

鼻咽癌组织 cDNA 文库的构建及抗原基因的筛选

舒 峻 李官成* 何小鹏

(中南大学湘雅医学院肿瘤研究所免疫生物室,长沙 410078)

摘 要 构建人鼻咽癌组织 cDNA 文库,以 SEREX 方法从 cDNA 文库中筛选鼻咽癌抗原基因。采用确诊鼻咽癌患者新鲜活检癌组织构建 cDNA 文库,测定原始文库滴度,进行蓝白筛选以确定文库的重组率。以建库组织来源患者的自身血清,采用“一对一”的血清学方法筛选所构建的 cDNA 文库,阳性克隆经 PCR 检测鉴定后进行序列分析。经测定原始文库滴度为 7.28×10^6 pfu/mL,含 3.64×10^6 个重组子,重组率为 94%,扩增文库滴度为 3.8×10^9 pfu/mL, cDNA 插入片段大小在 0.5~3.0kb 之间。文库经三轮血清学筛选共获得 23 个阳性克隆,分别代表了 16 个独立的 cDNA 插入片段(抗原基因)。其中 10 个与已知基因高度同源,另外 6 个基因与 GenBank 中已知基因的部分同源,其中有 3 个是新基因。利用 SMART 技术构建了高质量的人鼻咽癌组织 cDNA 表达文库,有利于以 cDNA 文库为基础的进一步的实验研究。应用 SEREX 技术初步筛选鼻咽癌组织 cDNA 文库,共得到 16 个鼻咽癌相关抗原基因,其中有 3 个是新基因,可能为鼻咽癌的免疫学研究提供新的研究分子。

关键词 鼻咽癌, cDNA 文库, SEREX, 抗原基因

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)01-0054-05

鼻咽癌是一种上皮源性的恶性肿瘤,病理类型多为低分化鳞癌,恶性程度高、转移早,出现临床症状时多已至中晚期,且治疗后复发率高,5 年生存率始终徘徊于 50%~60%。近年来,肿瘤免疫治疗研究已成为肿瘤研究领域的热点,其在肿瘤综合治疗中的地位越来越重要。然而,无论是肿瘤主动免疫治疗还是被动免疫治疗,前提是必须首先获得肿瘤抗原。近几年来,人们采用“重组 cDNA 表达文库的血清学分析”(Serological analysis of recombinant cDNA expression library, SEREX)技术筛选及鉴定肿瘤抗原,极大地推动了分离肿瘤抗原的速度。迄今为止,已有多个研究机构用构建和筛选 cDNA 文库的方法克隆了多种类型肿瘤的抗原基因和其它相关基因^[1,2]。然而,到目前为止,关于鼻咽癌抗原的筛选及鉴定研究工作国内外尚未见报道。本文采用 SEREX 技术,从构建的人鼻咽癌原发组织 cDNA 文库中筛选鉴定鼻咽癌及其相关的肿瘤抗原,可能为鼻咽癌疫苗的研制提供候选抗原或新的免疫学研究分子。

1 材料和方法

1.1 材料

总 RNA 抽提试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司。

SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒购自 Clontech 公司。Packagene Lambda DNA Packaging System 购自 promega 公司。硝酸纤维素膜购自浙江台州四甲生化塑料制品厂。羊抗人 IgG-HRP 为武汉博士德公司产品。DAB 显色剂购自北京华美公司。 λ TriplEx2 插入子筛选引物由大连宝生物公司合成,5'端引物序列为 5'-CTCGGAAGCGCGCCATTGTGTTGGT-3',3'端引物序列为 5'-ATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGCC-3'。成人鼻咽癌组织与外周血标本取自湖南省肿瘤医院(经患者同意),患者为门诊初诊病人,组织经病理检查确诊为低分化鳞癌。

1.2 鼻咽癌组织总 RNA 的抽提与纯化

取一例新鲜鼻咽癌组织,按照 TRIzolTM试剂操作说明提取总 RNA,用 DNase-I 消化总 RNA 中的痕量 DNA,提取的总 RNA 经测定 A_{260} 与 A_{280} 值及 1% 琼脂糖凝胶电泳以确定其纯度及浓度。

1.3 cDNA 文库的构建

按 SMARTTM cDNA 文库构建试剂盒说明书完成,取 1 μ g 鼻咽癌组织总 RNA 为模板,以 SMART IV 寡核苷酸和 CDS III/3'-PCR 引物,PowerScript 逆转录酶逆转录成 cDNA 第一链,LD-PCR(Long-distance PCR)扩增双链 cDNA。双链 cDNA 以 *Sfi* I 限制性内切酶

