

人尿嘧啶糖基化酶 cDNA 的克隆及其在食管鳞癌组织中的检测

鲍洪波¹ 张传宝¹ 王晋芳¹ 周传农² 刘 芳² 赵晓航² 钱世钧^{1*}

¹(中国科学院微生物研究所,北京 100080)

²(中国医学科学院 肿瘤研究所 分子肿瘤学国家重点实验室,北京 100021)

摘 要 尿嘧啶糖基化酶是碱基切除修复过程的起始酶,对于维护基因稳定具有重要意义。在不同组织及不同细胞周期中,该酶的表达水平存在差异。通过反转录 PCR 克隆了人尿嘧啶糖基化酶的 cDNA 编码序列,进一步以克隆所得的已知 UNG 基因拷贝数的重组质粒作为定量标准,通过实时荧光定量 RT-PCR 测定了食管癌病人手术切除组织中尿嘧啶糖基化酶的 mRNA 水平,探讨了尿嘧啶糖基化酶表达水平与食管癌之间的联系。

关键词 尿嘧啶糖基化酶,定量 PCR,食管鳞癌

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)05-0561-05

尿嘧啶 N 糖基化酶(Uracil N-glycosylase, UNG; EC3.2.2.3。或称为尿嘧啶 DNA 糖基化酶,uracil DNA-glycosylase,UDG。本文统一简称为 UNG。)可以起始碱基切除修复,从而在体内识别并切除 DNA 分子中最常见的异常碱基尿嘧啶,防止基因突变的出现^[1]。

人类的细胞核和线粒体中都存在着 UNG,二者都是由 UNG 基因编码,只是由不同的启动子起始转录并通过不同方式加工拼接从而产生了两种形式的产物。UNG 在线粒体中的形式 UNG1 含 304 个氨基酸残基,在核中的形式 UNG2 含 313 个氨基酸残基。研究表明 UNG1 与 UNG2 只是 N 端的几十个残基不同,C 端的 269 个残基,其中包括末端 220 个残基的催化活性区,则完全相同^[2]。已经证实,N 端序列的不同决定了两者转运途径和作用部位的不同^[3]。

UNG 在正常人体细胞内的表达量约 178000 ± 20000 (个分子/细胞)^[4],UNG1 和 UNG2 的表达相对独立且分别受到多种因素(包括组织水平、转录水平和细胞周期)的调控^[5,6]。检测发现:UNG1 在已检测的所有组织中都有表达,而 UNG2 的表达仅限于能够增殖的组织,如睾丸、胎盘和胸腺等。

基于 UNG2 的表达特点以及基因组自稳定机制和防癌抗癌的紧密关系^[7-9],本实验以实时荧光定

量 RT-PCR 为手段,从定量检测的要求出发,克隆了 UNG2 的 cDNA 编码序列(并以异源表达和序列测定等方式检验了克隆效果),以此重组质粒作为定量标准,并采用合成的特异性引物,检测了食管癌病人不同类型手术切除组织中 UNG2(下文中 UNG 均指 UNG2)mRNA 水平,并探讨了 UNG 表达与食管癌之间存在的联系。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞、菌种及质粒:人绒毛 JEG-3 细胞由中国科学院动物研究所计划生育与生殖生物学国家重点实验室提供;大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存;pET21-a 载体为本实验室保存。

1.1.2 主要试剂:Trizol、反转录酶 SS II 为 Gibco 公司产品;限制酶、连接酶为华美公司产品;Taq 酶为 Promega 公司产品;质粒提取试剂盒为天为时代公司产品;Lightcycler RNA 扩增试剂盒 SYBR Green I 为 Roche 公司产品;其他化学试剂均为国产分析纯。

1.1.3 引物:根据报道的 hUNG cDNA 序列合成克隆引物^[10],并在两个引物的 5' 端分别引入 EcoR I、Sal I 位点(Primer1 和 Primer2)。根据 SYBR Green I 试剂盒对引物的特殊要求(扩增片段长度不得超过

