

介绍一种快速印迹杂交法

唐建清 邵国英 周丹宜 徐荣婷 陈诗书

(上海第二医科大学生物化学教研室)

提 要

本文介绍一种快速的细胞 mRNA 及 DNA 印迹法。本方法以细胞数为单位,将细胞破碎后在高浓度 NaI 存在的条件下直接点样于硝酸纤维滤膜上用于核酸的杂交。用本方法可以检测细胞中特异 mRNA 和 DNA 的含量,主要用于细胞中特异 mRNA 的半定量分析和不同细胞之间特异 mRNA 表达的比较,也适用于分析比较细胞接受各种刺激前后特异 mRNA 含量的变化。

用经典的 Northern Blot 或 Dot Blot 法测定细胞中特异 mRNA 含量时,需要提取细胞的 RNA 成份,分离出 PolyA 阳性的 RNA (主

便,也可照 C_{50} 值 $1.4\text{ng}/1.7\text{ml}$ 计算。 C_{50} 值可重复测定的变异系数 (C. V%) 为 5.8%; 复管可重复测定的变异系数 (C. V%) 为 8.7%。表明本测定体系比较稳定。

八、肺淋巴液、血、肺组织匀浆及肺灌洗液 SOD 活力和肺淋巴 SOD 清除量的测定

我们用本测定体系测定了山羊烟雾吸入性损伤早期肺淋巴液、动、静脉血、肺组织匀浆及肺灌洗液粗提取样品的 SOD 活力和肺淋巴 SOD 清除量的变化,观察活性氧在烟雾吸入性肺损伤发生和发展过程中的作用,取得了满意的结果^[8]。

九、本测定体系的特点

1. 用液闪记数仪,可测出 O_2^- 激发鲁米诺所发出的微弱的化学冷光。通常依 C_{50} 值来判断测定的灵敏度,从 C_{50} 值看,本法的灵敏度较高。

2. 鲁米诺的化学发光受 O_2^- 的激发而产生, SOD 的底物也只有 O_2^- , 所以, 此测定体系特异性较强。而且测定中不受乙醇、氯仿等有

要为 mRNA), 再用电泳分离转移或直接固定于硝酸纤维滤膜上, 与特异的同位素标记探针杂交, 然后根据杂交带(点)放射性强度的大小机溶剂及心绿染料的影响, 可以测定粗提取的生物样品。

3. 测定步骤少, 操作简便, 易于掌握。且化学发光反应速度快, 测定时间短。由于测定灵敏度高, 用微量的样品即可。

综上所述, 本测定体系适用于常规的重复检测, 对实验研究及临床常规检测有一定价值。

参 考 文 献

- [1] McCord, J. M. et al.: *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049, 1969.
- [2] Hyland, K. et al.: *Analytical Biochem.*, **135**, 280, 1983.
- [3] Marklund, S., et al.: *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469, 1974.
- [4] 刘次伯等《西安医学院学报》, **4**, 345, 1983.
- [5] Richard, E., et al.: *Analytical Biochem.*, **116**, 142, 1981.
- [6] 李益新等:《生物化学与生物物理进展》, **2**, 59, 1983.
- [7] Hyland, K., et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **102**, 531.
- [8] 赵琢道等:《中华实验外科杂志》, 待发表。

[本文于 1986 年 11 月 24 日收到]

来判断特异 mRNA 的含量。因为 mRNA 的稳定性差,在分离纯化过程中暴露时间长,损失较多,加上提取时需要较多的细胞和某些大型仪器,给实验带来了较大的难度。另外,特异 mRNA 在总 mRNA 中的相对含量受总 mRNA 的变化而波动,故定量的测定需要一些特殊要求(如需找一个内标准以便估计特异 mRNA 在总 mRNA 量变化时波动的大小)。

本文介绍一种快速印迹杂交法 (Quick Blot)^[1-3],可以用较少的细胞估算细胞中特异 mRNA 含量。快速印迹杂交法由 D. Gillespie 在 1983 年首先建立。它以细胞数为单位,将细胞破碎后,在高浓度碘化钠存在的条件下,直接点样于硝酸纤维滤膜上。滤膜不需经真空烘烤步骤即可用于核酸的杂交。此法操作简单,不需要大型仪器设备,细胞用量少,操作速度快。用本法不仅可以固定 mRNA,条件稍加改变还可以固定 DNA。特别适于大量样品的测定。

