维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)03－0329－04

利用噬菌体表面展示技术构建人肝癌细胞的 cDNA 表达文库

张 林,刘 杞,孙 航

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400010)

【摘 要】目的:筛选对人肝再生增强因子(hALR)高反应性的肝癌细胞株,以此作为细胞来源,利用噬菌体展示技术构建出含有其 cDNA 表达文库,为进一步从文库中筛选 hALR 相互作用蛋白奠定基础。方法:hALR 刺激不同肝癌细胞株,从中筛选出对 hALR 刺激有高反应性的细胞株。以 Poly ATtract System1000 提取 mRNA,用 T7Select10－3 Orient Express cDNA Cloning System 和 Random Primer 构建它的 cDNA 噬菌体表面展示文库;以噬菌体滴度分析和 PCR 评价文库质量。结果:hALR 对不同肝癌细胞株均有不同程度的促增殖作用,且呈明显的剂量依赖关系。对 QGY 促增殖作用最强,以它作为建库细胞。对所建文库进行噬菌体滴度分析,表明原始 cDNA 文库含有 2×10^7 独立的重组子;随机挑取重组子进行 PCR 鉴定,发现插入长度在 0.2～2kb,平均为 0.6kb,能够较好地代表来源细胞中 mRNA 所表达的几乎所有信息。结论:hALR 对所检测的肝癌细胞株均有促增殖作用;QGY 细胞对 hALR 刺激有最高的反应性;以它为基础,构建出库容量为 2×10^7 的高质量噬菌体表面展示文库。

【关键词】肝再生增强因子;肝癌细胞;cDNA;噬菌体展示文库

【中国图书分类法分类号】R329.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－11－29

Construction of a phage－displayed library with cDNA of human hepatocarcinoma cell

ZHANG Ling, et al

(*Molecular Biology Key Laboratory of Education Ministry on Infectious Diseases, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To identify the human hepatocarcinoma cell line with the highest reactivity to hALR and to construct the phage－displayed library with its cDNA as the basis of the selection for special protein binding hALR from this library. *Methods*: The reactivity to hALR of HepG2, 7701 and QGY was compared by ^3H－TdR methods in vitro. The mRNA of QGY with the highest reactivity to hALR was isolated with PloyATtract System 1000 kit. The phage－displayed library with cDNA fragments of QGY was constructed withT7Select10－30rient Express cDNA Cloning System and Random Primer kit. The quality of this library was evaluated by phage titer assay and PCR. *Results*: hALR could stimulate the proliferation of QGY, HepG2, and 7701 in dose－dependent way in vitro, but QGY showed the highest reactivity to hALR. The phage－displayed library with cDNA of QGY was successfully constructed and contained approximate 2×10^7 primary recombinants. It was indicated by PCR that the size of the cDNA inserts was from 0.2 to 2kb, the average 0.6kb. Thorough information about mRNA of QGY cells could be soundly represented by this library. *Conclusion*: The results show that QGY had the highest reactivity to the hALR among three strains detected. The high quality phage－displayed library is successfully constructed with cDNA of QGY.

【Key words】Augmenter of liver regeneration; Hepatocarcinoma cell, cDNA; Phage－displayed library

肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)是由 Hagiya 于 1994 年从新生鼠肝脏中分离出的一种能促进肝脏再生的物质[1]。近年的研究结果已明确 ALR 能直接刺激肝细胞增殖和再生[2,3],在体内通过直接刺激或/和免疫调控来促进损伤肝脏的再生[4,5]。此外,它在多种组织器官中有表达[1,6],具有重要的生物学意义。但 ALR 究竟如何发挥生物学作用目前仍知之甚少,如果能弄清与 ALR 发生相互作用的蛋白,这无疑有助于深刻理

作者介绍:张 林(1977－),男,硕士,主要研究方向:肝脏的损伤与修复。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271178),科技部重大基础研究前期研究专项(2004CCA01600)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

解 ALR 的生物学功能,为深入了解 ALR 及受体在疾病发生、发展及转归中的作用机制奠定基础。

噬菌体表面展示技术(phage display)是研究蛋白质间相互作用的一种有效手段,利用噬菌体展示技术已成功筛选出多种相互作用蛋白[7,8]。本研究通过构建对 ALR 具有高反应性的肝癌细胞株的 cDNA 噬菌体展示文库,为进一步以 hALR 做为筛选蛋白从该文库中筛选出 hALR 相互作用蛋白奠定基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂、菌株和细胞株