收稿日期 2003-03-10,修回日期 2003-06-10。

基金项目 国家自然科学基金重大项目资助(No.39990570-4);传感技术国家重点实验室项目。

* 通讯作者。Tel 86-10-62651598;Fax 86-10-62651598;E-mail:qiansj@sun.im.ac.cn

500bp),参考 cDNA 克隆测序结果,针对保守序列合成检测引物(Primer3 和 Primer4)。

Primer 1: GCGAATTCATGATCGGCCAGAAGACGCTCTAC(画线部分为 *EcoR* I 位点)

Primer 2: GCGTCGACTCACAGCTCCTTCCAGTCAAT(画线部分为 *Sal* I 位点)

Primer 3: ATGATCGGCCAGAAGACGCTCTAC

Primer 4: AACTCCCCGTGAGGTGCTTCTTCCA

1.1.4 食管鳞癌组织标本 食管癌新鲜配对手术标本取自中国医学科学院肿瘤医院,经资深病理医生诊断为食管鳞癌。标本一经分离,迅速清洗。同一手术标本,分别取癌组织和远端切缘的正常食管粘膜共 18 对。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取 细胞总 RNA 的提取按 Trizol 使用说明操作。

1.2.2 cDNA 克隆与载体构建 反转录按 SS II 使用说明操作,取 1 μ L 所得 cDNA 作为模板进行扩增,PCR 反应溶液按 Taq 酶使用说明配制,引物为 Primer1 和 Primer2,反应程序为 94 $^{\circ}$ C 2min 变性,94 $^{\circ}$ C 1 min,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min 共 40 循环,72 $^{\circ}$ C 退火 10 min。*EcoR* I、*Sal* I 酶切 PCR 产物及 pET-21a 载体后低熔点琼脂糖凝胶电泳,分别回收目标条带,连接后产物转化 DH5 α 感受态细胞。

1.2.3 诱导表达 质粒转化 BL21(DE3)感受态细胞,涂含有 Amp^r 的 LB 平板,37 $^{\circ}$ C 培养 12h 后挑取单菌落接种于 5mL LB(Amp^r)液体培养基,37 $^{\circ}$ C 200 r/min 过夜培养后,按 2% 接种量转接于 50mL LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 培养至 OD₆₀₀ = 0.4 ~ 0.5,加入 IPTG 至终浓度 100 μ mol/L,继续诱导培养 3h 后终止。分别回收菌体及上清。另取部分菌体超声破碎后回收沉淀,即为包涵体蛋白。

1.2.4 质粒提取与定量 转化子接种至 LB 培养基,37 $^{\circ}$ C 200r/min 过夜,质粒提取按天为时代质粒提取试剂盒使用说明操作,1.5mL 菌液提取产物溶于 50 μ L 双蒸水。紫外分光光度计测定 260nm 处吸收,按 OD 值 1 相当于 50 μ g/mL 双链 DNA,确定质粒浓度。根据载体序列及插入片段测序结果计算出重组质粒分子量,结合质粒浓度及分子量确定质粒溶液摩尔浓度,则每摩尔质粒相当于 2 摩尔的扩增模板。根据上述计算结果,结合实际需要,以不同比例稀释该溶液,所取得的各摩尔浓度的质粒溶液即为 PCR 反应的定量标准。