材料与方 法

一、材料

蛋白酶 K, RNase, 甲酰胺 (MERCK), DNaseI (Sigma), 硝酸纤维滤膜 (S&S, BA85, 孔径 $0.45\mu\text{m}$), 放射自显影正片(上海感光材料厂, P-5F), α - ^{32}P -dCTP (比放射性为 3000Ci/mmol) 缺口平移标记药盒 (Amersham), Brij 35 (Koch-Light), 脱氧胆酸钠 (DOC) 和放线菌酮 (Fluka)。其余试剂为国产分析纯。各种试剂(除蛋白质试剂和 NaI 外)均配于 dep H_2O 中(dep H_2O 为含 0.05% 焦碳酸二乙酯 (ALDRICH) 的重蒸水, 37℃ 保温过夜后 15 磅 20 分钟高压灭菌)。20 × SSC 为 3mol/L NaCl, 0.3mol/L 柠檬酸钠 (pH7.0), 20 × SSPE 为 3.0mol/L NaCl, 0.2mol/L Na_3PO_4 (pH7.4), 0.03mol/L EDTA, 50 × Danhardts 为 1% 聚蔗糖, 1% 聚乙烯吡咯烷酮, 20 × VRC (钒酰核苷复合物)按《分子克隆》合成。

二、点样装置

将 96 孔有机玻璃血凝板用略小于板上原有孔径的钻头将平板打穿,洗净后浸于 dep H_2O

中。用时取出平板,平放于有机玻璃胶成的小盒上,接缝处用凡士林密封。小盒边的抽气接头连于水泵或气泵上,点样时在血凝板上盖上滤膜即可。一般可根据需要设计不同的点样孔排列方式制作多块平板以备选用。这种点样装置制作容易,又避免了滤膜的浪费。

三、方法

1. 细胞样品处理

RNA 测定: 样品细胞经 1500rpm 离心 5 分钟后用等渗溶液 (0.9% NaCl 或 PBS, 每毫升加放线菌酮 $50\mu\text{g}$) 洗涤 2—3 次。细胞沉淀悬浮于 $88\mu\text{l}$ 1 × VRC 中快速冻融 3—4 次后加蛋白酶 K (10mg/ml) $2\mu\text{l}$,混匀并于 37℃ 保温 30 分钟。取出样品管加 10% Brij35 及 10% DOC 各 $5\mu\text{l}$ 混匀之,随之加入 3 倍体积 65—70℃ 之过饱和 NaI (每 2.5g NaI 加重蒸水 1ml, 于 75℃ 溶解) 混匀。样品按比例稀释后供点样。

RNase 或 DNase 处理样品: 细胞沉淀悬浮于 $86\mu\text{l}$ 重蒸水中,快速冻融后先加 RNase (10mg/ml) $2\mu\text{l}$ 或 DNaseI (1mg/ml) $10\mu\text{l}$, 37℃ 保温 2 小时后再加蛋白酶 K。

DNA 测定: 基本同 RNA 测定的操作。不同之处是细胞沉淀悬浮于 $98\mu\text{l}$ 重蒸水中,蛋白酶 K 处理样品后不加 Brij 35 和 DOC,而直接加过饱和 NaI,并在点样前于 100℃ 变性 5 分钟。点样过程中保持样品温度不低于 85℃。

2. 膜片制作

将硝酸纤维滤膜裁成适当大小放入 dep H_2O 中浸湿(如不易浸湿可将 dep H_2O 加热到 100℃)。滤膜移入 6 × SSC 中平衡数分钟,取出后置于点样装置上,在负压(可用水泵或气泵,样品滤过滤膜的速度不影响核酸的固定效果)下点样。点样时样品的温度不宜大于 65℃ (RNA 测定),每点体积为 $16\mu\text{l}$ 。点样完毕后立即将膜片放入 dep H_2O 中,室温下漂洗 3 次,每次 5 分钟。随后放入 70% 乙醇中,室温下漂洗 3 次,每次 5 分钟。再移入 0.1mol/L 三乙醇胺(使用时每 100ml 0.1mol/L 三乙醇胺中加 $250\mu\text{l}$ 乙酸酐)中平衡 10 分钟以上。取出滤膜

