维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0013-05

人 K562 细胞 cDNA 文库的扩增、纯化、鉴定和酵母细胞转化

欧阳峰[1,2],王东生[1],郝 坡[1],刘北忠[1],刘 畅[1],钟 梁[1],金丹婷[1],王 翀[1]

(1. 重庆医科大学医学检验系省部共建教育部重点实验室,重庆 400016;2. 广东省人民医院皮肤科实验室,广州 510600)

【摘 要】目的:对预转化到大肠杆菌 DH5α 中的人 K562 细胞 cDNA 文库进行扩增、纯化和鉴定并将文库质粒转化酵母细胞,为下一步的靶蛋白筛选做准备。方法:对 K562 细胞 cDNA 文库进行扩增,提取文库质粒,将文库质粒转化酵母 Y187 细胞,并用 PCR 和酶切鉴定转化结果。结果:成功的扩增人 K562 细胞 cDNA 文库、并验证了文库的多样性、将文库质粒成功转化酵母 Y187 细胞。结论:K562 细胞 cDNA 文库的成功扩增、纯化、鉴定,为进一步的文库筛选奠定了基础。

【关键词】白血病;K562 细胞;cDNA 文库;多样性

【中国图书分类法分类号】R733.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-08-29

Amplification, purification and identification of human K562 cell cDNA library and its transformation into yeast cell

OUYANG Feng, et al

(*Key Laboratory of Laboratory Medical Diagnostics of Ministry of Education, Faculty of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To Amplify, purify and identify the cDNA library of human K562 cell in E.coli DH5α and to transform it into yeast cell for subsequent target protein screening. *Methods*: The cDNA library of human K562 cell was amplified. Then the library plasmids were extracted and transformed into Y187 yeast cell. The results of transformation were verified by PCR and restriction enzyme analysis. *Results*: The cDNA library of human K562 cell was amplified successfully and the diversities were verified. The cDNA library of human K562 cell was also successfully transformed into Y187 yeast cell. *Conclusion*: Successfully amplification, purification and identification of the cDNA library of human K562 cell lay the foundation for the subsequent protein screening.

【Key words】 Leukemia; K562 cell line; cDNA library; Diversity

多年来白血病的治疗一直以化学疗法为主,但化疗的效果有限,相当一部分病例在诱导缓解或巩固治疗中发生多药耐药,从而对化疗反应差,易复发,成为难治性白血病。寻找新的治疗药物和药物治疗靶点已成为白血病防治研究的热点。

K562 细胞是临床和基础研究的常用细胞,是 1 株分化程度极差、恶性程度极高的肿瘤细胞,它是以慢性粒细胞白血病患者急变期胸水细胞建立的,被称为人类红白血病细胞株,同时也作为慢性粒细胞白血病细胞系进行研究。ph 染色体 t(9;22)(q34;q11)几乎存在于所有的慢粒细胞中。9q34 的 c-abl 基因与 22q11 的 bcr 基因重组形成 bcr/abl 融合基因,翻译产生的 p210 蛋白具有明显增高的酪氨酸激酶活性,是致病的主要因素。以往的研究多是集中这个基因或者其他一些已知和慢粒有关系的蛋白。而目前发现了许多具有抗白血病作用的药物,包括一些常用中药的有效成分,但大多数的分子作用机制不明。因此构建 K562 细胞的 cDNA 酵母细胞转化文库,通过酵母杂交技术在活细胞内直接筛选能和某些抗肿瘤药特异结合的靶蛋白,不但有利于阐明药物的分子作用机制,更为实现对白血病的分子靶向治疗奠定基础。

作者介绍:欧阳峰(1975-),男,硕士,检验师,主要研究方向:中药抗肿瘤分子机制研究。

通讯作者:刘北忠,男,副教授,E-mail:liubeizhong@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金项目(No.30300449),国家中医药管理局研究课题(No.02-03ZP52)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料和方法

1.1 材料

人 K562 细胞 cDNA 文库(保存在大肠杆菌 DH5α 中)、酵母 Y187 菌株、SD 基础培养基、各种缺陷培养基均购自 Clontech 公司;大肠杆菌 DH5α 由本室保存;质粒大抽试剂盒购自 Omega 公司;质粒小抽试剂盒购自上海华舜公司;酵母质粒提取试剂盒购自天根生物公司;胰蛋白胨,酵母提取物,琼脂粉均购自上海生工生物工程技术服务有限公司;PCR 试剂、各种限制性内切酶、DNA marker 均购自 TaKaRa 公司;玻璃珠、破壁酶、酵母转化所需试剂均购自 Sigma 公司。引物交由上海生工生物技术公司合成。

