

细胞中多种基因转录的同步研究方法 ——逆转录标记 cDNA 技术的介绍*

沈珣珩 刘泽津** 吴宁华

(中国医学科学院基础医学研究所分子生物学与生化研究室, 北京)

提 要

本文对以细胞中总 poly A⁺ RNA 为模板, 通过逆转录酶制备标记的第一链 cDNA 探针的最佳反应条件和纯化方法进行了研究, 并探讨了这一方法的应用价值。本文为同步研究多种基因在细胞中的表达提供了一可行的新途径。

随着生物科学的迅猛发展, 对真核细胞基因表达及调控研究日益广泛深入。为迅速掌握某种陌生细胞中不同基因表达的大致情况, 或经特定条件处理后各种基因转录本丰度 (abundance) 的变化, 我们探索了一种新途径, 即以细胞中总 poly A⁺ RNA 为模板, 通过逆转录获得同位素标记的第一链 cDNA 探针, 再与我们感兴趣的克隆基因进行斑点杂交, 从而在一次实验中获得有关基因在该细胞中转录情况的轮廓性知识。

材 料 与 方 法

一、poly A⁺ RNA 的分离与纯化 按本实验室报道的异硫氰酸胍 (GITC)/氯化铯 (CsCl) 超速离心和 oligo dT 纤维素亲和层析法制备人淋巴细胞 poly A⁺ RNA^[1]。

二、³²P 标记第一链 cDNA 探针的制备 基本按本实验室合成 cDNA 的条件^[2], 在 50 μ l pH 8.3 的乙酸盐缓冲体系 (50 mmol/L Tris-OAc pH 8.3, 138 mmol/L KOAc, 6 mmol/L Mg(OAc)₂, 10 mmol/L NaOAc, 20 mmol/L DTT) 中, 加入 2 μ g poly A⁺ RNA, 5 μ g oligo-dT₁₅, dCTP, dGTP, dTTP 各 500 μ mol/L, dATP 50 μ mol/L, α -³²P-dATP (美国 NEN 产品 3,000 Ci/mmol) 50 μ Ci, 逆转录酶(美国

Life Science 或 Clontech) 100 U, 37°C 保温 60 分钟后加 EDTA 至终浓 2.5 mmol/L。经 65°C 10 分钟处理后加入 RNaseA 1 μ g, 37°C 保温 2 小时, 酚/氯仿抽提后, 加入鱼精 DNA 5 μ g, NaOAc/乙醇反复沉淀三次即可得到合用的 cDNA 探针。

三、斑点杂交及放射自显影 待检测的克隆基因片段约 0.3—0.5 pmol 溶于 15 $\times$ SSC 中, 变性后用美国 BRL 公司的斑点印迹仪使 DNA 结合在硝酸纤维素膜(美国 S&S 公司, 0.45 μ) 上, 经 80°C 烘烤 2 小时后备用。按文献方法^[3,4] 制备 50% 甲酰胺, 5 $\times$ Denhardt's 液, 5 $\times$ SSPE, 0.1% SDS, 50 μ g/ml 鱼精 DNA 组成的预杂交液, 和外加 10% 硫酸右旋糖苷, 第一链 cDNA 探针 (1—2 $\times$ 10⁶ cpm/ml) 的杂交液, 先后在 42°C 进行预杂交和杂交 (4 和 24 小时)。分别用预热至 40°C 的漂洗液 (2 $\times$ SSC, 0.1% SDS 和 0.1 $\times$ SSC, 0.1% SDS) 洗膜。用保鲜膜包裹在 -70°C 加增敏屏进行放射自显影。

结 果 与 讨 论

研究细胞内基因表达的经典方法是标记已知基因 DNA (片段或寡核苷酸) 或其转录本

* 中国科学院科学基金资助课题。

** 中国协和医科大学 82 级学生。

RNA, 制备成 DNA 或 RNA 探针, 与细胞内转录的 RNA 进行分子杂交。这种方法最大的局限性是每标记一次只能了解一种基因在细胞中表达的情况。对陌生细胞的研究带有一定的“盲目性”。此外, 为要获得多种基因在某细胞中表达的相互消长关系, 需要进行多次标记和杂交, 不仅工作量增加许多倍, 其可比性相对较差必须设置严格的对照组。为克服上述困难我们研究了以特定条件下体内转录的总 poly A⁺ RNA 为模板标记第一链 cDNA 的简便方法。

