

# 人 p16<sup>INK4</sup> cDNA 探针在非小细胞肺癌研究中的应用

曹祥荣 李淑锋 张锡然

(南京师范大学生命科学学院 南京 210097)

[摘要] 制备总 RNA,RT-PCR 克隆 p16<sup>INK4</sup> cDNA,测序验证,制备探针.进行 PCR 产物 Southern 杂交检测非小细胞肺癌组织标本中 p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子阴性杂交率为 12.9%(4/31).原位杂交显示 p16<sup>INK4</sup>基因转录阴性率为 22.6%(7/31).结果说明克隆的 p16<sup>INK4</sup> cDNA 是正确的,可用于临床基因诊断,p16<sup>INK4</sup>基因变异及表达在非小细胞肺癌的发生、发展中起作用.

[关键词] 肺癌 p16<sup>INK4</sup>基因 基因克隆 杂交

[中图分类号] Q78; [文献标识码] A; [文章编号] 1001-4616(2001)02-0075-04

肿瘤的发生和发展是由多种遗传改变的累积造成的.遗传改变包括肿瘤抑制基因失活和原癌基因激活等.1993 年 Serrano 等<sup>[1]</sup>发现了一种与 CDK4 作用,参与细胞周期调控的 p16<sup>INK4</sup>基因.p16<sup>INK4</sup>基因在许多肿瘤细胞系和肿瘤组织中有缺失和点突变,说明 p16<sup>INK4</sup>基因失活与多种肿瘤的发生相关,是细胞周期的抑制因子<sup>[2]</sup>.克隆 p16<sup>INK4</sup> cDNA 对于进一步研究 p16<sup>INK4</sup>基因的功能、制备探针、研究 p16<sup>INK4</sup>基因与肺癌的关系,应用于临床检测具有理论意义和应用前景.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

31 例非小细胞肺癌及相应正常肺组织标本为液氮冻存样品,由中国人民解放军南京八一医院收集提供.各种 DNA 工具酶购自 MBI 公司,逆转录试剂盒为 Promega 产品,DIG 试剂盒为 Boehringer Mannheim 公司产品,其余试剂均为国产分析纯.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 RT-PCR

取 3 g 人肺组织,按异硫氰酸胍方法提取总 RNA<sup>[3]</sup>.紫外分光光度法测定 RNA 浓度.按试剂盒说明进行.取 10  $\mu$ L 总 RNA(4  $\mu$ g) 2  $\mu$ L 10  $\times$  buffer,1  $\mu$ L oligo dT(0.2  $\mu$ g) 2  $\mu$ L 10 mmol/L dNTP 混合物,0.5  $\mu$ L Rasin,2  $\mu$ L 逆转录酶(50u) 3.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O.42 $^{\circ}$ C 30 min.95 $^{\circ}$ C 5 min,冰中冷却.在逆转录反应液中加入 4  $\mu$ L 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,8  $\mu$ L 10 $\times$  RT buffer,根据 p16<sup>INK4</sup> cDNA<sup>[1]</sup>序列设计的 5'(GGAATTCATGGCCTTCGG) 3'(TGGATCCTTCAATCGGGGATGT)引物各 50 pmol,1  $\mu$ L Taq 酶(5 u),用 H<sub>2</sub>O 补充到 100  $\mu$ L.94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 20 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.1.5% 低熔点琼脂糖回收 PCR 片段(约 0.5 kb).Klenow 补齐,连接到 pAdCMV 质粒的 HpaI(平头末端)位点中(图 1).

收稿日期 2001-02-12

基金项目:国家九五重点科技项目(攻关)计划(96-906-01-18)

作者简介:曹祥荣,1963—,博士,南京师范大学生命科学学院副教授,从事细胞与分子遗传学研究.

