PCR 扩增插入片段，琼脂糖凝胶电泳，结果显示：文库中所有 10 个克隆均有插入片段，插入率高达 100%。文库中插入片段大小均在 0.4~1 kbp 之间(图 3)。



1. 100 bpMaker；2~13.随机挑选的克隆菌的 PCR 电泳图

图 3 PCR 电泳图

3 讨 论

肿瘤抗原的特异性是肿瘤早期诊断和免疫治疗的重要保证之一，而肿瘤干细胞的特异性表面标志物是当今研究的热点。噬菌体展示技术自 1998 年由 Smith 建立以来[6]，经过十几年的发展和完善，已被广泛应用于抗体库、随机肽库及 cDNA 文库的建立以及利用其筛选、纯化策略进行筛选细胞表面特异性结合的多肽或抗原。其基本原理是在噬菌体衣壳蛋白基因中插入外源基因，形成融合蛋白表达在噬菌体颗粒蛋白的表面，利用靶分子，采用适当的淘选方法，洗去非特异结合的噬菌体，最终从噬菌体文库中筛选出能结合靶分子的目的噬菌体，外源多肽或蛋白质表达在噬菌体的表面，而其编码基因作为病毒基因组中的一部分可通过噬菌体 DNA 序列测序出来，使得表达蛋白(表现型)和编码基因(基因型)之间完美地结合起来，为生物医学提供高效而使用的研究工具。利用噬菌体展示技术构建多肽展示文库为寻找新的肿瘤标志物，新的肿瘤相关基因和蛋白等为进一步的研究肿瘤发生发展机制，以及肿瘤的早期诊断、靶向治疗等方面具有潜在的基础研究和临床应用价值。其在国内外已被广泛应用于肺癌[5-9]、卵巢癌[10]、大肠癌[11]、肝癌[12,13]等肿瘤抗原的筛选。

目前，国内利用噬菌体展示系统来构建舌癌的噬菌体文库并筛选舌癌抗原还未见报道，本研究旨在构建一个高质量的舌癌噬菌体展示文库，以便进一步从文库中筛选出与肿瘤细胞具有特异性结合的噬菌体多肽及鉴定舌鳞癌特异性及相关性抗原，为舌癌的早期诊断、疫苗研制及发病机制的研究提供依据。

本研究首次利用人舌癌细胞株 Tca8113 为研究对象，通过 QiaGen 法提取人舌癌(Tca8113)细胞 mRNA，使用 Merk 公司的 T7Select® 10-3 Orient Express cDNA Cloning System 合成 cDNA 以及文库的构建。在理论上 T7 噬菌体展示系统的 10~3 b 载体最大可展示 1 200 aa 肽段，但通常情况下，展示肽段在 600 aa 以下的噬菌体有生长优势，导致文库展示的段片段多肽占绝大多数。本实验经检测初始文库的滴度为 1.7×10^6 pfu，经扩增后高达 3×10^{10} pfu/ml，经蓝白斑筛选测定文库的插入率高达 100%。提取的 mRNA 通过 1.2%甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测无明显降解现象，经 PCR 检测 cDNA 平均插入长度大多位于 0.4~1.0 kbp 之间，证明其构建的文库质量较好。经鉴定所构建的多肽文库具有较好的质量，为进一步筛选、克隆舌癌特异性表达的蛋白或多肽奠定了基础，是进行人舌癌相关抗原研究的理想工具。同时，也为我们下一步筛选肿瘤干细胞的表面特异性标志物奠定基础。

参 考 文 献

[1] Coleman J J, Sultan M R.Tumors of the head and neck.In: Schwartz SI, editor. Principles of surgery[M].7th edition.New York: McGraw-Hill, 1999.601-605.

[2] 李芳秋，朱扣军，武建国.噬菌体展示肽库技术应用的研究进展[J].医学研究生学报，2004，17(9)：843-846.

[3] 戴和平，高 宏，赵新颜.噬菌体展示技术的原理和方法[J].水生生物学报，2002，26(4)：400-409.

[4] 朱圣庚.多肽的表面展示与结构库[J].北京大学学报，1997，33(4)：543-544.

[5] 岳文涛，王子彤，王 玥，等.非小细胞肺癌 T7 噬菌体展示文库的构建[J].中国肺癌杂志，2008，11(5)：686-690.

[6] 赵晋丰，吴玲玲，常文军，等.肺癌噬菌体展示肽库的构建及肺癌早期检测分子标志的筛选[J].第二军医大学学报，2008，10(29)：1157-1161.

[7] 庞 华，罗 弋，李少林.人源肺腺癌噬菌体抗体库的构建及初步筛选[J].第三军医大学学报，2008，30(22)：2082-2085.

[8] 陈贻玲，马传亮，赵晋丰，等. T7 噬菌体展示文库筛选肺癌早期检测分子标志群[J].实用癌症杂志，2009，24(3)：227-230.

[9] Sergeeva A. Display technologies: Application for the discovery of drug and gene delivery agents[J].Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, 58(15): 1622-1654.

[10] 王世宣，周洪源，马湘一，等.与卵巢癌细胞表面受体特异性结合的多肽片段研究[J]. 中华妇产科杂志，2003，7(38)：412-414.

[11] 廖康雄，姚学清，吴承堂，等. 噬菌体展示肽库筛选大肠癌细胞特异性结合肽的实验研究[J].南方医科大学学报，2008，28(6)：986-990.

[12] Zhang B H, Zhang Y Q, Wang J W, et al.Screening and identification of a targeting peptide to hepatocarcinoma from a phage display peptide library[J]. Mol Med, 2007, 13(5-6): 246-254.

[13] Jia W D, Sun H C, Zhang J B, et al. A novel peptide that selectively binds highly metastatic hepatocellular carcinoma cell surface is related to invasion and metastasis [J].Cancer Letters, 2007, 247(2): 234-242.

(责任编辑：冉明会)