凉干后可直接用于预杂交,或密封于塑料袋中 4℃ 保存待用。一般可保存 20 天左右。

3. 预杂交和杂交

滤膜密封于塑料袋中加入预杂交液 (0.2~0.3ml/cm² 滤膜)。预杂交液含 10×Denhardt's, 热变性之鱼精 DNA 50μg/ml, 1×VRC, 6×SSC。预杂交的滤膜于 37℃ 保温 12—24 小时。杂交时, 倒出预杂交液, 加入杂交液 (0.1~0.05ml/cm² 滤膜)。杂交液含 50% 甲酰胺, 6×SSC, 0.05mol/L Na₃PO₄ pH7.5, 0.1% SDS 及 ³²P 标记的 DNA 探针 1.0×10⁶cpm/ml (加入前先在 50% 甲酰胺条件下 65℃ 保温 5 分钟)。杂交于 42℃ 水浴振荡下进行 24 小时。取出滤膜后在室温下先用 2×SSC, 0.1% SDS 洗涤二次, 每次 15 分钟, 再用 0.1×SSC, 0.1% SDS 洗涤二次, 每次 15 分钟。

4. 放射自显影

杂交后膜片凉干夹入放射自显影暗盒, 同时夹入感光正片于 -70℃ 置 4 天后用 Agfa-30, 20℃ 5 分钟显影感光片, 再用 F-5 20℃ 5 分钟定影。

结 果

一、样品经 RNase (DNaseI) 处理或不处理的比较

为了观察膜片上的核酸成份是否为 RNA, 我们取 4×10⁶HL-60 细胞, 经洗涤冻融后先用 RNase 处理样品, 然后再进行蛋白酶水解及以下步骤。用 ³²P 标记的 c-myc 探针 (0.4kb PstI 片段)^[4] 与之杂交得到的结果, 与不用 RNase 处理的样品相比较, 杂交点基本消失。说明固定在膜片上的确为 RNA 成份。同样, 在固定 DNA 的实验中如用 DNaseI 处理样品, 则杂交点同样会消失。说明此时膜片上确为 DNA 成份(图 1)。

二、膜片的重复使用和特异 mRNA 的检测

为了证实参与杂交者确实为特异 mRNA, 我们将相同数量的 HL-60 细胞在同一条件下制成两张膜片, 并分别与 ³²P 标记的 c-myc 探

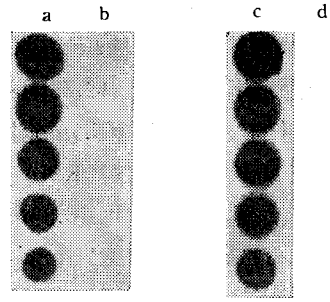


图 1 样品经 RNase (DNaseI) 处理或不处理的比较
a. RNA 固定, 样品未经 RNase 处理, b. RNA 固定, 样品经 RNase 处理 c. DNA 固定, 样品未经 DNaseI 处理, d. DNA 固定, 样品经 DNaseI 处理
从上到下细胞数分别为 2×10⁶, 1×10⁶, 5×10⁵, 2.5×10⁵, 1.25×10⁵ (下同)。

针和 v-ras^H (BS9) 探针^[5] 杂交。结果杂交点深度有明显的区别。将使用后的膜片用 0.01×SSPE 于 100℃ 漂洗 30—40 秒后, 立即投入冷的预杂交液中, 凉干后经放射自显影证明无显影点, 再做预杂交, 并将两张膜片都与 ³²P 标记的 c-myc 探针杂交。结果两次均用 c-myc 作为探针的膜片得出的结果基本相同; 第一次用 v-ras^H 作为探针, 而第二次用 c-myc 作为探针的膜片, 其上 ³²P 标记的 c-myc 探针的放射性强度与两次均用 c-myc 作为探针的膜片得出的结果也基本相同(图 2)。说明检测到的确为特异的 mRNA 成份。