1.2 方法

1.2.1 人 K562 细胞 cDNA 文库的滴定 从原始文库中吸取 10μl 转至有 990μl LB/Amp 的 1.5ml EP 管中,轻轻吹打混匀,此即稀释液 A(稀释因子 $=10^{-2}$)。从稀释液 A 中移 10μl 至有 990μl LB/Amp 的 1.5ml EP 管中,轻轻吹打混匀,此即稀释液 B(稀释因子 $=10^{-4}$)。从稀释液 B 中分别取 100μl 均匀地涂布于 3 个 150mm 的 LB/Amp 平板,37℃培养 18~24h 后准确计数每个平板的克隆数,然后计算平均克隆数,根据公式:克隆数 / 铺板体积(ml)× 稀释因子 =CFU/ml 来确定文库的滴度。

1.2.2 人 K562 细胞 cDNA 文库的扩增和多样性鉴定 按照 MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 和 Libraries User Manual 的要求,原始文库有 2×10^6 个克隆,正常情况下要用原始文库的 3 倍的量来筛选,那么至少需要 6×10^6 个克隆才可以满足实验要求。一般每个直径 150mm 平板上的菌落数是 $(2\sim4)\times10^4$ 个,以每个 150mm 平板最少生长 2×10^4 个克隆计算,要达到 6×10^6 个克隆至少要用 300 个 150mm 的平板。根据我们已经确定的文库滴度,可以计算出要达到 6×10^6 个克隆所需要的原始文库的体积。以每个平板铺 200μl 的文库的体积计算,那么共需要 60ml 的文库菌液,取已计算好的所需体积的原始文库,加入到含有 60ml LB/Amp 的 100ml 离心管中,彻底混匀。每个平板铺 200μl 的文库,均匀的铺于 300 个 150mm 的 LB/Amp 平板上。37℃培养 18~24h 后,每个平板加入 5ml LB/Amp 液体培养基。刮取平板上的克隆,收集后充分混匀,分装到 2 个无菌的 1L 的三角瓶中,放置于 4℃(不超过 2 周),准备进行质粒大量提取。

1.2.3 文库多样性的 PCR 鉴定 从 300 个扩增文库的平板中随机抽取 18 个平板,每个平板挑取 1 个菌落,共 18 个菌落,然后通过菌落 PCR 来验证文库的多样性。

PCR 的引物设计如下:

上游引物:5'-TGC GGG GTT TTT CAG TAT-3'

下游引物:5'-CGA TGT TCC AGA TTA CGC-3'

PCR 反应条件如下:

预变性 94℃ 5min,94℃ 1min、63℃ 1min、72℃ 3min 45s,5 个循环,94℃ 1min、53℃ 1min、72℃ 3min45s,30 个循环,最后 72℃延伸 10min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行 PCR 产物的分析。

1.2.4 文库质粒转化效率的计算和质粒的大量提取 用 1μg 的文库质粒小量转化酵母 Y187 细胞,操作是参考 Libraries User Manual 中质粒的小量转化方法。将转化有文库质粒的酵母 Y187 细胞,按 1:10,1:100 和 1:1 000,3 个稀释度来铺 SD/-Leu 平板,每个 90mm 的平板均铺 100μl 的转化有文库质粒的酵母 Y187 细胞,每个稀释度铺 3 个平板,30℃培养 3~5d 后,计数长出的克隆数,然后计算每个稀释度的 3 个平板克隆数的均值,通过公式:CFU × 总重悬体积(μl)/ 铺板体积(μl)× 稀释因子 × DNA 的用量(μg)=CFU/μg DNA,来计算文库质粒的转化效率。按照 Libraries User Manual 的要求,用于筛选的酵母文库克隆数不能少于 10^6 个,根据前面计算的转化效率,可以计算出所需要的文库质粒总量。用 Omega 的质粒大量提取试剂盒多次提取已经扩增好的人 K562 细胞 cDNA 文库质粒,使其总量达 1mg,通过紫外分光仪测定文库质粒的量,电泳检测其纯度。

