

Construction of a T7 Phage Display cDNA Library from Lung Cancer of Smokers

Wen Xue¹, Li Zhong^{1,2*}, Xianjiang Kang¹, Rui Wang³

¹College of Life-Science, Hebei University, Baoding

²College of Osteopathic Medicine, Pomona, USA

³The Fourth Clinical Medical College of Hebei Medical University, Shijiazhuang

Email: xw568525@126.com, *lee_z@yahoo.com

Received: Jan. 13th, 2012; revised: Feb. 10th, 2012; accepted: Feb. 13th, 2012

Abstract: Objective: To screen tumor markers of smokers, the T7 phage display cDNA library from the lung cancer of smokers was constructed. **Methods:** The mRNA was isolated from total RNA extracted from the lung cancer of smokers by RNeasy Mini Kit, and was used to synthesize double strand (ds) cDNA by the reverse transcription. Then the directional EcoRI/HindIII linkers were ligated into the ends of ds cDNA and the ds cDNA was further digested with EcoRI and HindIII, which resulted in ds cDNA with EcoRI and HindIII ends. The digested ds cDNA fragments longer than 300 bp in length were fractionated by Mini Column, and then ligated into the T7 Select 10-3b vector with EcoRI and HindIII ends. After packaging in vitro, the T7 Select 10-3b vector was transformed into BLT5615 to construct the T7 phage display cDNA library. **Results:** Analysis showed that the library contained 1.35×10^6 clones and the titer of the applied library was 4.4×10^{10} pfu/ml. The PCR identification results of 100 clones picked at random showed that 97% clones were recombinant and 91% of recombinant clones contained cDNA fragments longer than 300 bp in length. **Conclusion:** A T7 phage display cDNA library from the lung cancer of smokers is successfully constructed.

Keywords: Lung Cancer; Phage Display; cDNA Library; Smokers

吸烟者肺癌组织 T7 噬菌体 cDNA 文库构建

薛 雯¹, 钟 理^{1,2*}, 康现江¹, 王 瑞³

¹河北大学生命科学学院, 保定

² College of Osteopathic Medicine, Pomona, USA

³河北医科大学第四医院, 石家庄

Email: xw568525@126.com, *lee_z@yahoo.com

收稿日期: 2012 年 1 月 13 日; 修回日期: 2012 年 2 月 10 日; 录用日期: 2012 年 2 月 13 日

摘 要: 目的: 为筛选吸烟人群中早期肺癌肿瘤标志物, 构建吸烟者肺癌组织 T7 噬菌体展示 cDNA 文库。 **方法:** 用 RNeasy Mini Kit 提取吸烟者肺癌组织总 RNA, 分离纯化 mRNA, 逆转录合成双链 cDNA, 经末端修饰、定向 EcoRI/HindIII 接头连接、接头消化, 使其两端分别带有 EcoRI 和 HindIII 粘性末端。用 Mini Column 分离 cDNA 片段, 收集 300 bp 以上的双链 cDNA, 与 T7Select 10-3b 载体连接, 体外包装后, 以 BLT5615 为受体菌得到吸烟者肺癌组织 T7 噬菌体展示 cDNA 文库。 **结果:** 经测定, 库容为 1.35×10^6 pfu, 扩增后文库滴度为 4.4×10^{10} pfu/ml。PCR 鉴定从原始文库中随机挑取的 100 个噬菌斑, 重组率为 97%, 重组体中 91% 的插入片段长度 >300 bp。 **结论:** 成功构建了吸烟者肺癌组织 T7 噬菌体 cDNA 文库, 为下一步筛选吸烟人群中早期肺癌肿瘤标志物奠定基础。

关键词: 肺癌; 噬菌体展示; cDNA 文库; 吸烟者

*通讯作者。

1. 引言

肺癌是严重危害人类生存和健康的恶性肿瘤之一, 全球每年死于肺癌的人数达 100 多万, 并且有明显上升趋势。大量系统的流行病学调查资料和科学实验证明, 肺癌与吸烟的关系最为密切^[1]。在吸烟诱导肺部恶变过程中, 细胞会产生新抗原及过度表达的抗原, 从而激发机体的免疫应答。在肺癌早期, 肿瘤抗原水平很低, 利用常规蛋白检测方法无法检测到时, 免疫系统就能监测到特异蛋白的存在, 引发免疫反应, 产生大量的抗体。因此, 可以通过检测血清中自身抗体含量来进行肺癌的早期诊断。噬菌体展示技术是一种将外源蛋白或多肽基因与噬菌体特定蛋白基因在其表面进行融合表达的新技术^[2]。利用这一技术将病人的异常基因融合表达为异常蛋白, 并借助蛋白质芯片的高通量筛选和抗原抗体特异性结合原理来确定肿瘤标志物^[3]。噬菌体展示与蛋白质芯片相结合的技术已经在肿瘤标志物筛选方面取得了很大的成功^[4]。为筛选吸烟人群中早期肺癌肿瘤标志物, 我们构建了吸烟者肺癌组织 T7 噬菌体展示 cDNA 文库。