酶切,然后经 CHROMA SPIN-400 柱分级分离,收集符合大小($>0.4\text{kb}$)要求的 cDNA 片段。将酶切后的双链 cDNA 按一定比例与 $\lambda\text{TriplEx2}$ 经 Sfi IA 和 B 酶切)载体连接。用 Packagene Lambda DNA Packaging System 包装连接产物为噬菌体颗粒。用噬菌体颗粒转染宿主菌 XL1-Blue,与顶层琼脂混匀后铺平板,根据噬菌斑数计算文库滴度,同时进行蓝白筛选以检测文库的重组率。

1.4 cDNA 文库的扩增和鉴定

按照原始文库的滴度,继续感染宿主菌以扩增文库,同时,铺平板检测扩增文库滴度,并从中随机挑取噬菌斑,进行 PCR 以扩增插入片段。PCR 反应程序为:95℃ 5min,95℃ 15s,65℃ 5min,35 个循环,68℃ 保温 8min。反应产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 cDNA 文库的筛选

1.5.1 大肠杆菌裂解物预吸收血清:用 TBST(含 0.5% Tween-20 的 TBS)缓冲液 1:10 稀释用于筛选的建库组织来源患者自体血清,于每毫升稀释的血清中加入 0.5mL 大肠杆菌裂解液,置室温缓慢摇动温育 4h。处理后的血清加入 0.05% NaN_3 保存备用。

1.5.2 鼻咽癌组织 cDNA 文库的血清筛选:以已处理的鼻咽癌患者自身血清,采用 SEREX 技术对 cDNA 文库进行“一对一”筛选,第一轮筛选具体方法参照文献 [3,4,5] 略有改进。简言之,为将噬菌体转染大肠杆菌 XL1-Blue,铺于 150mm LB/ MgSO_4 琼脂平板上,以经 IPTG 处理的硝酸纤维素膜诱导蛋白质表达。硝酸纤维素膜以含 5% 脱脂奶的 TBST 缓冲液封闭,再与 1:100 稀释的经预吸收处理的血清室温共育,洗膜后与 1:5000 稀释的过氧化物酶联羊抗人 IgG 室温缓慢摇动 1.5~2 h,洗膜后用 DAB 进行显色反应,阳性克隆挑出保存于适量噬菌体稀释液中。第二轮筛选前先测定第一轮筛选所获阳性克隆的滴度,按照其滴度转染宿主菌,进行第二轮的筛选,方法基本同第一轮筛选。不同之处是,第二轮筛选的目的主要是排除假阳性。所获阳性克隆经第三轮筛选,确保其为单克隆。

1.6 阳性克隆 cDNA 片段的扩增

以阳性克隆噬菌体稀释液为模板,以 $\lambda\text{TriplEx2}$ 插入子筛选引物经 LD-PCR 扩增 cDNA 插入片段。PCR 反应参数为:95℃ 预变性 5min,95℃ 变性 30s,68℃ 复性延伸 4min,循环 35 次后,68℃ 保温 8min。

1.7 核苷酸序列测定及其生物信息学分析

阳性克隆 PCR 产物经纯化后,交测序公司进行测序。将获得的 cDNA 序列用序列分析软件 BLAST 与 GenBank 数据库中已知基因进行同源性比较。

2 结果

2.1 鼻咽癌组织 cDNA 文库的构建

经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,合成的双链 cDNA 片段大小在 0.3~4.0kb 之间(Fig. 1)。经测定原始文库滴度为 7.28×10^6 pfu/mL,含 3.64×10^6 个重组子,重组率为 94%。原始文库经扩增后,测定文库滴度为 3.8×10^9 pfu/mL。随机挑取 40 个克隆经 PCR 鉴定 cDNA 插入片段大小,插入 cDNA 大小在 0.5~3.0kb 之间(Fig. 2)。

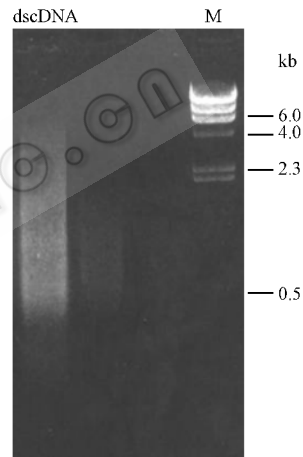


图 1 鼻咽癌组织双链 cDNA 1% 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 ds-cDNA of nasopharyngeal carcinoma tissue was analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel
M λ Hind III marker