1.2.5 样品处理 每个样本为 1mL Trizol 含 100mg

组织, Polytron 微量匀浆器处理 15s 暂停 5s,重复处理 6 次,提取操作按 Trizol 使用说明,最后均溶于 10 μ L DEPC 处理水。

1.2.6 实时荧光定量检测 按 Roche Lightcycler 操作说明进行。Lightcycler 是一种特殊的 PCR 仪,反应在特制的透明毛细玻璃管中完成,加热装置产生的热量由鼓风机传给毛细管。由于毛细管比表面积大,再加上风热变温迅速,反应体系的温度控制效率比传统 PCR 高出很多,升温降温都可以在瞬间完成,因此扩增过程中的每个循环只需数秒。荧光信号来自反应过程中使用的特殊染料 SYBR Green I,该染料具有类似于 EB 的插入双链 DNA 内部的特性,一旦与 DNA 结合,该染料可以在激发光照射下发出特定波长的荧光,这种荧光信号的强弱与双链的生成成正比,在每个循环的末期检测该信号便可实时监控 PCR 产物的生成,将荧光信号强弱对循环数作图,所得图线为典型的 PCR 产物生成图。图形中反应体系对数增长期出现时刻所对应的循环数数值记为 Ct(Ct 值由监控计算机根据图线切线斜率的变化情况,通过逆推加以确定,该值可以直接从结果数据中读出,若荧光强弱没有明显对数变化则检测不到 Ct)。监控计算机对定量标准的拷贝数(已知)取对数,所得数值作为数据点的纵坐标,该定量标准对应反应体系的 Ct 值(实测)作为横坐标,每个定量标准的扩增结果描为一个点,各个定量标准对应的数据点均沿直线分布,该直线即为定量所用的标准曲线。根据标准曲线,结合各个检测反应的 Ct 值便可确定各循环体系中初始模板拷贝数。其中,由于反应的特殊性,扩增片段的大小不宜超过 500bp,故所用引物为 Primer3 和 Primer4,反应程序如下(见表 1)。

2 结果

2.1 尿嘧啶糖基化酶 cDNA 的克隆及鉴定

利用 Trizol 提取 JEG-3 细胞的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳可见明显的 28s、18s 条带,以 RT-PCR 所得 cDNA 为模板,以 Primer1 和 Primer2 扩增得到大小约 940bp 的条带(图 1),与预期值相符,克隆到 pET21-a 载体上构建得重组质粒 pUNG,限制性酶切产物经琼脂糖电泳可见插入片段,PCR 鉴定结果也符合理论预期,序列测定结果与文献报道相符。在大肠杆菌 BL21 中诱导表达该蛋白,SDS-PAGE 分析可见大小约 39kD 的特征条带(图 2),与文献报道的 UNG 蛋白大小相符^[2]。培养液上清与超声破碎后所得沉淀

表 1 Lightcycler 检测程序

Table 1 The amplification procedure of Lightcycler

Step	Transcription	Denaturation	Amplification			Cooling
Cycles	1	1	45			1
Segment	NA	NA	Seg. 1	Seg. 2	Seg. 3	NA
Temperature targets/℃	55	95	95	60	72	30
Incubation time(min : s)	10 :00	00 :30	00 :00	00 :10	00 :13	00 :30
Temperature transition rate(℃/s)	20	20	20	20	20	20

NA : Not Available Seg 1 : Segment One(Denaturation) Seg 2 : Segment Two(Annealing) Seg 3 : Segment Three(Elongation)

的对比表明 表达蛋白主要以包涵体形式存在。

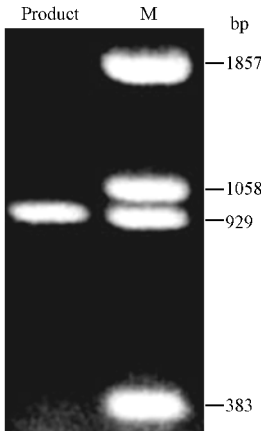


图 1 UNG RNA RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of UNG RNA RT-PCR products

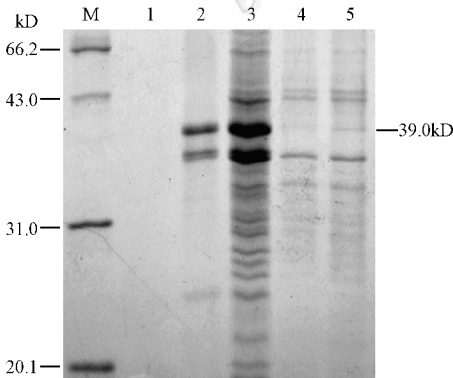


图 2 诱导表达产物的 SDS-PAGE

Fig.2 SDS-PAGE of the inductive expression products

Marker : Protein Molecular Weight Marker

1. Supernatant of induced pUNG/BL21 (DE3)
2. Precipitatates of induced pUNG/BL21 (DE3) after ultrasonic treatment
3. Induced pUNG/BL21 (DE3)
4. pUNG/BL21 (DE3) without induction
5. BL21 (DE3) without induction