PloyATtract System 1000 试剂盒购自 Promega 公司,T7Select10-3 OrientExpress cDNA Cloning System、Random Primer 试剂盒购自 Novagen 公司,UNIQ-10 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒和核酸分子标准晶购自上海生工公司,^{3}H-TdR 购自北京中国原子能研究所;BLT5615 大肠杆菌购于 Novagen 公司;人肝癌细胞株 QGY、7701、$HepG_2$ 和重组人肝再生增强因子由本实验室保存和制备[4]。

1.2 方法

1.2.1 hALR 高反应性肝癌细胞株的筛选 将 QGY、7701、HepG2 三种肝癌细胞以 5×10^3 个细胞/孔浓度分别接种于 96 孔细胞培养板中,同时加入经超滤纯化的不同浓度的酵母表达 hALR(0.2μg~6μg)和经相同处理的空质粒表达产物(阴性对照),每 3 孔为一浓度组,在 37℃、5% CO_2 条件下培养 8~9h,加 0.8μCi 的^{3}H-TdR,继续培养 12h,收集细胞于玻纤滤纸上。晾干后用液体闪烁计数仪检测 CPM 值。

1.2.2 QGY 细胞 mRNA 的提取、浓度和质量鉴定 将冷 PBS 洗涤后的 5×10^7QGY 细胞收集于 50ml 离心管中,按 PloyATtract System 1000 试剂盒操作指南依次加入 Extaction/BME 缓冲液,破碎细胞;加入 10μl Oligo(dT) Probe 混匀,70℃孵育 5min,室温 12000r/min 离心 10min,收集上清;用 0.5×SSC 处理 SA-PMPs 颗粒,将收集的以上反应物加入其中,室温静置 2min,磁架捕获 SA-PMPs,弃上清;0.5×SSC 重悬 SA-PMPs,混匀,磁架收集 SA-PMPs,尽量去掉上清液;用 1ml 无 RNase 水重悬 SA-PMPs 颗粒,混匀,用磁架捕获 SA-PMPs,转移含 mRNA 的水相至无 Rnase 的试管中,以 12000r/min 离心 mRNA 洗脱液 1min,mRNA 上清转移至另一个无 RNase 的试管中,取 10μl mRNA 紫外分光光度计测定其 A260 和 A280 值,分析 mRNA 纯度和浓度,1.1%琼脂糖电泳鉴定 mRNA 的质量,余-70℃保存备用。

1.2.3 构建 QGY 细胞 cDNA 噬菌体展示文库 18μlmRNA(约 7.7μg)按 T7Select10-3 OrientExpress cDNA Cloning System、Random Primer 试剂盒操作指南依次进行 cDNA 第一链的合成,cDNA 第二链的合成;cDNA 的末端修饰;cDNA 的末端补平,与 *EcoR* Ⅰ Hind Ⅲ接头连接,*EcoR* Ⅰ/*Hind* Ⅲ双酶切;与 T7 噬菌体载体臂的连接。

1.2.4 文库质量的鉴定

1.2.4.1 原始文库滴度的测定

取 10μl 噬菌体包装混合物,依次稀释为 $1:10^2$ 至 $1:10^6$,分别取 100μl 不同稀释液加至含有 250μl BLT5615 大肠杆菌液($OD_{600}=1.0$)的试管中,加入 3ml 顶层琼脂(45℃),混匀,倾倒至 37℃预热的 LB 培养板,37℃培养 3~4h。计数噬菌斑生成数目,并按下式计算 cDNA 噬菌体展示文库的滴度和原始文库总重组子数:

$$\frac{\text{噬菌斑总数}\times\text{稀释倍数}}{0.1\text{ml}}=\text{文库滴度(pfu/ml)}$$

文库滴度×总噬菌体包装混合物体积(0.3ml)=原始文库总重组子数(pfu)

