

技术与方法

RNase 保护法同时检测黄体生成素受体及
17 α -羟化酶的 mRNA时 宇¹⁾ 史凌云 梁克珊²⁾ 张志文

(北京医科大学基础医学院生理系, 北京 100083)

摘要 睾酮是组织中主要雌激素雌二醇的前体, 在卵巢内睾酮绝大部分转为雌二醇. 睾酮的生成直接受垂体的黄体生成素和睾酮合成的限速酶 17 α -羟化酶的调控. 用液相杂交的方法, 同时检测了卵巢组织中黄体生成素受体和 17 α -羟化酶的基因表达, 并摸索出了最适条件. 为今后进一步研究卵巢的功能, 提供了新的手段.

关键词 黄体生成素受体 (LHR), 17 α -羟化酶, RNase 保护测定法

液相杂交是核酸酶保护测定法 (ribonuclease protection assay, RPA) 的简称. 其基本原理是以过量的放射性标记的 RNA 探针与靶 mRNA 在溶液中杂交, 用核酸酶消化未杂交的 RNA, 随后通过变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影, 进行放射标记的 RNA:RNA 杂交体的检测和定量. 由于该法 RNA:RNA 杂交在溶液中进行, 其杂交效率较 RNA 印迹法的固-液杂交要高. 灵敏度可大于后者 10~20 倍, 是检验组织细胞中低丰度 RNA 的有效手段. 此外, 应用液相杂交还可对两种或两种以上的 mRNA 同时进行检测.

睾酮是卵巢组织中主要雌激素雌二醇 (estradiol, E₂) 的前体. 在卵巢内睾酮绝大部分转为 E₂. 睾酮的生成直接受垂体的黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 的调控. 但卵巢组织中黄体生成素受体 (LHR) 和睾酮合成限速酶 17 α -羟化酶的基因表达决定了细胞对 LH 的反应性. 因此, 同时检测卵巢组织 LHR 和 17 α -羟化酶 mRNA 水平的变化, 对深入了解两者之间的相互关系及其在 E₂ 合成中的作用有重要意义. 为此, 几经摸索, 我们建立了应用

RNA 保护法同时测卵巢组织中 LHR 和 17 α -羟化酶基因表达的方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物: 雌性成年 Wistar 大鼠, 由北京医科大学实验动物中心提供.

1.1.2 药品及试剂: 实验所用试剂及 Bgl II 内切酶、Pvu II 酶、Tg₁ 和 SP₆RNA 聚合酶及 RNA 酶 A 和 RNA 酶 T₁ 为 Promega 公司产品. pGEM-3Z 和 pGEM-4Z 质粒由 Janice Chou (NICHD) 提供. 其它药品及试剂均为 Sigma 公司产品.

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取: 以 P. Chomezynski 等^[1]的异硫氰酸胍一步法提取大鼠卵巢组织的总 RNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 质量 (无降解), Du-7 紫外分光光度计 (Beckman) 测定 RNA 浓度.

¹⁾北京师范大学生物系.

²⁾河北省职工医学院生化教研室.

收稿日期: 1994-10-27, 修回日期: 1995-02-21

1.2.2 cRNA 探针的制备与标记: 为得到 LHR 的反义 cRNA 探针, 先用 BglII 内切酶将 pGEM-4Z 质粒线性化, 然后用 T₇ RNA 聚合酶体外转录合成相应于 LHR cDNA 第 441~849 bp 的 cRNA 探针(408 bp). 17 α -羟化酶的 cDNA 构建于 pGEM-3Z 质粒上, 用 pVU II 酶线性化后, 以 SP₆ RNA 聚合酶体外转录相应于 17 α -羟化酶 cDNA 830~1394 bp 的反义探针(564 bp). 其比活性 cpm 值是 5×10^8 每微克.