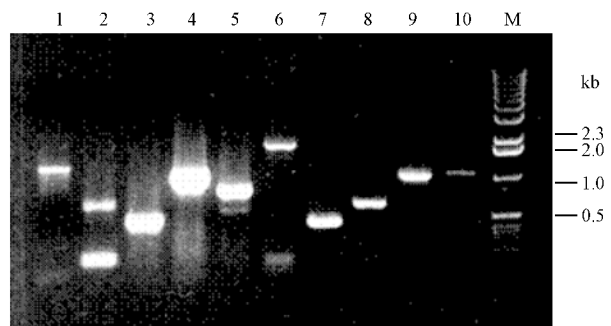


图 2 随机克隆 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

Fig. 2 PCR products of random clones from cDNA amplified library was analyzed by electrophoresis on 1% agarose gel
1~10 PCR products of random clones
M 1kb DNA ladder

2.2 cDNA 文库的血清筛选

采用建库来源的病人自身血清“一对一”进行筛选。第一轮共对 10⁷ 个重组噬菌体进行筛选,共筛出 132 个阳性反应克隆。经过第二轮、第三轮筛选,共获得 23 个阳性反应克隆。

2.3 阳性克隆的核苷酸序列测定及同源性分析

测定阳性克隆 cDNA 插入片段的核苷酸序列,采用序列分析软件 BLAST 与 NCBI 的 GenBank 数据库中已知基因进行同源性比较、分析。结果显示 23

个阳性克隆分别代表了 16 个独立的 cDNA 插入片段,分别命名为 NPC-A-1 ~ 16。这 16 个抗原基因中有 10 个与已知的基因有较高的同源性,相关的描述见表 1(Table1)。而另外 6 个基因在 GenBank 序列数据库分析中与已知基因部分同源,其中 NPC-A-5、NPC-A-6、NPC-A-7 是新的基因,已对此 3 个基因申请了 GenBank Accession No., 分别为 :AY320401、AY320414、AY320402。

表 1 SEREX 筛选文库所得阳性基因及其相关生物学信息

Table 1 Genes identified by SEREX analysis of human NPC tissue cDNA library					
Name	Size of inserted cDNA(bp)	Identity	GenBank No.	Chr. location	Product, functions, features, expression pattern
NPC-A-1	384bp	RPL31	NM-000993	2q11.2	Ribosomal proteinL31 , a component of the 60S subunit. Higher levels expressed in familial adenomatous polyps.
NPC-A-2	523bp	S100 A2	NM-005978	1q21	S100 calcium-binding protein A2 , a member of the S100 family , ubiquitously expressed , involved in cell cycle progression and differentiation , have a tumor suppressor function .
NPC-A-3	553bp	H2AFZ	NM-002106	4q24	H2A histone family , member Z. A basic nuclear proteins that are responsible for the nucleosome structure of the chromosomal fiber in eukaryotes ,is required for embryonic development.
NPC-A-4	462bp	MT2A	BC007034	16q13	Metallothionein 2A ,ubiquitously expressed in multiple cancers.
NPC-A-5	383bp	Novel gene	AY320401		Unknown
NPC-A-6	620bp	Novel gene	AY320414		Unknown
NPC-A-7	372bp	Novel gene	AY320402		Unknown
NPC-A-8	344bp	KIAA1630	NM-018706	10p14	KIAA1630 protein , lies within an 82 kb intron of the regulator of nonsense transcripts 2(RENT2) gene and is transcribed in the opposite direction from it. The protein has some similarity to dehydrogenase and transketolase protein domains.
NPC-A-9	150bp	RPS5	NM-001009	19q13.4	Ribosomal protein S5 , belongs to the S7P family of ribosomal proteins. It is located in the cytoplasm. This gene expresses variably in colorectal cancers
NPC-A-10	600bp	KIAA0672	NM-014859	17p12	KIAA0672 gene product , function unknown.
NPC-A-11	406bp	CTB-95A14	AC005081	chr.7	Unknown
NPC-A-12	1465bp	HS333H23	AL022326	22q12.1-12.3	Unknown
NPC-A-13	589bp	HSBP1	NM-001537	16q23.3	Heat shock factor binding protein 1 , overexpression of HSBP1 in mammalian cells , represses the transactivation activity of HSF1 , as a negative regulator of heat shock response.
NPC-A-14	524bp	RPL6	NM-000970	12q24.1	Ribosomal protein L6 , belongs to the L6E family of ribosomal proteins. The protein can bind specifically to domain C of the tax-responsive enhancer element of human T-cell leukemia virus type1 , and it has been suggested that the protein may participate in tax-mediated transactivation of transcription.
NPC-A-15	415bp	NCL	NM-005381	2q12-qter	Nucleolin , a eukaryotic nucleolar phosphoprotein , is involved in the synthesis and maturation of ribosomes.
NPC-A-16	573bp	LOC254948	NG-002468	15q25.1	Ribosomal protein L9 pseudogene , function unpublished.