1.2.4.2 PCR 扩增鉴定插入片断大小

随机挑取数个噬菌斑,分别加至含有 2ml BLT5615 大肠杆菌液($OD_{600}=0.5\sim1.0$)的试管中,于空气浴恒温摇床中 37℃、250r/min 培养 3~4h 至细菌完全裂解;吸出噬菌体裂解液,离心(室温,8000r/min,10min)除去细胞碎片,收集噬菌体上清。UNIQ-10 柱式病毒 DNA 抽提试剂盒提取 DNA。根据噬菌体克隆位点两端的序列设计 PCR 扩增引物:T7SelectUP Primer:5'-GGAGCTGTCGTATTCCAGTC-3';T7SelectDOWN Primer:5'-AACCCCTCAAGACCCGTTTA-3'。PCR 参数为 94℃ 10min 预处理,94℃ 1min,51℃ 50s,72℃ 2min,10 个循环后改为 94℃ 1min,54℃ 50s,72℃ 2min,25 个循环,72℃延伸 6min。PCR 反应完毕后取 5μl 在 1.1%琼脂糖凝胶上进行电泳鉴定。

1.2.5 文库的扩增和保存

挑 BLT5615 单菌落于 LB 培养液中,37℃、250r/min 培养过夜,取 1ml 菌液置 100mlLB 培养液中,37℃、250r/min 培养至 OD_{600} 为 0.5,加入 100mM IPTG 1ml(终浓度为 1mmol/L)诱导培养 30min,将原始文库与 50ml 菌液混合,37℃、250r/min 培养 3~4h 至细菌裂解,8000r/min 离心 10min 除去细菌碎片,收集上清,每 10ml 上清,加入 1ml 无菌 80%甘油,于-70℃长期保存。

1.2.6 扩增后文库的滴度测定

取 10μl 扩增后文库液,以 LB 依次稀释为 $1:10^2$ 至 $1:10^{13}$,后续操作和滴度计算同 1.2.4.1 步骤。

1.2.7 统计学处理

所有数据均以均数±标准差表示,用 Excel、SPASS 等软件对结果进行统计学处理。

2 结 果

2.1 不同肝癌细胞株对 hALR 反应性比较

hALR 对肝细胞的促增殖作用必然要通过与细

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞表面的 hALR 受体结合,将刺激信号传导入细胞内,而促进细胞增殖。通过观察细胞增殖的强弱可间接地反映出该细胞表面 ALR 受体表达量的多少或/和亲和力的强弱。从表 1 可知 hALR 对这三种肝癌细胞株均有不同程度的促增殖作用,尤以对 QGY 的促增殖作用最为突出,且呈明显的剂量依赖关系,说明 QGY 细胞对 hALR 有较好的反应性,间接提示其含有较多或/和高亲合力的 ALR 受体以及相应的高丰度 mRNA,适合用于构建本研究所需的 cDNA 文库。

表 1 不同剂量 hALR 对 HepG2、QGY 和 7701 肝癌细胞株增殖的影响

细胞株	hALR 浓度梯度					
	74ng	222ng	666ng	2μg	6μg	空质粒表达产物
HepG2	12608 ± 2648	16909 ± 5180	22141 ± 2476△	19115 ± 2115	12692 ± 927	11908 ± 329
QGY	1759 ± 303	2312 ± 322△	4172 ± 802△	6507 ± 1283△	14961 ± 474△	1433 ± 85
7701	13725 ± 2402	16527 ± 4205	23415 ± 2135	32074 ± 1618△	4895 ± 514△	32515 ± 936

注:△为与空质粒表达产物比 $P<0.01$

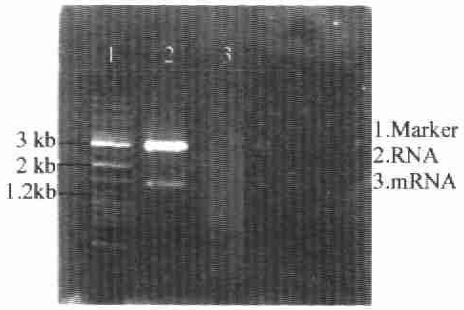


图 1 mRNA 琼脂糖凝胶电泳结果

2.2 QGY 细胞 mRNA 的提取及鉴定

2.2.1 分光光度计法 mRNA 的 A_{260}/A_{280} 在 1.90 以上,表明 mRNA 纯度较高,mRNA 浓缩液的浓度为 432μg/ml,能够满足合成 cDNA 第一链时 mRNA 浓度(>4μg/10μl)的要求(表 2)。

2.2.2 mRNA 的 1.1% 琼脂糖凝胶电泳分析 从图 1 可见 mRNA 呈慧尾状拖影(Smear),主要分布在 2.0kb 附近,无明显的 28s 和 18s 条带。