万方数据

## 1.2.2 探针的制备

制备 pAdCMV-p16cDNA 质粒, HindIII/ClaI 酶切, 低熔点琼脂糖回收 p16<sup>INK4</sup> cDNA 片段, 按随机引物 DIG 标记试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)标记 p16<sup>INK4</sup> cDNA 探针。

## 1.2.3 PCR 产物 Southern Blot

参照《分子克隆》方法提取组织 DNA<sup>[3]</sup>。在紫外分光光度计上测定 DNA 浓度和纯度。OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 比值在 1.8~1.9 之间。根据 p16<sup>INK4</sup> 基因组序列并参考文献<sup>[4]</sup>, 合成第 2 外显子(扩增长度 427 bp)一对扩增引物: P1 5'-GGCTCTACACAAGC

TTCCTT-3', P2: 5'-TGAGCTTTGGAAGCTCTCAG-3'。取 5 μL PCR 反应产物, 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳分析。

毛细管转移 DNA 至尼龙膜(Gene 公司), 在分子杂交炉中(美国 Robbins Scientific 公司)将以上述克隆的 cDNA 作探针进行 Southern 杂交<sup>[3]</sup>, 碱性磷酸酶(NBT/BCIP)暗处显色, 阳性杂交带呈蓝色。

## 1.2.4 原位杂交检测 RNA 的转录

用随机引物 DIG 标记试剂盒(Boehringer Mannheim 公司产品)标记 p16<sup>INK4</sup> cDNA 探针, 进行原位杂交<sup>[5]</sup>。切片经蔗糖 PBS 洗, 300 μg/mL 蛋白酶 K 消化 37℃ 15 min, 蔗糖 PBS 溶液洗 4% 多聚甲醛固定 5 min, 脱水干燥。滴加预杂交液(50% 去离子甲酰胺, 2 × SSC, 2 × denhardt's 液, 10% 硫酸葡聚糖, 40 u/mL RNasin, 0.5 mg/mL 鲑精 DNA, 0.5 mg/mL 酵母 tRNA), 37℃ 60 min, 吸去预杂交液, 换上杂交液(0.1 μg/mL p16 探针的预杂交液), 100℃ 变性 5 min, 44℃ 杂交过夜, 2 × SSC (含 50% 甲酰胺)洗 5 min, 2 次; 封闭液(0.1 mol/L pH 7.5 TBS, 3% BSA, 1 mmol/L EDTA)室温封闭 10 min, 吸去封闭液, 滴加碱性磷酸酶标记的抗 Dig 抗体(1:500), 37℃ 孵育 60 min, 2 × SSC 和 0.05 mol/L Tris-Cl pH 7.2 洗, 再用 0.05 mol/L Tris-Cl pH 9.5 (含 0.1 mol/L NaCl, 1 mmol/L MgCl<sub>2</sub>)洗 2 次。与碱性磷酸酶底物 NBT/BCIP 作用显色, 阳性产物呈蓝色。以预先经 RNaseA 处理的切片同步杂交阴性对照。

# 2 结果

## 2.1 p16<sup>INK4</sup> cDNA 的克隆

用正常人肺组织制备总的 RNA, 逆转录合成 cDNA, p16<sup>INK4</sup> cDNA 特异性引物扩增获得其 cDNA。回收 p16<sup>INK4</sup> cDNA 片段, 将 pAdCMV 用 Hpa I 切割, 连接产生 pAdCMV-p16(图 1), 筛选重组克隆, 制备质粒 DNA, 选择 HindIII/ClaI 双酶切, 产生约 0.6 kb 的片段(含有一部分质粒 DNA), 如图 2 所示。经测序与文献报道序列一致<sup>[1]</sup>, 克隆的 p16<sup>INK4</sup> cDNA 是正确的, 可以作为探针用。

## 2.2 PCR 产物 Southern blot 分析

以 p16<sup>INK4</sup> 基因第二外显子二侧引物 PCR 技术检测了 31 例非小细胞肺癌组织标本, 将 PCR 产物进行电泳、毛细管转移至尼龙膜上, 用 DIG 标记的人 p16<sup>INK4</sup> cDNA 进行

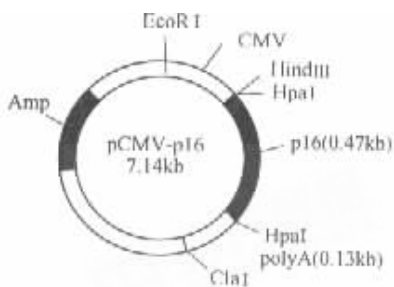
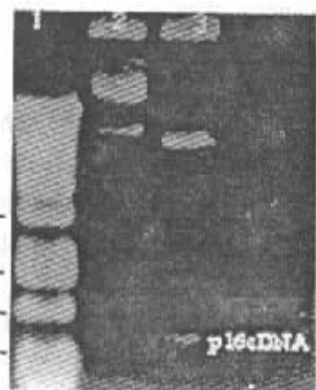