3 讨论

构建 cDNA 文库并从中随机挑选克隆进行序列测定,以获得大量正在表达的遗传信息,不仅可以检测到许多已知基因,还可以从文库中获取一些新的未知基因。cDNA 文库的质量主要反映在文库的代表性和重组 cDNA 片段的序列完整性两个方面。文库的代表性可用库容量来衡量。根据以往文献报道

用抗体或血清筛选 cDNA 文库,所构建的 cDNA 文库至少需含 2 × 10⁶ 以上的重组子。本研究采用 SMART 技术成功构建的人鼻咽癌组织 cDNA 文库,原始文库含有 3.64 × 10⁶ 个重组克隆,重组率达到 94% 以上,文库扩增后滴度达到 3.8 × 10⁹ pfu/mL,完全满足了对 cDNA 文库库容的基本要求。

重组 cDNA 片段的完整性是反映 cDNA 文库质量的另一重要因素。本研究采用 SMART(Switching
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals. im. ac. cn

Mechanism at 5' end of RNA Transcript) 技术,经 LD-PCR(Long-distance PCR)合成双链 cDNA。其主要优点在于:首先,提高了 cDNA 文库中所含全长 cDNA 的比例;其次,由于 LD-PCR 在合成 cDNA 中体现出来的优越性,只需极其少量的 mRNA (25 ng)或总 RNA(50 ng)就能构建 cDNA 文库,这对于取材非常困难的鼻咽癌组织意义重大;第三,合成的双链 cDNA 经 *Sfi* I(IA 和 IB)酶切,连接到 λ TriplEx2 载体的左右臂,从而实现 cDNA 的简便、快速的定向克隆。

随着分子生物学技术的发展,特别是 cDNA 表达文库技术的应用,Pfreundschuh 小组于 1995 年首先建立和使用了 SEREX 技术,从而开创了血清学检测肿瘤抗原的新时代^[3]。迄今为止,已有超过 2000 种肿瘤抗原经 SEREX 技术识别并鉴定^[6]。但 SEREX 技术用于鼻咽癌抗原的研究,国内外还未见报道。

SEREX 将分子克隆技术和利用患者血清对肿瘤细胞的自体分型技术融为一体,因而不仅可以检测抗体反应,而且能在抗原与患者自体血清反应的基础上直接从分子水平确定具有免疫原性的肿瘤蛋白质(抗原)。SEREX 方法有如下一些特点:①用新鲜瘤组织构建 cDNA 文库,避免了体外培养肿瘤细胞以及因过度培养细胞导致的抗原基因缺失或不表达;②将病人血清稀释后进行筛选,使得免疫分析仅限于那些可以诱导强免疫反应(在同源宿主体内)的抗原;③cDNA 表达克隆的血清学分析涵盖了由肿瘤基因编码的大多数蛋白质;④运用多特异性血清抗体检测溶解在噬菌斑中高度富集的抗原蛋白。因为肿瘤抗原的 cDNA 序列可以直接测定,所以也可推导出抗原的氨基酸序列。

应用 SEREX 技术筛选肿瘤抗原,选用何种来源的抗血清进行筛选是非常重要的。多数文献报道都是选用多个患者的混合血清,这样虽然增加了筛选到阳性克隆的可能,但同时也使假阳性率升高了。因此我们选用鼻咽癌组织供体自身血清,以“一对一”的方式筛选所构建的人鼻咽癌组织 cDNA 文库,这样可以避免同种异体间的交叉反应,也可能在一定程度上提高抗体识别的特异性。

在本研究中,对所构建的人鼻咽癌组织 cDNA 文库,经过反复筛选,共得到 23 个阳性克隆,经测序分析并在 GenBank 中进行同源性比较,这 23 个阳性克隆分别代表了 16 个独立的 cDNA 插入片段(抗原