1.2.3 RNA 酶 A 和 RNA 酶 T₁ 液相杂交技术: ³²P 标记的 RNA 在液相中与被检样品 RNA 进行杂交, 互补的 RNA 形成双链结构. 再用 RNA 酶 A 与 RNA 酶 T₁ 切除单链 RNA, 双链区对此二酶有抗性, 因而待检 RNA 被保护. 具体操作如下:

a. 在 eppendorf 管中加入 5~20 μ g 的总 RNA, 干燥后加入 80% 甲酰胺杂交缓冲液 (80% 去离子甲酰胺; 40 mmol/L PIPES, pH6.7) 20 μ l.

b. 加入 cpm 值为 $2 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$ 已标记好的反义 RNA 探针, 90℃ 变性后于 40~55℃ 孵育过夜.

c. 加 RNA 消化缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5; 5 mmol/L EDTA; 300 mmol/L NaCl) 200 μ l, 内含 RNA 酶 A 1 μ g; RNA 酶 T₁ 20 U, 37℃ 下孵育 30 min.

d. 加 10% SDS 20 μ l 和蛋白酶 K 10 μ l (10 g/L), 37℃ 下孵育 30 min 以终止反应.

e. 加水饱和酚 300 μ l, 涡旋振荡 1 min, 13 000 r/min 离心 5 min, 取上清.

f. 加 100% 冷乙醇 0.8 ml, 涡旋振荡 30 s, -20℃ 贮存 30 min.

g. 13 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 以 70% 冷乙醇洗涤.

h. 干燥后加 80% 甲酰胺上样缓冲液 8 μ l, 90℃ 变性 5 min 后, 迅速置冰浴中冷却.

i. 在含 5% 的聚丙烯酰胺, 8 mol/L 尿素的凝胶中电泳, 1×TBE 缓冲液作为电泳液, 1500~1700 V 恒压下电泳 60~80 min.

j. 取下胶后, 轻轻揭去一侧玻璃板, 80℃

抽干 3 min.

k. 在 X 光片上放射自显影.

2 结 果

2.1 杂交温度

我们分别在 40℃, 46℃ 和 55℃ 三个不同温度下进行液相杂交, 并用人甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 的反义探针 (139 bp, 杂交后被保护片段为 100 bp) 校正总 RNA 的上样量. 结果 17 α -羟化酶的基因只在 46℃ 条件下, 才能表达 (图 1). 其被保护的 RNA 片段为 475 bp.

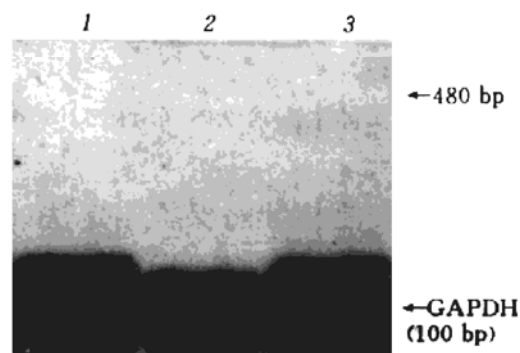


图 1 不同杂交温度的影响

1: 40℃; 2: 55℃; 3: 46℃.

2.2 探针剂量

实验中分别使用 cpm 值为 1×10^5 , 2×10^5 和 4×10^5 的反义 RNA 探针进行液相杂交. 结果 17 α -羟化酶和 LHR 的基因表达均在 cpm 值

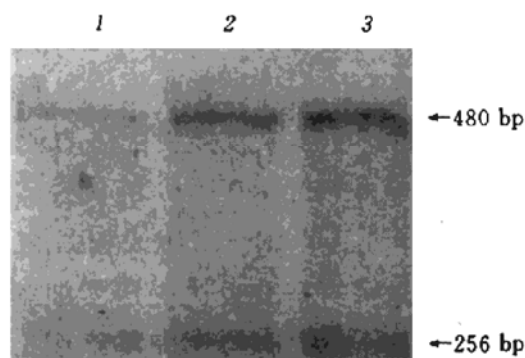


图 2 不同剂量探针对液相杂交的影响

1: 1×10^5 ; 2: 2×10^5 ; 3: 4×10^5 .

为 4×10^5 条件下效果好 (图 2). 故确定探针剂量 cpm 值为 4×10^5 . LHR 基因被保护 RNA 片段长度为 256 bp.

2.3 RNA 上样量

实验中总 RNA 上样量为 5~20 μg , 结果表明: 随总 RNA 量的增多, 二者基因表达信号也随之增强 (图 3, 4).

