

鼻咽癌体外传代细胞株 SUNE 中 EBV-LMP₁ 全基因的扩增^①

陈宜芳^② 郭辉玉¹ 汪慧民² 李满枝²

(中山医科大学 1 微生物教研室; 广州, 510089 2 肿瘤研究所)

摘要 用长片段高保真度 PCR 扩增系统 (expandTM high fidelity PCR system) 从鼻咽癌 (NPC) 体外传代细胞株 SUNE 中扩增出 EB 病毒 (EBV) 潜伏膜蛋白 (LMP₁) 全基因, 经凝胶电泳分析和 DNA 斑点杂交进行鉴定。扩增片段长度为 3.43 kb, 相当于 B₉₅-8 细胞 EBV 基因序列位置为 170 033~166 608 nt, 包括 LMP₁ 基因的上游启动子、增强子序列、LMP₁ 编码序列的 3 个外显子、两个内含子及下游 poly A 信号序列。LMP₁ 全基因的扩增对于深入研究 LMP₁ 基因的结构与功能以及 LMP₁ 在 NPC 发生发展中的作用机制具有十分重要的价值。

主题词 鼻咽肿瘤 遗传学; 疱疹病毒 4 型, 人 遗传学; 基因, 病毒 遗传学; 病毒基质蛋白质类 生物合成
中图分类号 R 373.11; 342.82

鼻咽癌 (NPC) 与 EB 病毒 (EBV) 密切相关, 各种类型的 NPC 组织均存在 EBV DNA。在 EBV 基因中, 与鼻咽上皮细胞转化及肿瘤形成最为相关的为潜伏膜蛋白 (LMP₁) 基因^[1], 它能在体外转化啮齿类成纤维细胞^[2]; 能阻止角化上皮细胞的角质分化^[3], 改变角质细胞表型^[4], 故 LMP₁ 基因已被认为是病毒的一种癌基因。对 EBV-LMP₁ 基因结构与功能的研究已成为 NPC 病因学研究的热点, 如何简便、准确地从 NPC 组织细胞中获取完整的 LMP₁ 基因, 无疑是研究工作的前提。以往对 LMP₁ 基因的获取主要是靠建立 EBV 基因组文库或 cDNA 文库^[1,5,6], 但存在着工作量大、筛选繁琐等问题。我们借助新近发展的长片段高保真度 PCR 系统, 从 NPC 体外传代细胞株 SUNE 中简便、快速地扩增出 LMP₁ 全基因, 为研究 LMP₁ 基因的结构与功能以及 LMP₁ 在 NPC 发生中的作用提供了非常有价值的材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SUNE 细胞, 由中山医科大学肿瘤研究所建立的低分化 NPC 体外传代细胞株。B₉₅-8 细胞, EBV 感染的绒猴 B 淋巴细胞系, 含完整的 EBV 基因序列, 由中山医科大学肿瘤研究所惠赠。293 细胞, 腺病毒永生化 (immortalize) 的人胚肾上皮细胞,

由中国预防医学科学院病毒研究所惠赠。

1.1.2 长片段 DNA PCR 扩增试剂盒 ExpandTM high fidelity PCR system, 为 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.1.3 地高辛 DNA 标记与检测试剂盒 Boehringer Mannheim 公司产品。

1.1.4 pHC79-Dhet 质粒 为 EBV DNA *EcoRI* 酶切的 Dhet 片段插入到 pHC79 载体的 *EcoRI* 位点, 由汕头大学生物系惠赠。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及病毒复制的激活 SUNE 细胞置 10% 小牛血清 RPMI 1640 培养液常规贴壁培养; TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate) 激活: 细胞传代后 24 h, 吸弃原培养液, 换入含 30 μg/L TPA 的新鲜培养液, 继续培养 48 h。B₉₅-8 细胞悬浮培养于同上培养液中, 用同上浓度的 TPA 激活。

1.2.2 培养细胞中 EBV-LMP₁ 基因的 PCR 扩增 按常规方法抽提细胞 DNA 为模板, 紫外分光光度计测定 DNA 含量。

引物设计: 根据已公布的 B₉₅-8 细胞 EBV 基因序列^[7], 利用美国 National Biosciences 公司编制的 Oligo 引物分析软件电脑辅助设计。上游引物序列为 5' GCC TCg ATC CGC CAC CTC ATT CTG AAA TTC 3', 位置为 170 033~170 004 nt, 在靠近 5' 端改动一个碱基 (小写 g), 引入 1 个 *Bam* H 位点, 以