表 2 紫外分光光度计法检测 mRNA 的纯度和浓度

260nm	280nm	260/280	浓度
1.08	0.54	1.97	43.2μg/ml

mRNA 浓缩液浓度 = 43.2μg/ml × 10 = 432μg/ml

表 3 原始文库的滴度

Dilution	Number of plaques	Titer(pfU/ml)
$1:10^4$	617	6.17×10^7
$1:10^5$	65	6.5×10^7
$1:10^6$	7	7×10^7

表 4 扩增文库的滴度

Dilution	Number of plaques	Titer(pfu/ml)
$1:10^{11}$	355	3.55×10^{14}
$1:10^{12}$	46	4.6×10^{14}
$1:10^{13}$	5	5×10^{14}

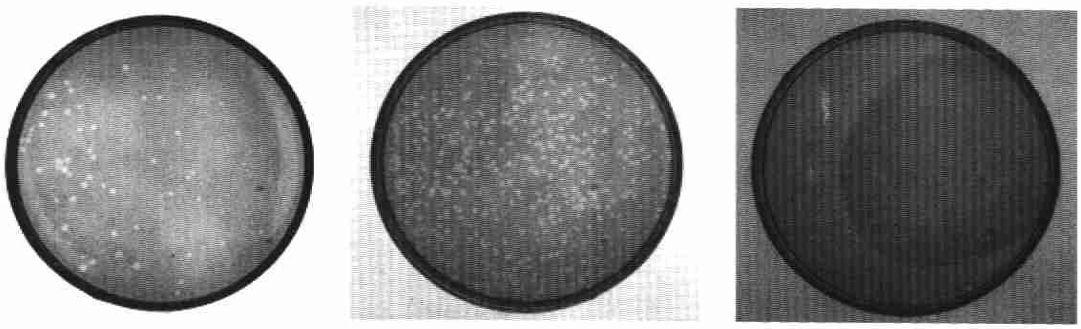


图 2 原始文库在不同稀释度下的噬菌斑数

2.3 文库质量评价

2.3.1 原始文库滴度测定 计数不同稀释梯度下的噬菌斑(如图 2),根据表 3 计算出平均原始文库的滴度为 6.58×10^7pfu/ml;原始文库包含的独立重组子的克隆数 = 文库滴度(pfu/ml) × 0.3ml = 2×10^7pfu。根据表 4 计算扩增后的文库的平均滴度为 4.3×10^{14}pfu/ml。

2.3.2 PCR 鉴定 随机挑取原始文库的噬菌斑,

维普资讯 http://www.cqvip.com

PCR 扩增插入的 cDNA 片断;电泳结果显示插入 cDNA 片断长度在 0.2～2kb 之间,平均为 0.6kb(图 3)。

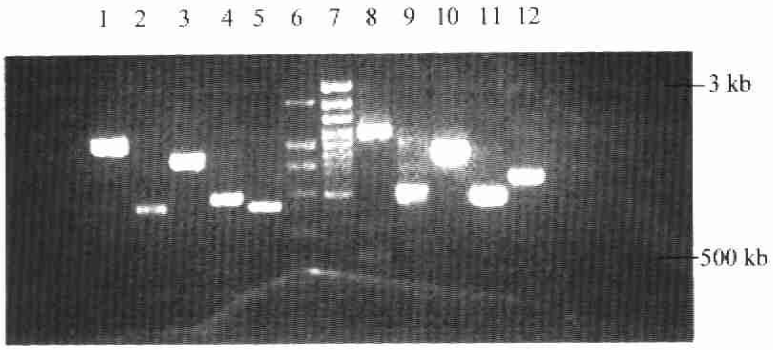


图 3 cDNA 插入片断的 PCR 分析

3 讨 论

本研究中运用的噬菌体表面展示技术是将编码蛋白质的 cDNA 序列克隆入噬菌体的基因序列上,这样 cDNA 编码的蛋白或多肽就与噬菌体外壳蛋白融合表达,从而构建出蛋白质的表面展示文库。这种将基因型和表型联系在一起的技术,可以通过蛋白的相互作用来分离和鉴定出表达有目标蛋白的噬菌体重组子,并且获取到编码目标蛋白的核苷酸序列。