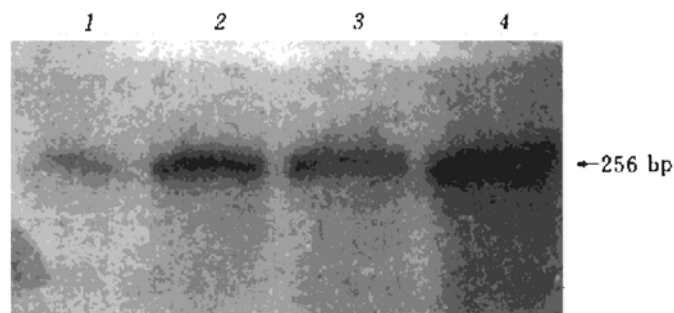


图 3 不同总 RNA 中 LHR mRNA 含量

1: 5 μg ; 2: 10 μg ; 3: 15 μg ; 4: 20 μg .

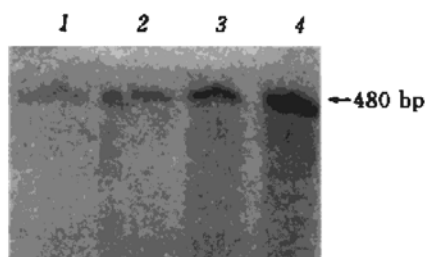


图 4 不同总 RNA 中 17 α -羟化酶 mRNA 含量

1: 5 μg ; 2: 10 μg ; 3: 15 μg ; 4: 20 μg .

2.4 17 α -羟化酶与 LHR 基因表达的同时检测

确定了上述实验条件后, 在一次液相杂交中, 我们同时加入了 17 α -羟化酶和 LHR 两种 cRNA 探针. 结果同时清晰地显示出了二者的基因表达 (图 5).

2.5 液相杂交的敏感性

为了比较液相杂交与 RNA 印迹法的敏感性, 我们用上述两种方法同时检测了样品 β -actin 的基因表达. 结果表明: 当总 RNA 上样量为 5.0 μg 时, RNA 印迹法才能显示, 而液相杂交则能检出总 RNA 为 0.63 μg 时的 β -actin 的基因表达, 且比 RNA 印迹显示得更清

晰. 由此看来, 液相杂交的敏感性比 RNA 印迹约高 7 倍 (图 6).

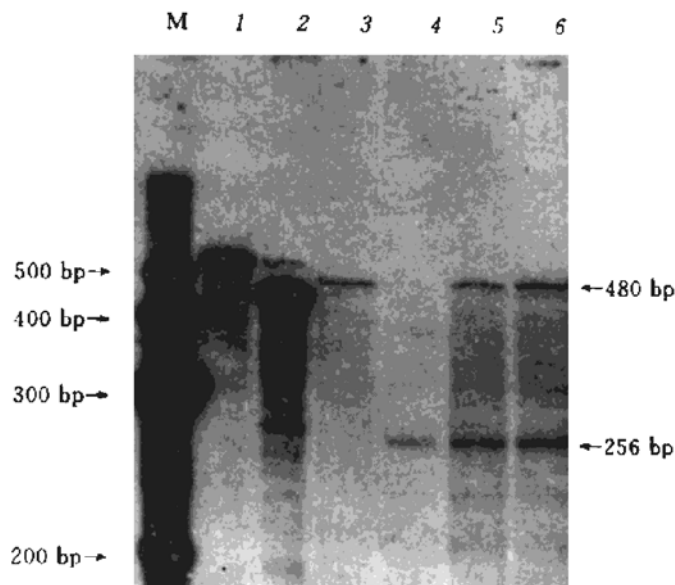


图 5 同时检测 LHR 和 17 α -羟化酶的基因表达

Mr: 标准; 1: 17 α -羟化酶探针; 2: LHR 探针; 3: 17 α -羟化酶 mRNA 被保护片段; 4: LHR mRNA 被保护片段; 5、6: 同时加入 LHR 和 17 α -羟化酶 cRNA 探针液相杂交后的 mRNA 被保护片段.

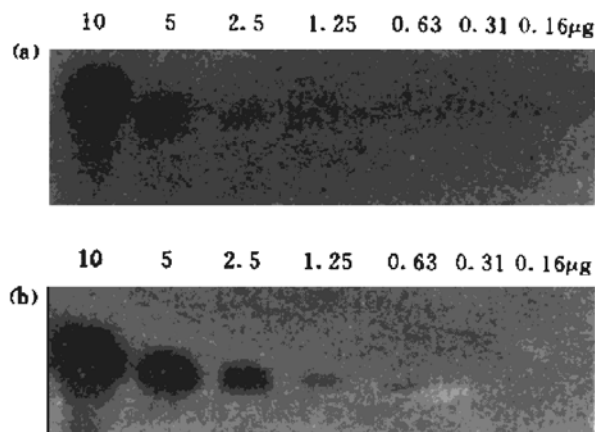


图 6 RPA 与 RNA 印迹敏感性比较

(a): RNA 印迹; (b): RPA.