① 国家教委研究生基金资助课题; ② 第一作者, 1965 年出生, 女, 博士研究生

便后续克隆;下游引物序列 5' CGG CGG GGA TCC CGA TGG GTA CGA TGG CGG 3' 位置为 166 608 ~ 166 637 nt,扩增产物预计大小 3.43 kb 上述引物由加拿大 Genda Technology Corp合成。

PCR反应体积 50 μL,分两管于冰上加样,第 1 管为 25 μL 体积含 dNTP 200 mmol/L,引物 300 nmol/L,模板 DNA 0.5 μg,第 2 管为 25 μL Expand HF Buffer,含 PCR Enzyme Mix 2.6 U 将第 1 管于 94℃ 热变性 5 min,加入第 2 管内容物,开始三温循环,前 10 循环条件为 94℃ 40 s,59℃ 50 s,68℃ 2.5 min,从 11 循环开始,延伸时间改为每循环 1 次增加 10 s,继续完成 20 个循环。

1.2.3 LM_{P1} 基因探针的标记 将 pHC79-Dhet 质粒用 *Xho*I 酶切,低熔点琼脂糖切胶回收 1.94 kb 的片段为探针,用随机引物法按说明书进行地高辛标记。

1.2.4 PCR 产物的斑点杂交 将 PCR 产物做 1:10¹~1:10⁶ 稀释,各取 20 μL,95℃ 变性 10 min,速置冰浴,用 96 孔斑点杂交加样器吸印到 Hybond™ - N⁺ Nylon 膜上,按说明书进行烤膜、预杂交、杂交、洗膜和显色。

2 结果

2.1 SUNE 细胞 DNA PCR 扩增产物的凝胶电泳分析

以 SUNE 细胞 DNA 为模板进行 LM_{P1} 基因的 PCR 扩增,扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳,可见在 3.4 kb 位置有一特异性条带出现,符合预计大小,与阳性对照 B₉₅₋₈ 细胞 DNA 的扩增结果一致,阴性对照 293 细胞 DNA 未见扩增产物 (图 1)

2.2 PCR 扩增产物的核酸杂交

2.2.1 地高辛标记 LM_{P1} 基因探针的制备 图 2 为 pHC79-Dhet 质粒的酶切电泳结果,箭头所指为待回收的探针片段,该片段在 B₉₅₋₈ 细胞 EBV 基因组的位置为 167 487~169 423 nt,大小约 1.94 kb,含 LM_{P1} 的编码基因。

2.2.2 地高辛标记 LM_{P1} 基因探针的质量鉴定 标记探针的产量通过与试剂盒内的 Dig-labeled control DNA 比较显色强度来估算 将标记探针与 Dig-labeled control DNA 分别做 1:100~1:100 000 稀释,各取 1 μL 点加在尼龙膜上,烤膜、洗涤、显色 图 3 可见,LM_{P1} 探针在 1:50 000 稀释时的显色强度相当于 1:100 000 稀释的 Dig-labeled control DNA,已知后者浓度为 5 mg/L,因而标记探针的浓度应为 2.5 mg/L 探