构建适合于筛选 hALR 相互作用蛋白的 cDNA 展示文库,首先应保证构建文库所需的细胞含有高亲和力和/或较高丰度的 hALR 相互作用蛋白。hALR 对肝细胞的促增殖作用必然要通过与 hALR 相互作用蛋白结合,激活特定的信号传导通路而促进细胞增殖。hALR 促细胞增殖的强弱可间接地反映出该细胞表面 hALR 相互作用蛋白表达量的多少或/和亲和力的强弱。在本研究中,我们比较了 hALR 对不同肝癌细胞株的促增殖作用,发现 hALR 对这三种肝癌细胞株均有不同程度的促增殖作用,尤以对 QGY 促增殖作用最为突出,为建库寻找到良好的细胞来源。

从理论上讲,当一个 cDNA 文库具有 10^6 以上的库容量时,就能以 99% 的概率保证文库中包含有细胞表达出的任何一种 mRNA 序列信息[9]。本实验所建文库包含独立重组子 2×10^7,具有较高的库容量。本实验采用了随机引物引导合成 cDNA 第一链,该法可以合成出大小长度不等的 cDNA 片断,它们分别代表了 mRNA 各部分区域的序列,从而反映出 mRNA 所携带信息。另外,据 SCOP 数据库推算,如果文库中 cDNA 插入片断达到 300bp 以上,就可以代表蛋白质的各个功能域[10]。所建文库的 cDNA 插入片断长度在 0.2～2kb 之间,平均长度为 600bp,表明文库中的重组 cDNA 片断能够代表蛋白质的各功能域的序列信息。而蛋白质功能域是蛋白质相互作用的基础,因此所建文库能有效地运用于蛋白质相互作用的研究。

综上所述,本实验利用噬菌体表面展示技术,成功构建了对 hALR 具有高反应性的人肝癌细胞株的高质量 cDNA 表达文库。这为我们高通量地从库中筛选出能与 hALR 相互作用的噬菌体重组子、为寻找 hALR 相互作用蛋白奠定了坚实的基础。除此之外,已构建成功的人肝癌细胞的 cDNA 表达文库还具有广泛的运用空间,它可以用于肝癌细胞的基因功能组学、蛋白质组学、肿瘤疫苗和多肽药物的开发等众多领域,从而为探讨肝癌的发生机制以及寻求诊断和治疗的新途径提供重要工具。

(通信作者:刘 杞,E-mail:liugiy@hotmail.com)

参 考 文 献

[1] Hagiya M D, Francavilla A, Polimeno L, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: Expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994; 91: 8142-8146.

[2] 余慧峰,刘 杞. 大鼠肝再生增强因子在毕赤酵母菌中的表达及生物活性研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2003; 11(7): 421-423.

[3] Qi Liu, Hui-Feng Yu, Hang Sun, et al. Expression of human augmenter of liver regeneration in pichia pastoris yeast and its bioactivity in vitro[J]. World J Gastroenterol, 2004; 10(21): 3188-3190.

(下转第 397 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞、淋巴细胞和单核细胞上表达[10]。bcl－2 基因是调节细胞凋亡基因家族中的基本成员，bcl－2 蛋白高表达可明显延长细胞的生存期[11]，能够抑制嗜酸粒细胞的凋亡。

实验结果显示：生理盐水组豚鼠组织有 Fas、bcl－2 蛋白适量表达及嗜酸粒细胞凋亡，也有少量嗜酸粒细胞浸润，说明该组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞适度凋亡是维持嗜酸粒细胞数量平衡的一种方式。哮喘组豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达及嗜酸粒细胞凋亡指数显著低于生理盐水组、而 bcl－2 蛋白表达显著高于生理盐水组，说明该组豚鼠肺组织由于 Fas 蛋白低表达及 bcl－2 蛋白高表达使嗜酸粒细胞凋亡受抑，OVA 激发后，引起肺组织大量嗜酸粒细胞浸润并释放许多炎症介质，从而造成肺组织严重哮喘炎症反应。母牛分枝杆菌菌苗组豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达及嗜酸粒细胞凋亡指数显著高于哮喘组、而 bcl－2 蛋白表达显著低于哮喘组，说明母牛分枝杆菌菌苗能够通过上调哮喘豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达、下调 bcl－2 蛋白表达从而诱导嗜酸粒细胞凋亡，造成该组豚鼠肺组织嗜酸粒细胞数量显著低于哮喘组，嗜酸粒细胞释放的炎症介质也明显减少，因此肺组织哮喘炎症反应明显轻于哮喘组。