图 1 pAdCMV-p16cDNA 质粒的构建



1: 2 HindIII + EcoRI 相对分子量(kb); 2: 未酶切的 pAdCMV-p16cDNA 质粒; 3: HindIII + ClaI 酶切的 pAdCMV-p16cDNA 质粒。

图 2 酶切鉴定

杂交,出现很强的杂交带(图3)。31例癌组织中有4例在427bp处无杂交带,第二外显子的阴性杂交率为12.9%(4/31)。制备的探针可用于p16<sup>INK4</sup>基因组DNA检测。

2.3 RNA原位杂交检测 p16<sup>INK4</sup>基因的转录

Dig 标记 p16<sup>INK4</sup> cDNA 探针,进行 RNA 杂交,碱性磷酸酶显色,肺腺癌(图4a)和鳞癌(4b)细胞的呈蓝色,说明癌组织 p16<sup>INK4</sup>基因可转录 RNA 产物,为阳性。所检测的31例非小细胞肺癌标本中,阳性杂交率为77.4%(24/31),有7例为转录阴性非小细胞肺癌中基因转录异常。

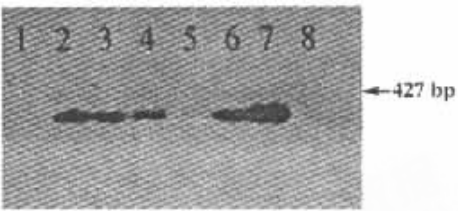
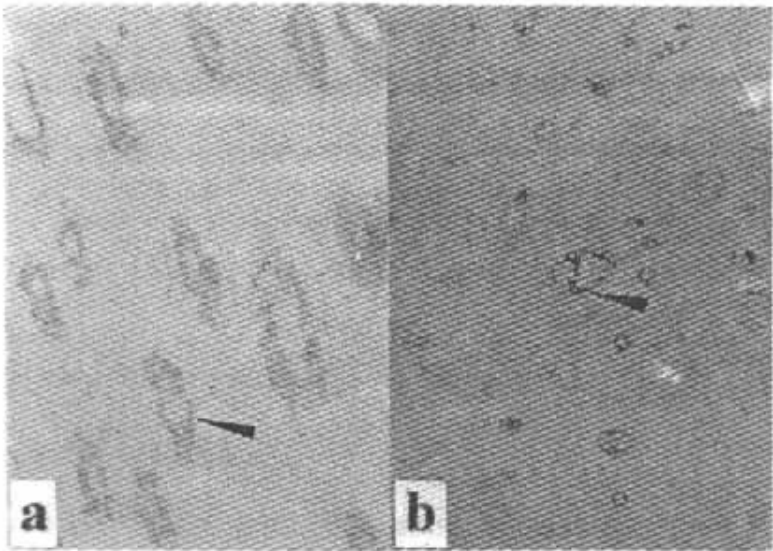


图3 人 p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子 PCR 产物  
Southern blot 分析肺癌组织(1~8)



肺腺癌(a)肺鳞癌细胞(b)细胞呈蓝色,杂交阳性,×200 肿瘤细胞(◀)

图4 p16<sup>INK4</sup> mRNA 的原位杂交

3 讨论

本研究根据文献报道序列设计引物<sup>[1]</sup>,RT-PCR 方法,克隆 p16<sup>INK4</sup> cDNA,制备探针,用于 p16<sup>INK4</sup>基因杂交研究。PCR 分析了 31 例 NSCLC p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子的缺失率为 12.8%(4/31),mRNA 原位杂交检测 31 例非小细胞肺癌 p16<sup>INK4</sup>基因 mRNA 转录的阴性率为 22.6%(7/31)这一结果证实所克隆 p16<sup>INK4</sup>基因是可以用于临床基因检测,序列测定结果与文献相符<sup>[1]</sup>。