2. 材料和方法

2.1. 材料

3 例肺癌组织由河北医科大学第四医院提供, 均为男性吸烟患者, 处于 III、IV 期。RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN 公司; PolyATtract[®] mRNA Isolation System III 购自 Promega 公司; Orient Express Random Primer cDNA Synthesis Kit, T7Select10-3b Cloning Kit, Mini Column Fractionation Kit 购自 Novagen 公司。

2.2. 方法

2.2.1. 总 RNA 的提取和 mRNA 分离纯化

从 RNAlater 保存的组织中剪取一块不大于 30 mg 的组织(本实验), 根据 RNeasy Mini Handbook 进行 RNA 提取, 最后用 RNase-free Water 洗脱, 得到总 RNA。凝胶电泳检测总 RNA 质量, 紫外分光光度法检测总 RNA 的浓度, 并分析其纯度。根据 PolyATtract[®] mRNA Isolation System III 说明书从上述总 RNA 中分离纯化 mRNA, 用真空冷冻干燥机将其冻干, 加入 10 μ L RNase-free Water 重溶。凝胶电泳检测 mRNA 质量, 紫外分光光度法检测 mRNA 的浓度, 并分析其纯度。

2.2.2. cDNA 双链合成及 cDNA 与 EcoRI/HindIII 接头连接

按照 Orient Express Random Primer cDNA Synthesis Kit 说明书取 4 μ g 的 mRNA 作为模板, 加入 1 μ g 的 HindIII Random Primers, 在逆转录酶 MMLV 的作用下合成 cDNA 第一条链。在第一条链的反应体系中加入 1.6 U RNaseH, 再加入 50 U DNA Polymerase I 和甲基化 dNTP, 合成 cDNA 第二链。苯酚抽提反应物, 异丙醇沉淀, 溶于 10 μ L TE。向上述合成的双链 cDNA 溶液中加入 1.5 U T4 DNA Polymerase 补平双链 cDNA 末端。取上述末端补平的双链 cDNA 10 μ L, 加入 2 μ L Directional EcoRI/HindIII Linkers, 在 T4 DNA 连接酶的作用下 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。然后分别加入 EcoRI 和 HindIII 各 100 U, 37 $^{\circ}$ C 温育 2 h 消化接头, 得到两端分别带有 EcoRI 和 HindIII 粘性末端的双链 cDNA。

2.2.3. cDNA 片段大小分离

按照 Mini Column Fractionation Kit 操作说明书, 将上述消化产物上样于 Mini Column, 对 cDNA 片段进行分离, 去除未连接的接头及小片段 cDNA, 收集长度在 300 bp 以上的双链 cDNA。

2.2.4. cDNA 与 T7Select10-3b 载体连接及体外包装

根据 T7Select[®] System Manual 将上述分离得到的 cDNA 与 T7Select10-3b Vector Arms 按照摩尔比 3:1 混合, 在 T4DNA 连接酶的作用下, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物 5 μ L 与 25 μ L 包装蛋白混合, 22 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 加入 270 μ L 灭菌的 LB 终止反应, 得到大量具有感染性的 T7 噬菌体颗粒。加入 20 μ L 氯仿, 4 $^{\circ}$ C 保存, 并测其滴度。

2.2.5. T7 噬菌体展示文库的鉴定

根据 T7Select[®] System Manual 对 T7 噬菌体展示文库进行鉴定。

2.2.5.1. 文库容量测定

将宿主菌 BLT5615 接种于 LB 培养液, 37 $^{\circ}$ C 摇床培养至 OD = 1。取 10 μ L 的包装产物用灭菌 LB 稀释 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6$ 倍。每个梯度取 100 μ L, 与 250 μ L 宿主菌、3 mL 预热的上层培养基混合, 铺于已加入羧苄青霉素的琼脂平板上, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 3~4 h, 待长出清晰的噬菌斑时, 计算文库库容。