1.2.5 文库质粒转化酵母 Y187 细胞 参照 Libraries User Manual 中的文库转化方法,将所有文库质粒转化到酵母 Y187 感受态细胞中,并将所有的转化后的细胞铺于 SD/-Leu/Amp 平板上,每个 150mm 平板铺 200μl 的酵母 Y187 细胞,共铺 60 个平板。30℃培养 3~5d 后,待菌落大小足够大时,向每个平板加入 5ml SD/-Leu/Amp 培养基,刮取平板上的克隆并收集于 500ml 的无菌三角瓶中,充分混匀,按每管 0.5ml 菌量分装后,25% 甘油,-80℃保存。另外,随机从上面 60 个平板中挑取 16 个菌落,通过菌落 PCR 来验证文库质粒是否已经转化到酵母 Y187 细胞中。为进一步验证文库质粒转化酵母 Y187 细胞是否成功,把这 16 个菌落置于 SD/-Leu/Amp 的液体培养基中,30℃,200r/min 震荡培养 2~3d 后,提取酵母质粒,并将酵母质粒再次转化为大肠 DH5α 感受态细胞,将转化后的 DH5α 细胞铺于 LB/AMP 的固体培养基上。37℃培养 18~24h 后挑取平板上的菌落,再次摇菌后,进行质粒抽提,并用 *Xho* Ⅰ 和 *EcoR* Ⅰ 对质粒进行双酶切鉴定,通过这两方面来验证文库质粒的转化成功与否。

2 结 果

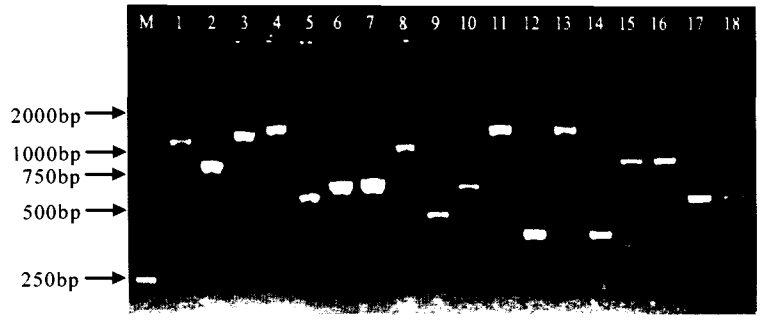
2.1 人 K562 细胞 cDNA 文库的滴度

经计数 3 个平板上的克隆数,计算得到每个平板平均生长的克隆数为 3.5×10^3 个,根据公式计算原始文库的滴度大约为 1.13×10^9CFU/ml。

2.2 人 K562 细胞 cDNA 文库的菌落 PCR

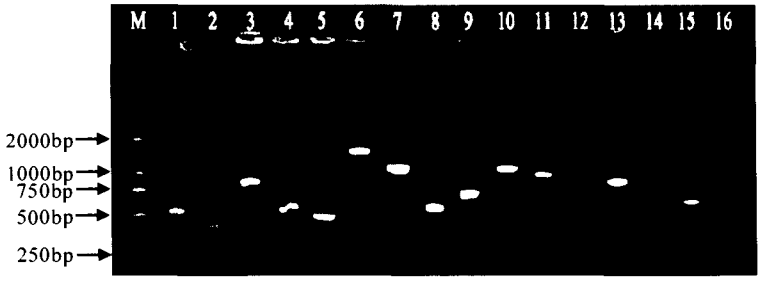
按 Libraries User Manual 需要有 6×10^6 个克隆方能满足要求,根据计算得到的原始文库滴度,