2.2 样品检测

以一系列等比稀释的 UNG 模板(克隆所得重组

质粒) 溶液作为定量标准 , 其拷贝数为理论计算值 (表 2) 。 部分癌组织样本(样品 1-8) 检测结果见图 3 图中每一条曲线代表一个毛细管反应体系内荧光光强的变化 , 该光强变化与双链生成成正比。如果 PCR 扩增成功 , 则代表双链合成的纵坐标数值会随着时间推移而变化 , 图形上表现为图线高度随时间变化具有明显对数增长期的曲线 , 该反应即为阳性反应 , 表明检出了 UNG mRNA。与之相应 , 如果扩增失败 , 则纵坐标数值保持不变 , 图形上表现为无明显增长的接近水平的直线 , 该反应即为阴性反应。为了确定阳性反应的确源于 UNG mRNA , 对总 RNA 反转录所得 cDNA 经特异性引物 PCR 扩增后所得产物进行了序列测定 , 测序结果证明了 UNG mRNA 的存在。将各个反应结果与定量标准反应结果所得的标准曲线(文中未给出) 对照之后 , 可以计算出每个阳性反应体系内初始模板浓度(表 2) 。 阴性反应由于检测不到 C_t 值 , 无法推算拷贝数。

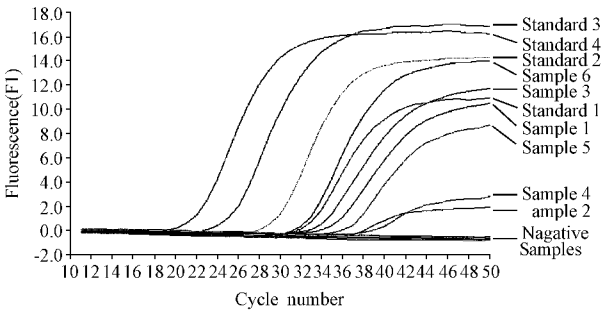


图 3 标准及部分样本扩增结果

Fig.3 The amplification results of standards and samples

癌旁组织中未发现阳性结果 , 故无 C_t 值 , 其检测结果未列入表中。

用普通琼脂糖凝胶电泳检测阳性反应样本 PCR 所得结果 , 可以看到清晰的大小约 300bp 的条带 , 与设计引物时预计的条带大小相符(图 4) 。 对该 PCR 条带测序表明扩增所得片段确系 UNG 保守序列。

表 2 标准及癌组织样本扩增结果

Table 2 The amplification results of standards and cancer tissue samples			
Sample/Standard	Positive	Ct	Number of copies
Standard 1	Standard	32.51	1×10^4
Standard 2	Standard	29.34	1×10^5
Standard 3	Standard	25.04	1×10^6
Standard 4	Standard	21.84	1×10^7
Sample 1	+	35.04	2.171×10^3
Sample 2	+	36.41	9.063×10^2
Sample 3	+	33.81	4.735×10^3
Sample 4	+	38.02	3.267×10^2
Sample 5	+	36.01	1.173×10^3
Sample 6	+	32.22	1.291×10^4
Sample 7	-	-	-
Sample 8	-	-	-
Sample 9	+	31.64	1.8879×10^4
Sample 10	+	31.30	2.3403×10^4
Sample 11	+	31.89	1.6121×10^4
Sample 12	-	-	-
Sample 13	+	30.80	3.2098×10^4
Sample 14	+	31.90	1.6019×10^4
Sample 15	-	-	-
Sample 16	+	31.65	1.8760×10^4
Sample 17	-	-	-
Sample 18	+	30.98	2.8647×10^4

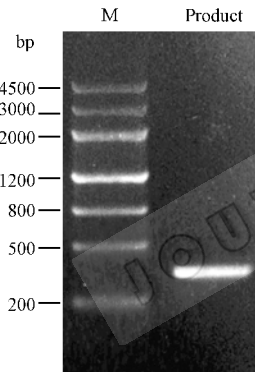


图 4 实时荧光定量 RT-PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳
Fig.4 Agarose gel electrophoresis of quantitative RT-PCR products