3 讨 论

建立灵敏精确的测定 mRNA 分子的方法, 是细胞和分子生物学研究的一个重要领域. 目前各国实验室普遍应用的方法包括: 原位杂交、RT-PCR、液相杂交和 RNA 印迹法. 其中

原位杂交最敏感,理论上细胞内有10个靶mRNA即可得到阳性信号^[2],但该方法技术要求高,难于进行大量样品的比较. RT-PCR灵敏度也很高,但精确性差是其主要缺点,这是因为内标准引物与靶mRNA引物的扩增效率不一致,这一棘手难题尚未得到解决. RNA印迹法应用较为广泛,但是亦存在着灵敏度低,重复性差的缺点. 以poly(A)⁺替代总RNA虽增高了灵敏度,但前者制备过程复杂,回收率难以保持恒定. 由此看来,液相杂交具有灵敏度高、快速和可同时检测多种靶RNA的优点, RPA可检测丰度在pg级RNA的存在^[3],从标记探针到出结果仅需2 d.

在使用RPA时,对杂交温度RNA酶与探针剂量及被检RNA的上样量都需经过预实验来确定,我们的结果为大家今后开展RPA提供了参考. 杂交温度的选择主要取决于探针中G、C碱基的含量以及形成双链RNA的长度,通常使用温度40~55℃. 我们用17 α -羟化酶的基因表达进行预实验,发现46℃时,信号表达最好. 同样条件下加入LHR cRNA探针,也有明确的信号. RPA中使用RNA酶的剂量是至关重要的,过量会导致双链RNA降解,不足又会使单链RNA降解不彻底,出现假阳性. 我们几经摸索,发现对LHR和17 α -羟化酶基因表达的最适剂量为200 μ l RNA消化缓冲液中含RNA酶A 1 μ g, RNA酶T₁ 20 U. 与RNA印迹法不同, RPA要求探针的量大于靶RNA,因此,我们选用低比活度的 α -³²P-dUTP (8 $\times$ 10⁵ Ci/mol)用于标记,加入的剂量为每反应管cpm值为4 $\times$ 10⁵. 被检RNA的上样量对结果也有影响,太少无信号,太多则又会抑制RNA酶降解单链的RNA探针,我们在实验中的上样量为5~20 μ g,都有信号. 聚丙烯酰胺/尿素变性电泳时间根据RNA的长度而定,400 bp在1500~1700 V条件下,电泳时间为60~80 min. 自显影的曝光时间可根据干胶后信号的强弱而定.

生理条件下,在下丘脑-垂体-卵巢轴的调控下,卵巢的功能发生周期性变化. 在这种变

化过程中,促性腺激素及性类固醇激素对卵巢组织有直接调控作用,而性激素与LH及LHR之间也有相互作用. 17 α -羟化酶是合成睾酮的限速酶,正常情况下卵巢组织中的睾酮主要来源于基质细胞^[4]. LHR广泛分布于卵巢组织各种细胞^[5], LH通过LHR作用于雄激素前体,为雄激素的合成提供了原料^[5]. 而后17 α -羟化酶活性的强弱,会直接影响雄激素合成的多少. 因而, LHR和17 α -羟化酶的基因表达决定了细胞对LH的反应性,也决定了雄激素合成的数量.

LH作用于卵巢组织中的基质细胞后,使卵巢中雄激素合成增多,而增多的雄激素又会使细胞膜上的LHR减少^[6],即在雄激素数量于LH作用之间存在着负反馈调节. 睾酮在卵巢组织中绝大部分转变成E₂. 因此,建立同时检测LHR和17 α -羟化酶基因表达的方法,为今后更深入地了解性激素在卵巢内的调节作用、相互之间的变化及影响提供了一个很好的研究方法.