p16<sup>INK4</sup>在多种肿瘤细胞系及实体瘤组织中存在高频失活,其失活的机制以纯合缺失为优势方式,且 p16<sup>INK4</sup>基因的变异主要集中在第二外显子<sup>[6]</sup>。本文采用所克隆的探针对 p16<sup>INK4</sup>基因第二外显子的 PCR 产物进行 southern 杂交,一方面可以检测 p16<sup>INK4</sup>基因在非小细胞肺癌中的基因变化,另一方面证明所克隆的 p16<sup>INK4</sup> cDNA 的正确性。因为检测的是 PCR 产物,所以检测率低于有关文献报道的非小细胞肺癌 p16<sup>INK4</sup>基因缺失和突变的总检出率(67.5%),低于原发性肿瘤中 p16<sup>INK4</sup>基因的 21%异常率<sup>[7]</sup>。

p16<sup>INK4</sup>基因在不同组织的肿瘤标本或不同诱发病因的肿瘤标本中,其变异率有较大的差异,这一现象提示 p16<sup>INK4</sup>基因改变在不同组织癌变过程中的作用可能有所不同,可能与各组织中 p16<sup>INK4</sup>基因的表达活性有关.本文采用原位杂交方法检测肿瘤样品中 p16<sup>INK4</sup>基因转录的异常,可避免肺癌组织中混有部分间质细胞的影响,能较全面地反映基因在肿瘤组织中改变的性质.p16<sup>INK4</sup>基因克隆、制备探针可应用于临床肿瘤组织的基因诊断研究,为探讨 p16<sup>INK4</sup>基因在肺癌发生和恶性发展过程中起重要的作用及基因治疗具有重要意义.

### [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Serrano M ,Hannon G J ,Beach D ,*et al* . A new regulatory motif in cell cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK[ J ]. *Nature* ,1994 ,366 :704—707 .
- [ 2 ] Norbori T ,miura K ,Wu DJ ,*et al* . Deletion of cyclin dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancer[ J ]. *Nature* ,1994 .368 :753—756 .
- [ 3 ] Sambrook J . *Molecular cloning*[ M ]. 2nd ed . New York : Cold Spring Harbor Laboratory ,1989 .9 .16—9 .18 .
- [ 4 ] 金顺钱 ,彭琼 ,陆士新 ,等 . 食管癌组织中 MTS1/p16 基因的缺失[ J ]. *中华肿瘤杂志* ,1998 ,20( 1 ) :9—11 .
- [ 5 ] Keh NC ,Gerber MA . *In situ* hybridization for cytomegalovirus DNA in AIDS patients[ J ] ,*Am J Pathol* ,1988 ,131 :490—495 .
- [ 6 ] Liggett WH Jr ,Sidransky D . Role of the p16 tumor suppressor gene in cancer[ J ]. *J Clin Oncol* ,1998 ,16( 3 ) :1197—1206 .
- [ 7 ] Kinoshita K ,Dosaka-Akia H ,Mishina T ,*et al* . Altered p16<sup>INK4</sup> and retinoblastoma protein status in non-small cell lung cancer : potential synergistic effort with altered p53 protein on proliferative active[ J ]. *Cancer Res* ,1996 ,56 :5557—5562 .

## Cloning and Application of Human p16<sup>INK4</sup> cDNA Probe in the Study of Non-small Cell Lung Cancer

Cao Xiangrong ,Li Shufeng ,Zhang Xiran

( College of Life Science ,Nanjing Normal University ,Nanjing 210097 ,PRC )

**Abstract** Preparation of total RNA ,cloning p16 cDNA ,Southern Blot and *in situ* hybridization were used to study non-small cell lung cancer tissue .The Cloned p16 cDNA was proved by enzyme digesting .The deletion rate of p16<sup>INK4</sup> gene exon 2 was 12.9%( 4/31 ) in non-small cell lung cancer tissue by Southern blotting for PCR products .p16<sup>INK4</sup> gene transcription negative rate of 22.6%( 7/31 ) was confirmed by *in situ* hybridization analysis with p16<sup>INK4</sup> cDNA probe .The result indicated that the cloned p16<sup>INK4</sup> cDNA was correct p16<sup>INK4</sup> gene alterations plays a role in the development and progress of non-small cell lung cancer .

**Key words** non-small cell lung cancer ;p16<sup>INK4</sup> gene cloning ;*in situ* hybridization

[ 责任编辑 孙德泉 ]