全部样本检测结果统计如下(表 3):

表 3 全部样本检测结果统计

Table 3 The statistical results on amplification of tissue samples			
Group	Number of samples	Number of positive	Positive rate
Cancer tissues	18	13	72.22%
Adjacent tissues	18	0	0

统计数据表明食管鳞癌组织与正常食管上皮间的检测结果存在明显差异。经独立性检验 $\chi^2_{0.01} > \chi^2_{0.01}$, 说明 UNG 的 mRNA 表达水平与癌组织的存在与否则有着非常密切的关系。

3 讨论

本实验的目的是通过实时荧光定量 PCR 的方

法检测 UNG mRNA 在癌组织与非癌组织中的水平,为了能够得到客观精确的检测结果,有两个问题值得重视:1. 定量标准的选择与制备;2. 被测样品的处理。

定量 PCR 要做到精确定量,就必须找到合适的定量标准。实验中通过反转录 PCR 的方式克隆得到重组质粒。用该克隆产物作为标准,具有以下优点:重组质粒保存容易,制备方便,质粒性质稳定。从本次检测看来,实验中检出的平均拷贝数偏高,且没有较低拷贝数的结果检出,原因就可能在于质粒定量方法不够完善,导致检测结果存在系统偏差。虽然从数量级和检出率的对比上已经可以明显看出各组别样品之间的显著差异,但若采取更加精确的质粒定量方法,本检测方法的精确度和重复性会有进一步的提高。

样品处理是本实验的另一个重要环节。RNA 提取的成功与否直接影响实验结果。在处理手术切除组织样本的过程中,我们先后使用了液氮冷冻手工研磨与微量匀浆器处理两种方法,电泳结果表明液氮研磨法在防止 RNA 降解上的效果不如微量匀浆法,这可能与研磨过程耗时较长,且无法避免摩擦产热有关,此外器具处理、作业环境等因素也都可能导致 RNA 降解。微量匀浆法虽然也存在仪器运转发热的问题,但是由于匀浆过程中,样品一直在 Trizol 溶液中浸泡,而 Trizol 可以抑制 RNA 的降解,故 RNA 受到了较好的保护。且微量匀浆的作业环境密闭(在微量离心管中),使用的器具也较少,因此 RNA 降解程度低。

从实验结果来看,食管鳞癌组织中 UNG mRNA 水平与正常食管上皮间存在明显区别,独立性检验也表明癌症与 UNG 表达之间的确存在着相当密切的关系。最直接的可能性是:作为分裂旺盛的组织,癌组织的细胞分生过程也伴随着较高水平的碱基切除修复活动,从而需要大量的 UNG 来参与反应,导致了 UNG 水平的提高,然而究竟是何种信号机制启动了 UNG 转录目前尚不清楚,这个问题很可能成为进一步研究的重点;与之相应,正常食管上皮组织的检测结果显示 UNG mRNA 水平很低,这就提示我们 UNG 的转录具有高度的时空特异性,这种特异性使得 UNG 表达水平有可能作为食管鳞癌辅助诊断的候选指标之一。

作为一种新的检测方法,实时荧光定量 PCR 具有反应时间短、监测直观、分辨率高、结果处理简便等优点,这使得本方法在医疗诊断上具有非常广阔

的应用前景。由于仪器和试剂的特殊性,实时荧光定量 PCR 的最适扩增条件不同于普通 PCR 反应。实验表明,与常规 PCR 条件相比适当提高反应体系中的镁离子浓度能够有效的增强反应的分辨率。

在今后的研究中,一方面可扩大样本数量,拓展样本范围;另一方面,如果能够通过免疫组化的方法明确 UNG 在癌组织或其他典型分生组织中的时空表达规律,就有可能为研究 UNG 的表达调控与肿瘤发生发展机制等问题提供新的切入点和思考方向。这些都有待于进一步的工作来深入研究和继续探讨。

REFERENCES (参考文献)

[1] BAO H B (鲍洪波), WANG J F (王晋芳), QIAN S J (钱世钧). Advances in research of uracil N-glycosylase. *Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2003, **23**(1): 43 - 47