基因)。其中有 10 个基因与 GenBank 中已知基因有较高同源性,如核蛋白 L31(RPL31)、S100 钙连接蛋白 A2(S100A2)、金属硫因 2A 等。既往研究表明,核蛋白 L31 高表达于结肠癌,与生长调节机制的障碍有关,在肿瘤的增殖与成瘤中起一定的作用^[7];S100A2 蛋白在食道鳞状细胞癌高表达,可能作为一个候选抑癌基因起作用^[8];金属硫因 2A 蛋白广泛表达于不同类型的肿瘤,与肿瘤的增殖、分化及凋亡密切相关^[9,10],而在鼻咽癌组织中还是首次分离出金属硫因 2A 基因。已有的研究报道表明,这些基因与肿瘤的形成、发展与预后关系密切。此外还有 6 个基因,与 GenBank 中已知基因的同源性均不高,而且其中 NPC-A-5、NPC-A-6、NPC-A-7 根据现有的资料推测是新的基因(已申请了 GenBank Accession No.)。它们与鼻咽癌有何相关性,在鼻咽癌或其它肿瘤的发生、发展中起着什么样的作用,都有待于进一步的研究揭示。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Jager D, Stockert E, Gure AO *et al.* Identification of a tissue-specific putative transcription factor in breast tissue by serological screening of a breast cancer library. *Cancer Res*, 2001 **61**:2055-2061
- [2] Obata Y, Takahashi T, Sakamoto J *et al.* SEREX analysis of gastric cancer antigens. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2000 **46**(suppl):s37-42
- [3] Sahin U, Tureci O, Stenner F *et al.* Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995 **92**(25):11810-11813
- [4] Gure AO, Altorki NK, Chen YT *et al.* Human lung cancer antigens recognized by autologous antibodies:Definition of a novel cDNA derived from the tumor suppressor gene locus on chromosome 3p21.3. *Cancer Res*, 1998 **58**:1034-1041
- [5] Chen YT, Gure AO, Old LJ *et al.* Identification of multiple cancer/testis antigens by allogenic antibody screening of a melanoma cell line library. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998 **95**:6919-6923
- [6] Preuss KD, Zwick C, Pfreundschuh M *et al.* Analysis of the B-cell repertoire against antigens expressed by human neoplasms. *Immunol Rev*, 2002 **188**(1):43-50
- [7] Chester KA, Robson L, Begent RH *et al.* Identification of a human ribosomal protein mRNA with increased expression in colorectal tumours. *Biochim Biophys Acta*, 1989 **1009**(3):297-300
- [8] Kyriazanos ID, Tachibana M, Dhar DK *et al.* Expression and prognostic significance of S100A2 protein in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol*, 2002 **11**(Suppl 3):S03-S10
- [9] Jin R, Chow VT, Tan PH *et al.* Metallothionein 2A expression is associated with cell proliferation in breast cancer. *Carcinogenesis*, 2002 **23**(1):81-86
- [10] Cui Y, Wang J, Zhang X *et al.* ECRG2 a novel candidate of tumor suppressor gene in the esophageal carcinoma, interacts directly with metallothionein 2A and links to apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003 **302**(4):904-915

Construction of cDNA Library from NPC Tissue and Screening of Antigenic Genes

SHU Jun LI Guan-Cheng* HE Xiao-Juan

(Cancer Research Institute , XiangYa School of Medicine , Central South University , Changsha 410078 , China)

Abstract To obtain the NPC-associated antigens , a powerful new method , SEREX (serological identification of antigen by recombinant cDNA expression library) , was used for identifying the antigens eliciting humoral immune response. Before performing serological analysis , a high quality cDNA library derived from human nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissue was constructed. The primary library consisted of 3.64×10^6 recombinants and the recombinant rate was 94% . For better preserving the cDNA library , it was amplified. As a result , the titer of the amplified cDNA library was 3.8×10^9 pfu/mL. With SEREX method , immunoscreening for the detection of reactive clones in the human NPC tissue cDNA library was performed with autologous serum. As a result , 23 positive clones encoding antigenic genes were obtained after immunoscreening , and the nucleotide sequences of cDNA inserts were determined and analyzed with BLAST software in GenBank. Results showed that the 23 reactive clones were derived from 16 different genes. 10 of 16 genes had high homologous to the genes known in GenBank , such as RPL31、S100 A2、MT2A etc. However , there were also 6 genes with low homology to the genes known in GenBank. Furthermore , 3 of 6 genes may be novel genes. The associations of these genes to NPC and the roles that they played in the occurrence and development of NPC should be revealed by further research.

Key words nasopharyngeal carcinoma , cDNA library , SEREX , antigenic gene

Received : 06-27-2003

* Corresponding author. Tel 86-731-4805445 ; Fax 86-731-2355042 ; E-mail: lishun@public.cs.hn.cn <http://journals.im.ac.cn>