针显色的灵敏度达 0.05 pg 水平。

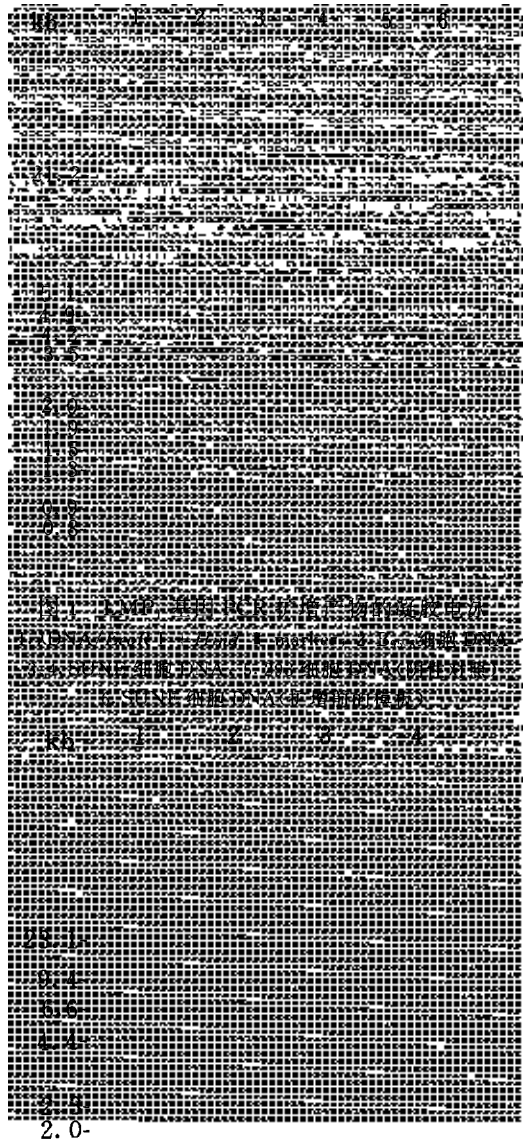


图 2 pHC79-Dhet 质粒酶切电泳

1. λDNA/*Hind* III marker, 2. pHC79-Dhet 质粒; 3. pHC79-Dhet/*Eco*RI; 4. pHC79-Dhet/*Xho*I

图 4 为 LM_{P1} 探针特异性检测 将 B₉₅₋₈ 细胞 DNA pHC79-Dhet 质粒 DNA 293 细胞 DNA 分别稀释为 0.5~50 mg/L,各取 20 μL 热变性后吸印到尼龙膜上,与 LM_{P1} 基因探针杂交,结果 LM_{P1} 探针与 B₉₅₋₈ 细胞 DNA pHC79-Dhet 质粒 DNA 均显示强杂交信号,而 293 细胞 DNA 不显色。



图 3 地高辛标记 LMP₁ 探针的特异性检测

A: Dig. labeled control DNA; B: Dig. labeled LMP₁ probe

添加 EBV-DNA 稀释液作为阳性对照

500ng/L 50ng/L 5ng/L 1ng/L

图 4 地高辛标记 LMP₁ 探针的特异性检测

A. B₉₅₋₈细胞 DNA, B. pHC79-Dhet质粒 DNA, C. 293 细胞 DNA

2.2.3 PCR 扩增产物的斑点杂交 PCR 产物经 1 : 10⁻¹ - 1 : 10⁻⁴ 稀释后,与 LMP₁ 探针进行斑点杂交,可见 SUNE 细胞 DNA 出现阳性斑点,与 B₉₅₋₈ 细胞 DNA 扩增产物一致,而阴性对照 293 细胞 DNA 不显色(图 5)。

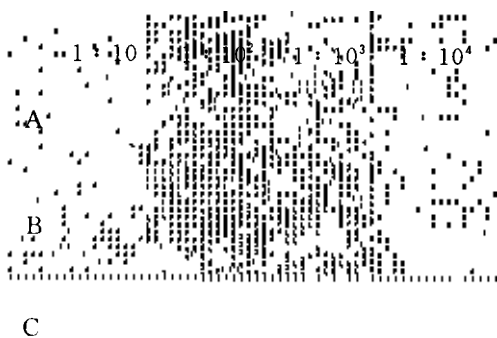


图 5 LMP₁ 基因 PCR 扩增产物的斑点杂交

B₉₅₋₈ 细胞 DNA, B. SUNE 细胞 DNA, C. 293 细胞 DNA

3 讨论

EBV 编码的 LMP₁ 是 NPC 组织中表达的唯一

与细胞转化有关的蛋白, LMP₁ 基因被认为是癌基因。文献^[1,5,6]已报道了来自中国上海 NPC 患者 Cao 株、台湾患者 NPC 活检组织及北非 NPC C₁₅ 株的 LMP₁ 基因序列,与原型株 B₉₅₋₈ 细胞 LMP₁ 基因相比,发现均有不同变异,似乎显示,变异越大, NPC 恶性程度越高^[8,9]。NPC 的发生具有明显的地区性, NPC 的病理类型多种多样。有必要对不同地域、不同病理类型 NPC 的 LMP₁ 基因进行分析、比较。本文从广东患者 NPC 细胞株 SUNE 中用 PCR 技术扩增出 LMP₁ 全基因,片段长度为 3 425 bp,相当于 B₉₅₋₈ 细胞 EBV 序列位置 170 033~ 166 608 nt,包括 LMP₁ 基因的上游调控序列、LMP₁ 编码序列的 3 个外显子,两个内含子及下游 poly A 信号序列。扩增产物经凝胶电泳分析,符合预计大小;核酸杂交试验证明了 PCR 产物的特异性。