为同步观察细胞内各种基因转录本的丰度至少有可能在三个不同的水平制备探针: 细胞裂解液中的总 RNA; 经过寡聚胸苷纤维素纯化的总 poly A⁺ RNA 或以 poly A⁺ RNA 为模板逆转录合成 cDNA。我们未采用前两种方法是由于 (1) RNA 探针较不稳定, 容易降解, 操作上较为复杂; (2) 总 RNA 在分离制备上虽简便然而其中大量核糖体 RNA 尽管不与编码基因杂交但可导致标记物的浪费、poly A⁺ RNA 标记量相对降低以及杂交背景过强; (3)

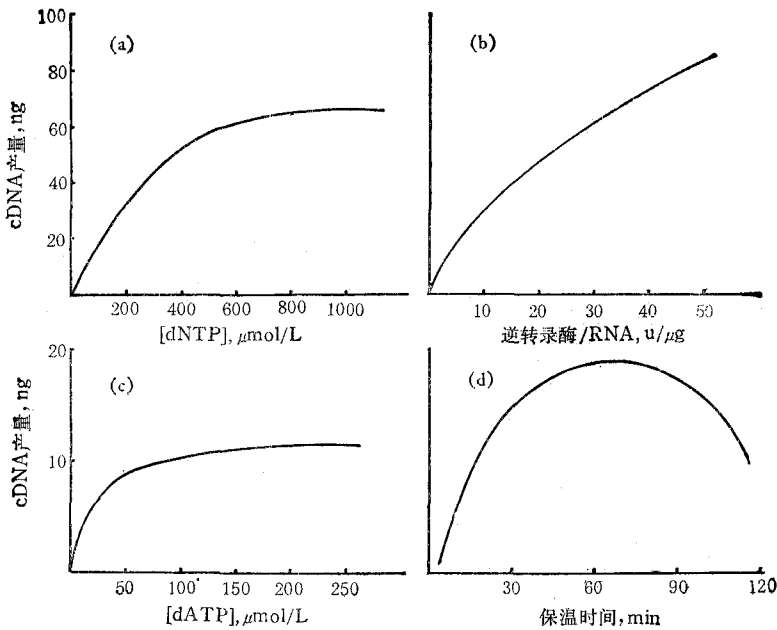


图 1 不同因素对 cDNA 合成的影响

对 RNA 直接标记只限于 5' 或 3' 两个末端上, 产物的比放射性相对较低, 同时用于 5' 末端标记的 T 4 多聚核苷酸激酶市售制剂中有时含有 RNA 酶的活力^[9]。因此, 我们选择了制备 cDNA 探针以达到较高的比放射性并获得足够的产量使不同的转录本杂交后显示出丰度的差别。

我们采用 α -³²P-dATP 在乙酸盐体系中^[2]进行逆转录标记。由于 ³²P-dATP 和逆转录酶十分昂贵不可能无限地加大用量, 为此我们对底物浓度 [dNTP]、[dATP], 逆转录酶浓度和保温时间对 cDNA 合成的影响进行了研究, 结果如图 1 所示。

图 1a 显示 dNTP 浓度在 500 $\mu\text{mol/L}$ 以上 cDNA 产量曲线转平, 若将 dCTP、dGTP、dTTP 的终浓度保持在 500 $\mu\text{mol/L}$ 改变 dATP 浓度(图 1b), 发现后者在 50 $\mu\text{mol/L}$ 时是合成曲线的转折处, 为保证 cDNA 的足够产量和 ³²P-dATP 的高效参入, 我们确定 [dNTP] 500 $\mu\text{mol/L}$, [dATP] 50 $\mu\text{mol/L}$ 的反应条件。此时, 用美国 Life Sciences 公司的逆转录酶进行反应, cDNA 合成量在实验范围内随酶量增加而上升(图 1c), 我们只能根据实际可能性使用 25—50 U/ μg RNA 以保证 cDNA 的产量。然而为检测高表达基因转录本时有可能适当降低