维普资讯 http://www.cqvip.com



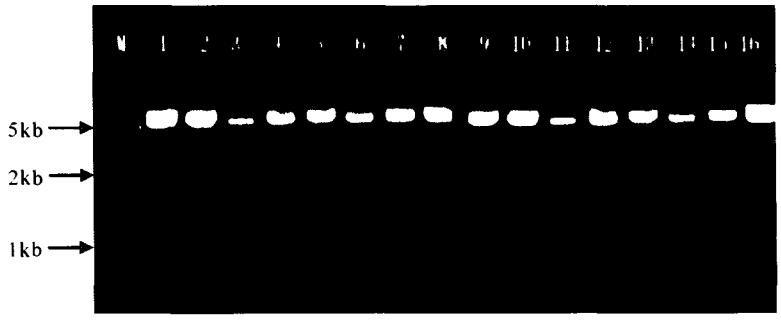
M.分子量标准；1~18.18 个菌落的 PCR 扩增图

图 1　K562 细胞文库质粒的菌落 PCR 图



M.分子量标准；1~16.PCR 产物

图 2　文库质粒 pACT2-cDNA 转化酵母 Y187 细胞的菌落 PCR



M.分子量标准；1~16. K562 细胞文库质粒的酶切

图 3　文库质粒 pACT2-cDNA 的酶切电泳图

可以计算出需要原始文库的体积是 17μl，为了保证文库的量，实际用了 20μl。通过对转化有 pACT2-cDNA 的 DH5α 菌落进行 PCR 扩增，电泳结果显示，18 个菌落均扩增出插入片断，且大小不一，反映出文库的多样性，结果见图 1。

2.3　文库质粒的转化效率

计数 SD/-Leu 平板上的克隆数，并计算其平均数，通过公式计算出文库质粒的转化效率大约是 1.5×10^{3}CFU/μg。而 Libraries User Manual 要求至少要 1×10^{6} 个酵母克隆才可以完全包括所有文库，所以至少要用 700μg 的文库质粒来转化酵母 Y187 细胞，实际用了 1mg 的文库质粒。通过电泳也检测了文库质粒的纯度满足实验要求。

2.4　菌落 PCR 和酶切结果验证了文库的转化成功

从 SD/-Leu 平板上随机挑取了 16 个菌落，16 个菌落的 PCR 结果显示全部有文库质粒的转入。菌落 PCR 结果见图 2。

同时，酶切结果进一步表明文库质粒已经转化到酵母 Y187 细胞中，可以用于下一步的筛选。酶切结果见图 3。

3　讨　论

维普资讯 http://www.cqvip.com

目前对 K562 细胞的研究主要集中在对 K562 细胞的诱导分化、诱导凋亡、抑制增殖等几个方面，K652 细胞具有明显的但不完全的红系分化特性[1]。多年的研究表明[2,3]，在诱导剂如阿糖胞苷等作用下它可以向红系、粒系和单核系分化，是目前体外诱导分化实验的常用细胞模型。

Takagaki[4]等研究了阿糖胞苷诱导 K562 细胞分化的机制，表明阿糖胞苷诱导 K562 的分化是依赖于 Chk1 和 Chk2 的活化。国内外有很多研究是关于中药对 K562 细胞的作用。如槲皮素、苦参碱等研究较多。槲皮素(1,3,4,5,7- 五羟基黄酮,Quercetin)是自然界分布最广的生物类黄酮化合物，广泛存在于植物中。有研究表明[5]，槲皮素一方面可以诱导多种肿瘤细胞凋亡，另一方面可以阻止一些非肿瘤细胞凋亡的发生。赵新汉等[6]研究槲皮素在体外对人慢性粒细胞白血病细胞 K562 的诱导凋亡作用，发现槲皮素在(1~8)×10^{-5}mol/L 浓度范围内能明显抑制 K562 细胞的增殖，并具有时间和浓度依赖性，彗星分析法显示经槲皮素作用的 K562 细胞出现长的彗尾条带；原位细胞凋亡可见细胞变小，核固缩为一个或多个染色质团块；流式细胞仪检测细胞凋亡主要发生在 G_1/S 期；所以槲皮素在体外一定浓度范围内能抑制 K562 细胞增殖，诱导凋亡。槐果碱是从中药苦豆子中提取的一种苦参型生物碱。槐果碱是苦参碱在 D 环上 13,14 位脱氢的结构类似物。曹东旭[7]等研究了槐果碱对人红白血病细胞株 K562 的增殖抑制和诱导细胞凋亡的作用，应用流式细胞仪进一步观察槐果碱对 K562 细胞周期的影响。结果表明，槐果碱对 K562 细胞生长有明显的抑制作用，且这种抑制作用呈浓度依赖性与时间依赖性。细胞经 1.0g/L 的槐果碱作用 48h 后，即呈现典型的细胞凋亡形态学变化，作用 72h 后 DNA 凝胶电泳出现片段的梯形条带。流式细胞仪分析显示，用 1.0g/L 槐果碱使 K562 细胞阻滞于 G_0/G_1 期，作用 72h 后 G_0/G_1 细胞比例由 38.0%上升到 56.2%。槐果碱对人红白血病细胞 K562 的增殖具有明显的抑制作用，并能诱导其发生凋亡。陈建胜[8]等用南瓜蛋白来研究对 K562 细胞增殖的影响，发现南瓜蛋白对 K562 细胞的增殖具有抑制作用。