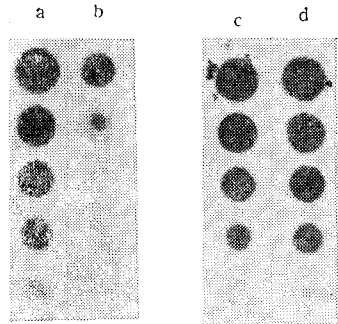


图 2 膜片的重复使用和特异 mRNA 的检测 (RNA 固定)
a, HL-60 细胞固定后与 c-myc 探针杂交 b, HL-60 细胞固定后与 v-ras^H 探针杂交 c, 膜片 a 经洗去杂交上的探针后再与 c-myc 探针杂交 d, 膜片 b 经洗去杂交上的探针后再与 c-myc 探针杂交

三、NaI 浓度对固定核酸的影响

D. Gillespie 等人在 1983 年初次介绍

Quick Blot 方法时,对 NaI 浓度的说明有含糊之处。他们认为加 0.813 体积的过饱和 NaI (16.7molal 达到的终浓度为 12.2molal 经我们重新计算,这时的终浓度应为 5.5molal。为此,我们用不同的 NaI 浓度分别对 RNA 和 DNA 的固定进行了试验。发现如用 10.8molal (3 倍体积过饱和 NaI) 时,固定 RNA 的效率高于 5.5molal 时的固定效率,而固定 DNA 时,用 5.5molal 的 NaI 浓度优于 10.8molal NaI 浓度 (图 3)^[6]。

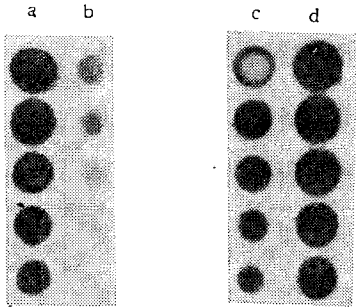


图 3 NaI 浓度对固定核酸的影响
a, RNA 固定, 10.8molal b, RNA 固定, 5.5molal c, DNA 固定, 10.8molal d, DNA 固定, 5.5molal

四、应用实例

1. 细胞中不同原癌基因的表达

用 HL-60 细胞在相同的条件下按 RNA 固定法制成三张膜片, 分别用 ³²P 标记的 c-myc, v-ras^H 和 c-sis (pLE335^[7]) 原癌基因探针与

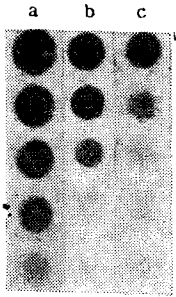


图 4 HL-60 细胞中不同原癌基因的表达
a, c-myc; b, c-sis; c, c-ras^H

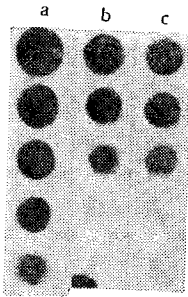


图 5 不同细胞中 c-myc 基因表达量的比较
a. HL-60; b. Raji; c. 正常人外周血白细胞

之杂交。结果发现在 HL-60 细胞中 c-myc 表达的 mRNA 量多于 c-sis, c-ras^H 的表达量为最少 (图 4)。

2. 不同细胞中癌基因表达量的比较

取 HL-60 细胞, Raji 细胞和正常人外周血

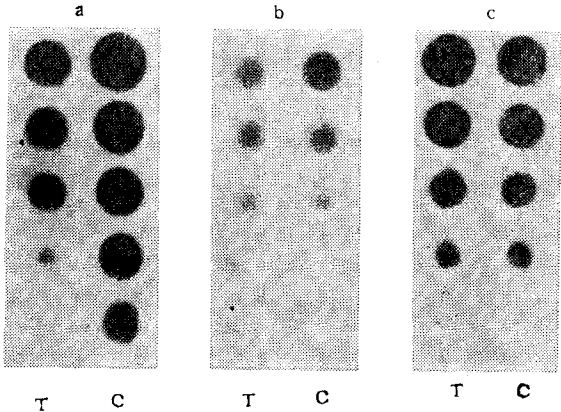


图 6 HL-60 经 TPA 诱导处理后原癌基因的表达变化
a, c-myc; b, c-ras^H; c, c-sis; C: 对照; T: TPA 处理后

白细胞各 5×10^6 , 按 RNA 固定法制成膜片。用 ^{32}P 标记之 c-myc 探针与之杂交后, 结果观察到 HL-60 细胞和 Raji 细胞中的 c-myc mRNA 量均大大高于正常人外周血白细胞(图 5), 与文献报道的结果相符^[8]。