逆转录酶的用量。

在 50 μl 的上述体系中, 以 2 μg poly A⁺ RNA 为底物, 第一链 cDNA 产量约为 0.1 μg (产率 5%), 比放射性平均为 $2.5 \times 10^7 \text{ cpm}/\mu\text{g}$ 。cDNA 片段大小在 0.1—1 kb 之间, 大部分在 0.5 kb 左右。与以往结果比较, 产率和片段大小都明显降低, 这主要是因为 [dNTP] 用量由 1000 $\mu\text{mol/L}$ ^{[2]*} 降至 500 甚至 50 $\mu\text{mol/L}$ 所致。考虑到本实验中 cDNA 拷贝数和比放射性较片段完整性更为重要, 因此, 用这一体系制备 cDNA 探针仍然是可行的。

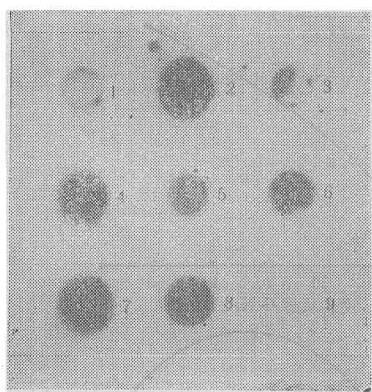


图 2 斑点杂交放射自显影图谱

cDNA 杂交探针: 热休克 T 细胞 (PHA 活化)

DNA 斑点: 1. IL2R 2. TcR- β 3. v-abl 4. v-myc
5. c-myc 6. v-fos 7. Ki-ras 8. IL2 9. Tfr

为将模板 RNA 与标记的 cDNA 探针分离, 我们分别尝试了碱处理、热变性和 RNA 酶解三种方法。结果表明 RNA 酶解最简便而有效。碱处理所得到的 cDNA 虽较纯但需中和, 手续较繁琐。加热变性后虽可获得游离的 cDNA, 但体系中大量 poly A⁺ RNA 仍可干扰杂交结果, 因此需与 RNA 酶解法联用。

用本研究体系可测得大约 10^7 细胞中基因转录本丰度的变化。根据本实验室以往的经

验^[6], 用 GITC/CsCl 超离心法制备 poly A⁺ RNA 的效率, 我们至少以 10^8 细胞作为起始材料制备探针。

本方法的局限性主要为下列两方面:

1. 只反映基因转录本数量的差别, 不能显示出基因突变或转录本长度的改变;

2. 不能准确定量: 在探针标记过程中, 除 poly A⁺ RNA 丰度外, 各种 cDNA 所含 dA 组成不同, 转录效率不同, cDNA 长度也不同, 此时含有较多 dA、cDNA 较长的探针必然带有较高的放射性使杂交自显影结果偏强。其次, 在进行放射自显影时, 未经预曝光 (pre-flash) 的 X-光胶片感光程度不完全与放射性强度成正比^[7], 而国产 X-光胶片自身本底较深难以获得良好的预曝光效果。

鉴于上述特点, 我们仅将此方法用于比较研究各类型细胞间、同一细胞经不同条件处理以及具有同类性质的基因表达的消长, 获得较满意的结果 (图 2)。

参 考 文 献

- [1] 沈翔非等:《生物化学杂志》1987, 3(2), 131。
- [2] 沈翔非等:《生物化学与生物物理进展》1986, (6), 62。
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning—A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982, 447—448.
- [4] Berent, S. T. et. al.: *Biotechnology*, 1985, May/June, 208.
- [5] Cannistaro, V. J. and Kennell, D.: *Focus* 1987, 9 (2), 11.
- [6] 沈翔非: *J. Cell. Physiol.* 1986, Suppl. 4, 35.
- [7] Laskey, R. A.: *Radioisotope Detection by Fluorography and Intensifying Screens*, Amersham International Plc., Amersham, 1984, 16—21.

[本文于 1988 年 2 月 12 日收到]

* 参考文献 [2] 第一链 cDNA 合成时 dNTP 终浓度各 1 mmol/L, 文中误为 20 $\mu\text{mol/L}$, 特此更正。

(上接第 141 页)

- 44.
- [2] Girad, M.: *Methods in Enzymology*, 1967, 12, 581.
- [3] Kirby, K.S.: *Biochem. J.*, 1956, 64, 405.
- [4] Mueller, J. et al.: *Eur. J. Immunol.* 1975, 5, 270.
- [5] Manconi, P.E. et al.: *Scand. J. Immunol.* 1979,

9, 99.

- [6] 郭婵等:《肿瘤》, 1983, 3(1), 18.
- [7] Rinse, J.: *Am. Laboratory*, 1982, 14(10), 92.

[本文于 1988 年 2 月 2 日收到]