而实验中将要使用的苦参碱也是一种中药成分，已经在前面的研究中发现了苦参碱的一些抗白血病的机制。苦参碱对白血病细胞的分化研究中，发现其促使 K562 细胞向红系分化，除增强细胞骨架类基因的表达外，可能与其改变磷脂酶 A_2(PLA_2)特别是胞质型磷脂酶 A_2($cPLA_2$)的活性及表达，诱导其酪氨酸激酶与磷酸酶的信号改变等有关[9-11]。

众多的研究者都是以中药或者其成分对 K562 细胞进行处理，观察细胞形态、表型的变化。拟使用酵母双杂交技术来对 K562 细胞 cDNA 文库进行筛选，希望能在分子信号转导这个角度对白血病的致病机制进行更深入的探讨。

K562 细胞 cDNA 文库是通过 *Xho* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ双酶切后与真核表达载体 pACT2 连接到一起。Clontech 公司提供的文库有 3.5×10^6 个不同的克隆，而 Libraries User Manual 上规定文库的标准应含有 2×10^6 个克隆，为了保证每个克隆都能以 2~3 倍的几率出现，所以需要原始文库 3 倍的克隆数才可以满足实验要求。原始文库提供的文库的滴度≥10^8CFU/ml，但是正式实验时要重新来滴定文库，实际滴定的文库是 1.13×10^9CFU/ml，与提供的文库滴度相符，可以用于文库的扩增。计算要用 17μl 的原始文库，但是为了保证文库的完整，实际用了 20μl 的原始文库。由于公司提供的文库是预转化到大肠杆菌 DH5α 中的，所以还需要把它转化到酵母菌 Y187 中。文库的转化不同于普通的小量转化，为了保证转化效率，保证所有的文库质粒都可以转到 Y187 酵母细胞中，所以需要提高转化效率，而转化效率的高低除了试剂的质量，按照标准操作之外，更重要的是和振荡孵育的时间和热休克的时间有关，所以用振荡孵育时间和热休克时间来优化条件，孵育时间分别为 30min,45min,60min,75min，而热休克时间分别为 10min,15min,20min，这样共有 12 种处理组合，用同样体积的转化后的感受态细胞铺 SD/-Leu 平板，最后通过计数平板上的克隆数来确定哪种处理方式的转化效率高，结论是振荡孵育 60min，热休克 15min 的转化效率最高。原始文库提供的文库片断大小在 0.4~3.8kb 之间，平均是1.9kb，通过对文库的多样性分析和酶切鉴定，发现扩增的文库范围在 0.3~3kb 之间变动，平均大小在 1.9kb 之间，与原始文库相符。文库是构建在 pACT2 载体上，且正好位于 *Xho* Ⅰ和 *EcoR* Ⅰ2 个酶之间的，所以在这 2 个酶切位点的两端设计引物来扩增文库的插入片断，而且采用 2 个退火温度来进行扩增，可以提高 PCR 的特异性，结果显示设计的引物可以成功扩增出不同大小的片段，能满足实验要求。公司提供的 T_7 测序引物和 AD 测序引物，适用于所有含有 T_7 启动子和表达 AD 蛋白的载体，所以用这对引物扩增出来的片段并不是实际的文库插入片段

维普资讯 http://www.cqvip.com

的大小,而且这 2 个测序引物不能满足将文库中所有克隆都能扩增出来的要求,在实验中发现有一些菌落扩增不出相应的片段,而用重新设计的引物扩增出的片段基本上可以认为是文库插入片段的大小。

实验研究表明,实验成功地扩增了 K562 细胞 cDNA 文库,并且已经成功转入了酵母 Y187 细胞,转化效率和文库的多样性均满足实验要求,可用于酵母杂交系统研究,为进一步在活细胞内直接筛选药物作用的靶蛋白和开辟新的分子治疗靶点奠定了实验基础。

参 考 文 献

[1] Zhu y,Lee HC, Zhang L. An examination of heme action in gene expression:heme and heme deficiency affect the expression of diverse genes in erythroid K562 and neuronal PC12 cells[J]. DNA Cell Biol,2002;21(4):333-346.