3. 细胞接受刺激前后原癌基因表达的变化
用 TPA ($1.6 \times 10^{-8}\text{mol/L}$) 对 HL-60 细胞处理两天后, 与对照组一起按 RNA 固定法制成三张膜片。分别与 c-myc, v-ras^H, c-sis 探针杂交。结果观察到用 TPA 处理后的细胞 c-myc 和 c-ras^H 的表达量有所降低; 而 c-sis 的表达量基本不变(图 6)。

4. 对肿瘤细胞 DNA 转染的 3T3 细胞集落的筛选

人胃癌细胞 DNA 转染 3T3 细胞后, 3T3 细胞形成众多的集落。为了观察各集落的细胞内是否含有人类来源的 DNA, 我们取各集落细胞 1×10^6 , 按 DNA 固定法制成膜片。用 ^{32}P 标记的人类细胞 DNA 特异的 Alu 顺序 (pBLUR 8) 作为探针^[9] 与之杂交后, 即可以筛选出含人类 DNA 顺序的 3T3 集落细胞, 供进一步分析(图 7)。

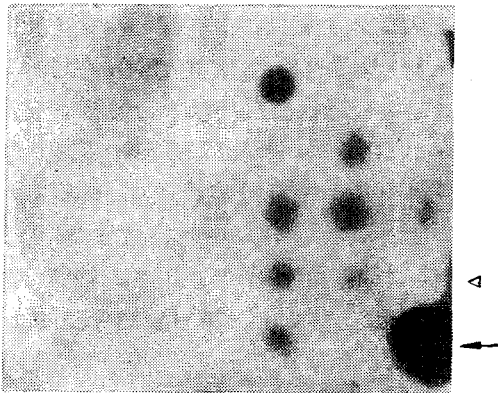


图 7 对肿瘤细胞 DNA 转染的 3T3 细胞集落的筛选
共 28 份样品细胞, $\blackleftarrow$ 为人白细胞(阳性对照) $\triangleleft$ 为未经转染的 3T3 细胞(阴性对照)

讨 论

核酸在高浓度 NaI 存在的条件下能选择性地固定在硝酸纤维滤膜上。其机理目前尚不了解。在快速印迹杂交法中, NaI 的浓度对被固定的核酸成份有较大的影响。固定 mRNA 时, 用高浓度(10.8molal) NaI 效果较好; 固定 DNA 时, 用较低浓度(5.5molal) NaI 比较好。在我们的实验条件下, 杂交点的放射自显影强度依赖于所使用的细胞数。一般高表达量的 mRNA 用 2.5×10^5 细胞即可有较满意的阳性结果。用本方法测定细胞内特异 mRNA 的含量以细胞数作为单位, 避免了因总 mRNA 量变化而导致的特异 mRNA 相对含量的波动, 且重复性好, 可以用于 mRNA 的半定量分析, 如不同细胞之间特异 mRNA 表达的比较, 或比较细胞接受各种刺激前后特异 mRNA 含量的变化以及对转染细胞的初步筛选。但本方法不能观察所检测细胞核酸成份的分子量大小。由于本方法所使用的细胞数量极少, 操作比较方便, 可以同时较多的样品同时进行观察, 对仪器设备无特殊要求, 值得推广。

参 考 文 献

- [1] Bresser, J. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 6523—6527, 1983.
- [2] Gillespie, D. & Bresser, J.: *Biotechniques*, Nov./Dec., 184—192, 1983.
- [3] Bresser, J. et al.: *DNA*, 2(3), 243—254, 1983.
- [4] Favera, D. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 6497—6501, 1982.
- [5] Ellis, J. et al.: *J. Virol*, 36, 408—420, 1980.
- [6] 唐永明: 《实验生物学学报》, 19(3), 339—344, 1986.
- [7] Favera D. et al.: *Nature*, 292, 31—35, 1981.
- [8] Westin, E. H. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 2490—2494, 1982.
- [9] Jelinek, W. R. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 1398—1402, 1980.

【本文于 1987 年 1 月 15 日收到】