2.2.5.2. 文库重组率的测定

用灭菌牙签从原库滴度测定平板上随机挑取单个噬菌斑，加入 100 μ L、10 mmol/L EDTA 中，短暂震荡后，65℃热击 10 min，冷却至室温后，14,000 g 离心 3 min，取上清 2 μ L 作为模板，加入试剂盒中的 T7 上下游引物进行 PCR 扩增。扩增条件为 94℃预变性 5 min；94℃ 50 s，50℃ 1 min，72℃ 1 min 10 s，35 个循环；72℃延伸 7 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测文库插入片段大小，并计算重组率。

2.2.5.3. 文库扩增

将包装产物适当稀释，与宿主菌液混合，铺板培养，待长出噬菌斑后，加入噬菌体提取缓冲液，4℃存贮过夜。次日收集噬菌体提取缓冲液，加入氯仿，离心后收集上清。取 10 μ L 上清，按上述方法测定扩增后噬菌体展示文库的滴度。在扩增产物中加入 1/10 体积 80%灭菌甘油，分装后-70℃保存。

3. 结果

3.1. 总 RNA 的提取和 mRNA 的分离结果

用 RNeasy Mini 试剂盒从吸烟者肺癌组织中提取总 RNA，经紫外分光光度法检测，产量为 400 μ g，OD260/OD280 = 1.9，说明提取的 RNA 纯度较高，1%琼脂糖凝胶电泳显示，28S 和 18S rRNA 条带均清晰，说明提取的总 RNA 质量好，未发生降解。

分离纯化的 mRNA 产量为 5.3 μ g，收率为 1.33%，OD260/OD280 = 2.12，1%琼脂糖凝胶电泳图可看出 mRNA 呈弥散状，分布均匀。表明分离的 mRNA 质量较高，可以进行 cDNA 的合成。

3.2. T7 噬菌体展示文库质量鉴定

文库稀释后，经噬菌斑测定，原始文库的库容为 1.35×10^6 pfu，扩增后文库的滴度为 4.4×10^{10} pfu。对随机挑取的 100 个噬菌斑进行 PCR 检测，文库的重组率为 97%，重组体中 91%的插入片段长度>300 bp，说明所建文库质量较高。

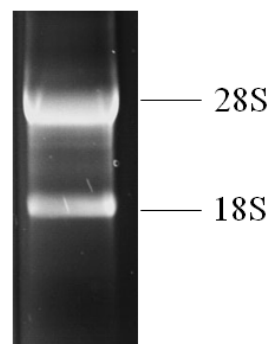


Figure 1. Total RNA isolated from lung cancer tissue of smokers
图 1. 吸烟者肺癌总 RNA 电泳结果

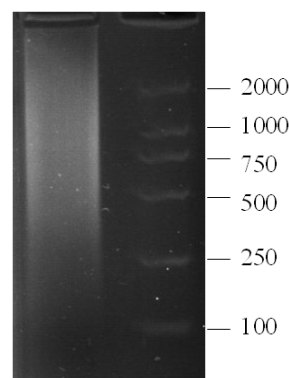


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of mRNA
图 2. mRNA 电泳图

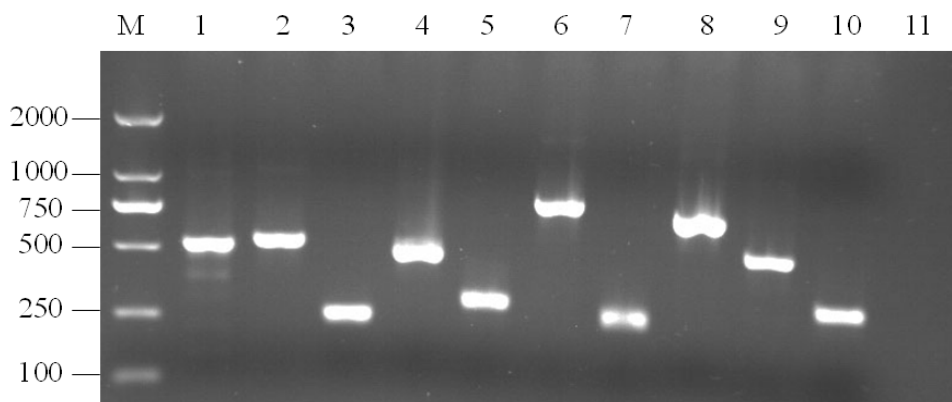


Figure 3. PCR analysis of random plaques from T7 phage display cDNA library
图 3. cDNA 文库随机克隆的 PCR 结果