综上所述，母牛分枝杆菌菌苗通过上调哮喘豚鼠肺组织 Fas 蛋白表达、下调 bcl－2 蛋白表达从而诱导哮喘豚鼠肺组织浸润的嗜酸粒细胞凋亡，使支气管肺泡灌洗液及肺组织中嗜酸粒细胞数量明显减少、肺组织哮喘炎症后应明显减轻，表明 OVA 致敏豚鼠前注母牛分枝杆菌菌苗对哮喘豚鼠模型的形成有一定的预防作用。

参 考 文 献

[1] Walsh GM. Eosinophil apoptosis: Mechanisms and climical relevance in asthmatic and allergic inflammation [J]. Br J Haematol, 2000; 111(1): 61－67.

[2] Kankamranta H, Lindsay MA, Giembycz MA, et al. Dlayed eosinophil apoptosis in asthma [J]. J Allergy Clin Immunol, 2000; 106(1Pt1): 77－83.

[3] 罗英琳. 嗜酸粒细胞凋亡在哮喘中的作用[J]. 右江民族医学院学报, 2002; 24(3): 436－437.

[4] Rojas RE, Martinez JNE, Martinez ANE, et al. Apotosis in allergic diseade [J]. RevAllergy Mex, 2000; 47(4): 134－137.

[5] Zuany－Amorim C, Sawicka E, Manlius C, et al. Supprssion of airway eosinophilia by killed Mycobacterium vaccae－induced allergen－specific regulatioy T－cells [J]. Nature Medicine, 2002; 8(6): 625－629.

[6] 刘金保，钟南山，李树浓，等. PPD 对豚鼠实验性哮喘气道炎症的作用[J]. 免疫学杂志, 2002; 18(5): 350－352.

[7] Huges J, Liu Y, Van dame J, et al. Human glomerular mesangial cell phagocytosis of apoptotic neutrophils: mediation by a novel CD36－independemt vitronection receptor/thrombospondin recognition wmchanism that is uncoupled from chemokine secretion [J]. J Immunol, 1997; 158(9): 4389－4397.

[8] 周林福，殷凯生. 三氧化二砷对哮喘豚鼠肺内哮酸性粒细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2002; 22(4): 292－294.

[9] Nagata S, Golstein P. The Fas death factor [J]. Science, 1995, 267(5203): 1449－1456.

[10] 胡晓光，李昌崇. 细胞因子对哮喘嗜酸性粒细胞凋亡的调控及药物的影响[J]. 浙江医学, 2002; 24(3): 187－189.

[11] 覃冬云，梁 标. 哮喘小鼠 T 细胞周期和 bcl－2 基因表达的变化[J]. 基础医学与临床, 2004; 24(2): 188－191.

(上接第 332 页)

[4] Francavilla A, Vujanovic NL, Polimeno L, et al. The in vivo effect of hepatotrophic factors augmenter of liver regeneration, hepatocyte growth factor, and insulin－like growth factor－Ⅱ on liver natural killer cell functions [J]. Hepatology, 1997; 25: 411－415.

[5] Tanigawa K, Sakaida Ⅰ, Masuhara M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases [J]. J Gastroenterol, 2000; 35: 112－119.

[6] 张 玲，宋晓英，刘 杞. 肝再生增强因子在抗－Thy1.1 肾炎大鼠肾组织中的表达及变化[J]. 中华肾脏病杂志, 2004; 20(2): 136－137.

[7] Danner S, Belasco JG. T7 phage display: a novel genetic selection system for cloning RNA－binding proteins from cDNA libraries [J]. Proc Natl Acad USA, 2001; 98(23): 12954－12959.

[8] Petra W, Lechner M, Merschak P, et al. Molecular cloning of a novel lipocalin－1 interacting human cell membrane receptor using phage display [J]. J Biol Chem, 2001; 276(23): 20206－20212.

[9] 沈倍奋，主编. 分子文库[M]. 第 1 版，北京：科学出版社, 2001; 2.

[10] Santi E, Capone S, Mennuni C, et al. Bacteriophage lamda display of complex cDNA libraries: a new approach to functional genomics [J]. J Mol Biol, 2000; 296: 497－506.