[2] Pettiford SM,Herbst R. The protein tyrosine phosphatase HePTP regulates nuclear translocation of ERK2 and can modulate megakaryocytic differentiation of K562 cells[J]. Leukemia,2003;17(2):366-378.

[3] Huang M,Wang Y,Collins M,et al. CPEC induces erythroid differentiation of human myeloid leukemia K562 cell through CTP depletion and p38 MAP kinase[J]. Leukemia,2004;18(11):1857-1863.

[4] Takagaki K,Katsuma S,Kaminishi Y,et al. Role of Chk1 and Chk2 in Ara-C-induced differentiation of human leukemia K562 cells[J].Genes to Cells,2005;10(2):97-106.

[5] Chae J,Kim J,Park JK,et al. The antioxidant,rather than prooxidant activities of quercetin on normal cells: quercetin protects mouse thymocytes from glucose oxidase-mediated apoptosis[J]. Exp Cell RES,2003;291(10):386-397.

[6] 赵新汉,王志宇,李 晶,等. 槲皮素诱导人白血病细胞 K562 的凋亡[J]. 第四军医大学学报,2006;27(15):1 395-1 398.

[7] 曹东旭, 元英进. 槐果碱对人红白血病 K562 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用[J]. 天津科技大学学报,2006;21(40):34-36.

[8] 陈建胜, 叶华贞. 南瓜蛋白对慢性粒细胞白血病 K562 细胞增殖的影响[J]. 海峡药学,2006;18(5):180-182.

[9] 张 彦,刘晓珊,许相儒,等.苦参碱对 K562 细胞骨架的作用观察[J]. 重庆医科大学学报, 2002;27(4):386-387.

[10] 刘北忠,蒋纪凯,何於娟,等. 苦参碱诱导 K562 细胞磷脂酶 A_2 活性与表达的改变[J]. 实用癌症杂志,2002;17(5):460-462.

[11] 刘北忠,蒋纪恺,何於娟,等. 苦参碱诱导 K562 细胞酪氨酸激酶与磷酸酶的活性改变[J]. 中草药,2003;34(1):48-51.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 8 页)

[10] Brandt KD. An atlas of osteoarthritis[M]. New York USA: The Parthenon Publishing Group,2001.1.

[11] Azuma Y,Ito M,Harada Y,et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerates rat femoral fracture healing by acting on the various cellular reactions in the fracture callus [J]. J Bone Miner Res,2001;16:671-679.

[12] Parvizi J,Wu CC,Lewallen DG,et al. Low-intensity ultrasound stimulates proteoglycan synthesis in rat chondrocytes by increasing aggrecan gene expression[J]. J Orthop Res,1999;17(4):488-494.

[13] Nishikori T,Ochi M,Uchio Y,et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitinsulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel[J]. J Biomed Mater Res,2002;59(2):201-206.

[14] Rosengerg L. Chemical basis for the histological use of Safranin-O in the study of articular cartilage[J]. J Bone Joint Surg, 1971;53-A:69-82.

[15] Graff RD,Kelley SS,Lee GM. Role of pericellular matrix in development of a mechanically functional neocartilage[J]. Biotechnol Bioeng,2003;82(4):457-464.

[16] Messner K. Healing of articular cartilage injuries[M].3nd. Singapore: Elsevier Science,2001.328-329.

[17] Warden SJ,Favaloro JM,Bennell KL,et al. Low-intensity pulsed ultrasound stimulates a bone-forming response in UMR-106 cells[J]. Biochem Biophys Res Commun,2001;286(3):443-450.

[18] Naruse K,Mikuni-Takagaki Y,Azuma Y,et al. Anabolic response of mouse bone-marrow-derived stromal cell clone ST2 cells to low-intensity pulsed ultrasound[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000;268(1):216-220.

[19] Weishaupt D,Schweitzer ME,Rawool NM,et al. Effects of low-intensity ultrasound on the diffusion rate of intravenously administered Gd-DTPA in healthy volunteers[J]. Investigative Radiology,2001;36(8):493-499.

(责任编辑:冉明会)