对于长片段 DNA 扩增,常规 PCR 条件往往难以扩增成功,本文选用新近发展的长片段高保真度 PCR 扩增系统^[10],该系统的扩增酶为 Taq DNA 聚合酶和 Pwo DNA 聚合酶混合物,后者具有更好的耐热性能和扩增效率,而且具有 3→5 外切活性(校对),用该系统扩增 LMP₁ 全基因,保证了扩增反应的高产量和真实性,从而为 LMP₁ 基因的研究提供丰富可靠的材料。我们已用 PCR 产物构建了重组质粒,重组质粒的酶切鉴定也进一步证实了 PCR 产物的特异性(另文报告)。重组质粒的建立将用于深入研究 LMP₁ 基因的序列变异及其在 NPC 发生、发展中的作用机制。

参 考 文 献

- 1 Hu LF, Eugene RZ, Fu C, *et al.* Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BN LF-1 gene (LMP₁) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J Gen Virol*, 1991, 72: 2399
- 2 Baichual V R, Sugden B. Transformation of Balb 3T3 cells by the BN LF-1 gene of Epstein-Barr virus. *Oncogene*, 1989, 2: 461
- 3 Dawson CW, Rickinson AB, Young LS, *et al.* Epstein-Barr virus latent membrane protein inhibits human epithelial cell differentiation. *Nature*, 1990, 344: 777
- 4 Fahraeus R, Rymo L, Rhim JS, *et al.* Morphological transformation of human keratinocytes expressing the LMP gene of Epstein-Barr virus.

- Nature, 1990, 345: 447
- 5 Chen ML, Chi-Neu T, Chih-Lung L, *et al.* Cloning and characterization of the latent membrane protein (LMP) of a specific Epstein-Barr virus variant derived from the nasopharyngeal carcinoma in the Taiwanese population. *Oncogene*, 1992, 7: 2131
 - 6 Gilligan K, Sato H, Rajadurai P, *et al.* Novel transcription from the Epstein-Barr virus terminal *EcoR* I fragment, DJhet, in a nasopharyngeal carcinoma. *J Virol*, 1990, 64: 4948
 - 7 Baer R, Barkier AT, Biggin MD. DNA sequence and expression of the B_{5,8} Epstein-Barr virus genome. *Nature*, 1984, 310(19): 207
 - 8 苏玲, 腾智平, 赵全壁. 高分化及低分化鼻咽癌细胞株中 Epstein-Barr 病毒潜伏感染膜蛋白 (LMP₁) 基因的原位杂交与克隆及序列分析. *病毒学报*, 1995, 11(2): 114
 - 9 William EM, Rachel HE, Dennis MW, *et al.* Sequence variation in the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1. *J Gen Virol*, 1994, 75: 2729
 - 10 Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage template. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 91: 2216

(1996-09-09收稿 1996-11-06修回)

AMPLIFICATION OF LATENT MEMBRANE PROTEIN GENE OF EPSTEIN-BARR VIRUS FROM NASOPHARYNGEAL CARCINOMA CELL LINE SUNE

Chen Yifang¹ Guo Huiyu¹ Wang Huimin² Li Manzhi²

(1 Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510089 2 Cancer Institute)

Latent membrane protein (LMP₁) gene of Epstein-Barr virus (EBV) was amplified from propagated nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell line SUNE by ExpandTM High Fidelity PCR System. PCR products were identified by agarose gel electrophoresis analysis and DNA dot blot hybridization. The length of the amplified fragment was 3.43 kb, corresponding to EBV gene coordinates 170 033 nt to 166 608 nt of B_{5,8} cell, containing LMP₁ gene promoter/enhancer region, the coding sequence (3 exons and 2 introns) and poly A signal. We believed that the amplification of entire LMP₁ gene was valuable to study further the structure and function of LMP₁ gene and its possible mechanism contributed to the occurrence and development of NPC.

Subject headings nasopharyngeal neoplasms/genetics; herpesvirus 4, human/genetics; genes, virus/genetics; viral matrix proteins/biosynthesis