维普资讯 http://www.cqvip.com

88-90

第22卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.22 No.1
1997 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1997

肿瘤，基因，差异显示技术

差异显示技术及其在人类肿瘤相关基因研究中的应用

第二临床学院 消化内科 沈 薇 综述 沈鼎明 审校

中图分类号 Q781 R730.23

肿瘤是多种基因(癌基因和抑癌基因)调控异常的综合结果。分离、鉴定这些基因对于理解肿瘤发生发展的分子生物学基础具有非常重要的意义。多年来，递减式杂交(Subtractive hybridization)是主要依赖的方法。虽然已分离了一些重要的肿瘤相关基因，由于其每次只能发现相关细胞株系中一种基因的表达异常，以及繁琐耗时等问题，使它的应用受到极大的限制[1,2,3]。

Liang和Pardee于1992年提出，在理论上每个细胞仅有15%的基因表达，大约有15000种mRNA(信使核糖核酸)，这些表达的基因决定生物的发育和分化过程。当肿瘤形成，无论是单基因突变或多基因异常，均有基因表达的改变。而每一个mRNA分子可被逆转录并通过聚合酶链反应(PCR)扩增。基于这个假设，他们创建了用随机引物来扩增克隆表达差异的mRNA技术(mRNA Differential Display)，简称差异显示技术(Differential Display)[1,4,5]。

1 差异显示技术[1,4,5]

1.1 引物设置

每一对引物均有一定的概率分离一定数量的互补脱氧核糖核酸(cDNA)靶序列。下游引物为5′－T_{12}MN(5′TTTTTTTTTTTMN)，T_{12}固定于mRNA 3′末端的聚腺苷酸(Poly A tail)，2个碱基MN(M代表G、A、C，N可以是任何一种核苷酸)具有十二种组合形式，将总cDNA分为亚片段以表示相应的mRNA种类。上游引物由寡核苷酸10聚体构成，为随机的碱基序列，能从聚腺苷酸端退火于cDNA的任意位置，从而扩增得到不同大小的PCR产物(100－500bp)。一对引物大约可产生50—100个cDNA片段。

1.2 RNA逆转录合成cDNA

采用一步RNA抽提法(Current Protocols in Moleculor Biology Supplement 14 4.2.4)从细胞或组织中提取总RNA，用无RNA酶的DNA酶消化去除RNA标本中微量污染的脱氧核糖核酸(DNA)。

在20μl的逆转录反应体系中含0.2μg RNA，2.5μM的5′－T_{11}MN引物，20μM的dNTP和300单位MMLV逆转录酶。35℃反应60min，95℃孵育5min中止反应。合成的cDNA贮存于－70℃。

1.3 mRNA的差异显示

以10ng cDNA作为模板，加入0.5μM上游引物，2.5μM下游引物，2μMdNTP，0.5μM[α－^{35}s]dATP和1个单位Tag DNA聚合酶。94℃变性30s，40℃退火1min，72℃延伸30s，重复40个循环，再72℃保持5min。用6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离PCR产物，放射自显影展示表达差异的mRNAs(即cDNAs)。

1.4 cDNA的再扩增、克隆及DNA序列分析

将相应于放射自显影位置，具有意义的聚丙烯酰胺凝胶条带切下后，放入100μl双蒸水中室温孵育10min，加热至100℃15min。洗脱的cDNA用相应的引物对，同样的PCR反应条件重新扩增，然后克隆于质粒载体(PCRⅡ)，转染细胞，酶切分析以及阳性插入质粒DNA的核酸序列分析。获得的cDNA克隆可作为探针用于Northern杂交印证差异表达的基因或直接用于cDNA文库的筛选。

2 差异显示技术的应用

理论计算与实验结果证实，差异显示技术几乎可以展示一个细胞全部基因的表达形式，并能

维普资讯 http://www.cqvip.com

同时比较分析不同种细胞/组织或同种细胞在不同条件下表达差异的基因，即可以同时寻找两类基因，如癌基因和抑癌基因(图1)[1-4]。因此，在人类肿瘤相关基因的研究中已成为一种有效的重要方法。

Liang等首先应用差异显示技术筛选乳腺癌的相关基因。80对引物逆转录扩增展示正常上皮细胞和乳腺癌细胞的mRNAs，多数区带是相同的，约1%的cDNAs表达差异，为可能的候选肿瘤相关基因[6]。继之Sager等对比分析了来自同一病人的二个细胞株，发现一个抑癌基因α－6－integrin[7]。

Salesiotis等通过差异显示比较胃癌细胞株(RF_1)和转移性胃癌细胞株(RF_{48})，获得5个阳性cDNA克隆，其中OSCP(Dligomycin sensitivity conferral protein)参与能量代谢，编码线粒体ATP合成酶复合体的亚单位，在转移性胃癌细胞株中高表达[8]。

在肝癌相关基因的研究中，Nasim报道，从人肝癌组织中获得一个癌基因integrin alpha 6mRNA，该基因在50%的人肝癌组织标本中过度表达，结合临床资料分析，integrin alpha 6 mRNA多出现于Edmondson和Steiner分级差的肝癌患者，提示该基因可能是一个预后不良的监测指标[9]。而另一名学者Wu则从正常肝组织中分离出一个基因MPL(mitochondrial proteoplipid)，