参 考 文 献

- 1 Chomeyznski P, Petal Y C. J Clin Endocrinol Metab, 1981; 53: 372
- 2 Bergert S L, Kimmel A R. Methods Enzymol, 1987; 152: 215
- 3 Ernest S K. PCR protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press, 1990: 21
- 4 程治平. 内分泌生理学. 北京: 人民卫生出版社, 1984: 320~321
- 5 池芝盛. 内分泌学基础与临床. 北京: 北京科学技术出版社, 1992: 432~433
- 6 Bruno L, 刘学高等译. 生殖内分泌学原理与临床应用. 广州: 暨南大学出版社, 1988: 9

Simultaneous Detection of 17 α -hydroxylase and Luteinizing Hormone Receptor (LHR) mRNA from Rat Ovary by Ribonuclease Protection Assay (RPA). Shi Yu¹⁾, Shi Lingyun, Liang Keshan²⁾, Zhang Zhiwen (Department of Physiology, Beijing Medical University, Beijing 100083, China; ¹⁾ Department of Biolo-

gy, Beijing Normal University, Beijing 100875, China; ²⁾ Department of Biochemistry, Hebei Worker's Medical College, Baoding 071000, China).

Abstract Testosterone is prehormone of estradiol and most of it will converted to estradiol in ovary. The production of testosterone was regulated directly by luteinizing hormone and 17 α -hydroxylase which is the rate-limiting enzyme in the production of testosterone. So 17 α -hydroxylase and LHR

gene expression reflect the response to LH of ovarian cells. In order to investigate the ovarian functions, the 17 α -hydroxylase and LHR gene expression was detected simultaneously by using ribonuclease protection assay (RPA) and the sensitivity of RPA is about 8 times more compared with Northern blot.

Key words luteinizing hormone receptor (LHR), 17 α -hydroxylase, ribonuclease protection assay (RPA).

用复合孔雀绿分析无机磷的改良方法

伍期专 王润英* 王燕华 包鹤丘

(北京医科大学第一医院神经病学研究室, 北京 100034)

摘要 在研究酸度、钼酸钠浓度及孔雀绿浓度对显色影响的基础上, 用复合孔雀绿试剂分析无机磷, 该方法平行程度很好. 测定 10 个标准管光吸收的标准差 = 0.0065, 变异系数 = 1.26%, 可以用于测定 Na⁺, K⁺-ATP 酶活力等.

关键词 孔雀绿, 磷, ATP 酶

孔雀绿法分析无机磷是一种灵敏度很高的方法^[1]. 因此在医学生物学领域有广泛的用途. 例如, 可以通过测定 ATP 酶水解 ATP 产生无机磷的量达到分析 ATP 酶活力的目的^[2]. 用来分析蛋白磷酸酶活力^[3], 作为聚丙烯酰胺凝胶的磷酸酶染色的一种技术等^[4]. 但是, 采用试剂分批加入的方法不够稳定, 变异较大, 在分析活力较低的人红细胞膜上的 Na⁺, K⁺-ATP 酶时非常明显. 要解决这一问题首先须减小定磷中的误差来源. 由于孔雀绿呈色的影响因素复杂^[5], 显色剂及局部酸度对于呈色有重大影响, 显色剂分次加入的加样方式, 时间间隔的差别都会对结果产生不可忽视的影响. 虽然并不是每一种方法都可能制成复合显色剂, 但复合显色剂的优点是显然的. 一些经典的定量分析方法, 如 Lowry 蛋白定量法等均采用复合成分的显色液^[6]. 本文在研究不同因素对呈色影响的

基础上, 反复试验进行筛选制成了复合孔雀绿试剂. 其试剂比 Lanzetta^[7]的方法配制更加方便, 价格低且易于得到. 现将结果报道如下.

1 材料及方法

1.1 仪器与试剂 Shimadzu MPS-200 型分光光度计, 日本岛津公司生产. 孔雀绿, 化学纯, 北京旭东化工厂生产. 其余均为中国产分析纯以上试剂.

1.2 方法 研究酸度以及钼酸钠和孔雀绿浓度对显色灵敏度影响的实验中, 基本方法如下: 取磷标准液 (30 μ mol/L) 0.2 ml, 加入 0.23 ml 钼酸钠 (25 ~ 300 mmol/L), 再加入 0.6 ml 盐酸 (0.16 ~ 2 mol/L) 及 0.7 ml 孔雀绿 (0.037% ~ 0.444%). 2 min 后加入

*太原铁路中心医院, 太原 030013.

收稿日期: 1994-11-08, 修回日期: 1995-02-21