4. 讨论

构建高质量的 cDNA 文库的关键环节是要获取高质量完整的 mRNA 并通过有效途径制备全长双链 cDNA。由于 RNA 酶广泛存在,并使 RNA 容易降解,所以必须要保证操作环境无 RNA 酶的污染。本文采用试剂盒提取 400 μg 高质量完整的总 RNA,通过 PolyATtract[®] mRNA Isolation System III 纯化得到 5 μg mRNA,高于合成 cDNA 所要求的起始量 4 μg ,可以进行下一步合成反应。使用 Mini Column Fractionation 分离 cDNA 片段,去掉多余的接头和小片段,短片段太多会严重影响后面的连接转化效率及文库质量。载体与插入片段的连接效率对构建高质量的 cDNA 文库起着重要作用,我们把 cDNA 与载体以摩尔比为 3:1 进行连接、包装。从理论上讲,当一个 cDNA 文库具有 10^6 以上的库容时,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^[5]。本实验所建文库库容为 1.35×10^6 pfu,符合理论要求。据 SCOP 数据库推算,如果文库中 cDNA 插入片断达到 300 bp 以上,就可以代表蛋白质的各个功能域^[6]。而本实验中 91% 的插入片段长度 > 300 bp,因此所建文库质量较高,能够有效运用于后续的肿瘤标志物筛选。

目前,用于多肽、蛋白质展示的噬菌体系统主要有丝状噬菌体展示系统、 λ 噬菌体展示系统、T4 噬菌体展示系统和 T7 噬菌体展示系统^[7]。本研究应用 T7 噬菌体展示系统构建了吸烟者肺癌组织 T7 噬菌体展示 cDNA 文库。该文库和常规 cDNA 文库相比,文库容量更为丰富。T7 噬菌体复制周期短,细胞质蛋白组装、操作和储存方便;T7 噬菌体很稳定,可以采用各种试剂以将噬菌体从固相结合物上释放下来并仍然保持很高的感染活性,可以用于大规模亲和淘洗;而且 T7 是裂解性噬菌体,展示在 T7 表面的多肽或蛋白质不需要通过细胞膜分泌出来,从而使更多的序列可能被展示^[8];更有可能获得含有完整开放阅读框的 cDNA 片段。

T7 噬菌体展示系统可以在其表面以高、中、低拷贝展示不同分子量、不同亲和力的蛋白质。该技术发

展迅速,并被应用于生命科学及药物研究的许多领域。Zhong 及其研究小组构建了非小细胞肺癌 T7 噬菌体展示技术,将蛋白芯片技术与噬菌体展示技术结合,筛选出 5 个噬菌体展示蛋白的肿瘤标志物组合,敏感性和特异性分别为 90% 和 95%^[9]。Gnanasekar M. 等通过 T7 噬菌体 cDNA 文库筛选出 5 个 *Brugia Malayi* 的疫苗候选分子^[10]。

5. 结论

本文构建了吸烟者肺癌组织 T7 噬菌体展示文库,为我们以后应用蛋白质芯片技术在吸烟人群中筛选早期肺癌肿瘤标志物打下基础。

6. 致谢

河北医科大学第四医院对本实验提供了大量的便利和支持,作者在此表示衷心地感谢。

参考文献 (References)

- [1] A. Jemal, M. J. Thun, L. A. Ries, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. National Cancer Institute, 2008, 100(23): 1672-1694.
- [2] 吴楚, 诸慧. 噬菌体展示技术[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(3): 990-992.
- [3] L. Zhong, X. J. Peng, et al. Identification of circulating antibodies to tumor-associated proteins for combined use as markers of non-small cell lung cancer. Proteomics, 2004, 4(4): 1216-1225.
- [4] X. J. Wang, J. J. Yu, S. Arun, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer. The New England Journal of Medicine, 2005, 353: 1224-1235.
- [5] S. Nagata, P. Golstein. The Fas death factor. Science, 1995, 267(5203): 1449-1456.
- [6] 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.
- [7] 强荣兵, 张楠楠, 魏丽丽等. 噬菌体展示技术及其在肿瘤研究中的应用[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(9): 81-86.
- [8] J. J. Dunn, F. W. Studier and M. Gottesman. Complete nucleotide sequence of bacteriophage T7 DNA and the locations of T7 genetic elements. Journal of Molecular Biology, 1983, 166(4): 477-535.
- [9] L. Zhong, G. E. Hidalgo, A. J. Stromberg, et al. Using protein microarray as a diagnostic assay for non-small cell lung cancer. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2005, 172(10): 1308-1314.
- [10] M. Gnanasekar, K. Rao, Y. X. He, et al. Novel phage display-based subtractive screening to identify vaccine candidates of *Brugia malayi*. Infection and Immunity, 2004, 72(8): 4707-4715.