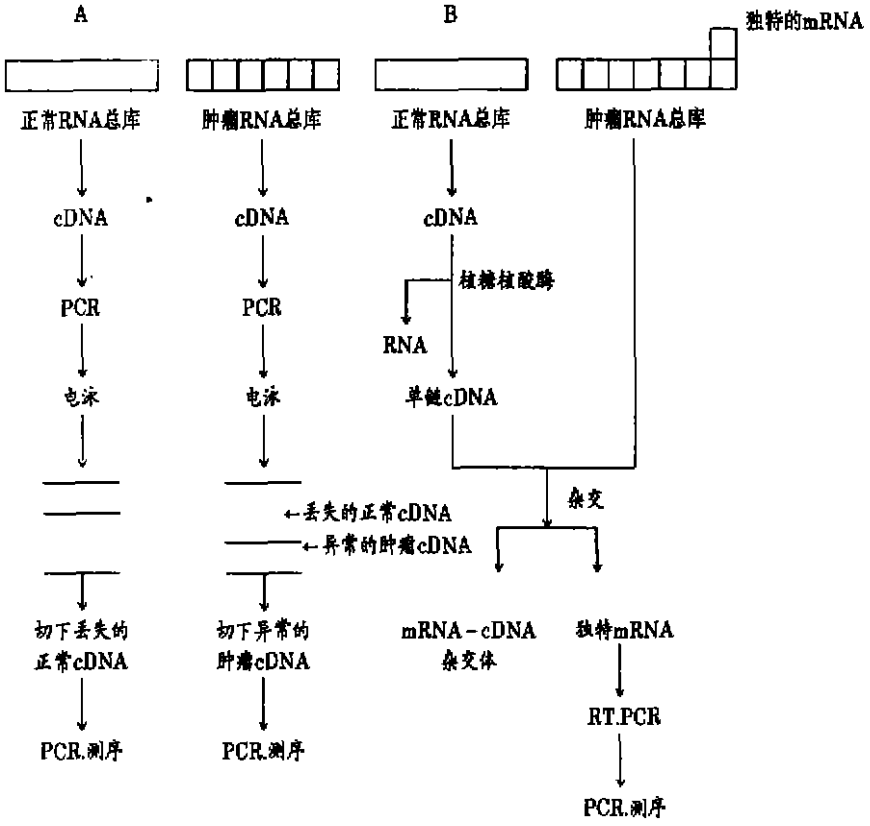


图1 差异显示技术(A)与递增式杂交(B)的简易图示

差异显示可以同时展示可能的抑癌基因(丢失的正常cDNA片段)和癌基因(异常的肿瘤cDNA)。递减式杂交只能找出肿瘤独特的mRNA，而对丢失的正常mRNA信息不能同时获得。尚若要了解正常细胞与肿瘤细胞之间的mRNA的差异表达，必须复杂上述步骤，反转录肿瘤RNA为cDNA，再与正常RNA杂交反应作分析比较。

维普资讯 http://www.cqvip.com

DNA和氨基酸序列分析显示与中心线粒体脂蛋白的羧基端氨基酸有73%的同源性，由于在肝癌细胞株Hep3B中低表达，被认为是可能的抑癌基因。[10]

另外，在卵巢癌，前列腺癌，癌变与细胞凋亡等方面的研究也相继有许多报道[11-13]。

3 差异显示技术的评价

差异显示技术是研究真核细胞相关株系分化过程，或因受感染及外来刺激等情况下基因表达改变的一种有效手段。与传统的递减式杂交相比(参见图)，该方法快速，能在短期内得到cDNA克隆，使原来2个月的工作缩短至1周左右;灵敏，比递减式杂交灵敏50倍，而且能同时证明和分离不同种细胞基因表达的改变[1]。该技术已成为众多前沿研究项目包括癌变、病毒感染，基因治疗，爱滋病防治，衰老机理，人类基因组研究等多种领域所采用的方法。

但是，假阳性的问题在应用中应该引起高度重视(即杂交实验印证表达差异的cDNA克隆，往往得不到预期的杂交信号)。其产生的可能原因有：RNA标本中有微量DNA的污染，区带压缩造成人为的假象，小分子(300bp)cDNA片段常靠近mRNA 3′末端不翻译的区域，被测标本中相应mRNA的含量甚微，低于检测范围等。通过重复实验或双份样品展示差异表达的cDNA片段，用非变性聚丙烯酰胺凝胶代替测序凝胶作电泳分离，克隆前先进行亲和捕捉筛选预定的有意义的cDNA片段，延长随机引物，高温低电压长胶缓慢电泳(Beckman会议资料)可减少假阳性的出现[4,5,15,16]。

综上所述，差异显示技术是90年代发展起来的PCR介导的分离基因表达异常的新方法，在分子生物学领域具有广泛的应用前景，在实践中，该技术将得到不断的改进与完善。

参考文献

1. Liang P, et al. Science 1992; 257(14):967
2. Steeg PS, et al. J. Natl. Cancer Inst 1988;80:200
3. Basset P, et al. Nature (hond) 1990;348:699
4. Liang P, et al. Nucleic Acids Res. 1993;21(14):3269
5. Bauer D, et al. Nucleie Acids Res. 1993; 21 (18):4272
6. Liang P, et al. Cancer Res. 1992;52(15);6966
7. Sager R, et al. FASEB J. 1993;7:964
8. Salesiotis AN, et al. Cancer Letters 1995;91:47
9. Begum NA, et al. Hepatology 1995;22(5):1447
10. Wu GS, et al. Life Sciences 1995;57(11):1077
11. Samuel CM,et al. Gynecologic Oncology 1994;52: 247
12, Leen JB, et al. The Prostate 1995;26:213
13. Sun Y, et al. Cancer Res. 1994;54(1):1139
14. Aiello LP, et al. Pcoc. Natl. Acad Sei USA 1994;91:6231
15. Lauren S, et al. Nucleic Acids Res. 1995; 23(22):4738
16. Li FS, et al. Nucleic Acids Res. 1994;22(9):1764

(收稿日期 1996－06－17)