[2] Nilsen H, Otterlei M, Haug T *et al.* Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(4): 750 - 755

[3] Otterlei M, Haug T, Nagelhus T A *et al.* Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localization signal and a strong classical mitochondrial localization signal, respectively. *Nucleic Acids Research*, 1998, **26**(20): 4611 - 4617

[4] Cappelli E, Hazra T, Hill J W *et al.* Rates of base excision repair are not solely dependent on levels of initiating enzymes. *Carcinogenesis*, 2001, **22**(3): 387 - 393

[5] Haug T, Skorpen F, Lund H *et al.* Structure of the gene for human uracil-DNA glycosylase and analysis of the promoter function. *FEBS Letters*, 1994, **353**: 180 - 184

[6] Haug T, Skorpen F, Aas P A *et al.* Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids research*, 1998, **26**(6): 1449 - 1457

[7] Hoeijmakers J H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 2001, **411**(6835): 366 - 374

[8] Buemeyer A B, Deschenes S M, Baker S M *et al.* Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet*, 1999, **33**: 533 - 564

[9] Sancar A. DNA excision repair. *Annu Rev Biochem*, 1996, **65**: 43 - 81

[10] Olsen L C, Aasland R, Wittwer C U *et al.* Molecular cloning of human uracil - DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *J EMBO*, 1989, **8**(10): 3121 - 3125

Cloning of Human Uracil N-glycosylase and Its Detection in Cancer Tissues by Quantitative RT-PCR

BAO Hong-Bo¹ ZHANG Chuan-Bao¹ WANG Jin-Fang¹ ZHOU Chuan-Nong² LIU Fang²
ZHAO Xiao-Hang² QIAN Shi-Jun^{1*}

¹(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

²(National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

Abstract The uracil in DNA comes from either the misincorporation of dUTP in place of dTTP or deamination of cytosine. In the latter case, it can result in a GC to AT transition mutation if the uracil is not removed before DNA replication. Base excision repair(BER) is a major pathway for removing DNA lesions arising from endogenous processes as well as those induced by exposure to exogenous chemicals or irradiation. BER is initiated by DNA glycosylases that excise aberrant bases from DNA by cleavage of the N-glycosidic bond linking to the base of its deoxyribose sugar. Uracil N-glycosylase(UNG) is the enzyme responsible for the first step in the BER pathway that specifically removes uracil from DNA. The UNG gene undergoes both temporal and spatial regulation mainly at the level of transcription. Normally cancer cells undergo over-proliferation and up-regulate their UNG during tumorigenesis. In this study we examine the correlation between UNG level and carcinogenesis, and explore the possibility of using UNG as a marker for cancer diagnosis. Human UNG gene was amplified from the total RNA of the human choriocarcinoma cell line, JEG-3, by RT-PCR. After purification, the 942bp full-length UNG cDNA coding sequence was digested with *EcoR* I and *Sal* I, and cloned into the digested pET-21 to construct a recombinant vector, pUNG. The UNG protein was expressed under the control of T7 promoter in *E. coli* BL21(DE3) cells induced with IPTG. After ultrasonic treatment, the cell lysate and precipitate were analyzed by SDS-PAGE and a 39kD band was detected. The plasmid was serially diluted at appropriate concentrations and employed as standards in the subsequent quantification. Total RNAs were extracted from 18 pairs of clinical samples, each pair contains a sample of esophageal squamous cell carcinoma(ESCC) tissue and its surrounding normal esophageal epithelia. The copy numbers of UNG mRNA in these RNA samples were determined by real-time quantitative RT-PCR using a Lightcycler(Roche). UNG was present in 13 cases of ESCC(13/18, $n = 18$) but absent in all of the normal tissues. The results indicated that there was a correlation between high level of UNG expression and the carcinogenesis of ESCC.

Key words UNG, quantitative PCR, esophageal squamous cell carcinoma

Received : 03-10-2003

This work was supported by a Grant from the National Natural Science Foundation of China(No.39990570-4).

* Corresponding author. Tel 86-10-62651598, Fax 86-10-62651598, E-mail qianhs@im.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>