

竞争 RT-PCR 法定量检测多药耐药基因的表达

李 勇 王玉芝

(北京放射医学研究所, 北京 100850)

摘要 由 MDR1 过度表达所介导的多药耐药性存在于多种肿瘤组织中, 是降低化疗效果的主要原因之一, 其耐受化疗药物的程度与 MDR1 的表达量呈正相关. 准确测定 MDR1 的表达量在临床化疗过程中有重要的指导意义. 建立了竞争 RT-PCR 定量检测 MDR1 表达的方法. 首先构建含 MDR1 cDNA 片段的质粒, 其携带的 cDNA 和靶 cDNA 有相同的引物结合区, 但和靶 cDNA 长度上有区别 (少 58 bp). 把该 cDNA 在体外转录出的 cRNA 作为竞争 PCR 的内参照, 该 cRNA 与靶 RNA 在同一体系内进行反转录和 PCR 过程, 二者的 PCR 产物因长度不同可经电泳区分开. 分析电泳结果, 由已知的 cRNA 内参的量可计算出靶 RNA 的量, 从而得到 MDR1 基因的绝对表达量. 该方法具有灵敏、可靠、准确等优点.

关键词 竞争 PCR, 多药耐药基因, 肿瘤细胞

学科分类号 R730.5

肿瘤细胞产生多药耐药性 (multidrug resistance, MDR) 的主要原因之一是细胞膜上的 P-糖蛋白 (permeability-glycoprotein, P-gp) 高度表达. P-gp 具有“药泵”的作用, 能将细胞内的药物排到细胞外, 从而降低化疗效果. 编码 P-gp 的基因是 MDR1 基因, 其表达量与肿瘤细胞的耐药性呈正相关且在多种肿瘤组织中都有过度表达^[1].

准确监测肿瘤病人 MDR 变化情况对选择化疗方案和提高化疗效果有重要作用. 目前检测 MDR1/P-gp 的方法主要包括 P-gp 水平、MDR1 mRNA 水平及 P-gp 功能活性三个方面, 其中 RT-PCR 方法被认为是最敏感、特异性最强的, 而且在临床检测中也开展的较为广泛. 但是目前在用 RT-PCR 检测 MDR1 的过程中一般使用 β -actin 作为外参照, 通过计算 MDR1 cDNA 与 β -actin cDNA 的比值来表示 MDR1 基因的表达量. 这样只能得到 MDR1 基因相对 β -actin 基因的表达量, 而不能测出其绝对表达量. 而且扩增 MDR1 和扩增 β -actin 所使用的两对引物完全不同, 这两种引物的扩增效率不同, 必然导致最终结果有较大的误差. 本文将报告一种以 cRNA 为内参照的

竞争 PCR^[2] 定量方法.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株: 耐药细胞 KB_{V200}^[3].

1.1.2 质粒: 带有 MDR1 cDNA 的质粒 pHaMDR1/A^[4].

1.1.3 酶及主要试剂: 限制性内切酶 Pst I、BamH I、EcoR V、T4 DNA 连接酶、T7 体外转录试剂盒、总 RNA 提取试剂盒为 Promega 产品. RT-PCR 有关试剂为华美生物工程公司产品.

1.1.4 引物: 参考 Grunebach 等^[5] 的文献, 利用 PC GENE 软件设计 MDR1 基因专一性引物, 其扩增片段为一段长 403 bp 的 cDNA. 为了便于克隆, 在引物的 5' 端加上了 Pst I 和 BamH I 酶切位点.

上游 5' CGGGATCCCTGCTTTGGAGAAATGACAG 3'

BamHI

下游 5' AACTGCAGCCCACTGAAAAATGTTGCCATTGAC 3'

PstI

收稿日期: 1997-01-23, 修回日期: 1997-05-15

1.2 方法

1.2.1 构建表达 cRNA 内参照的载体 (图 1).

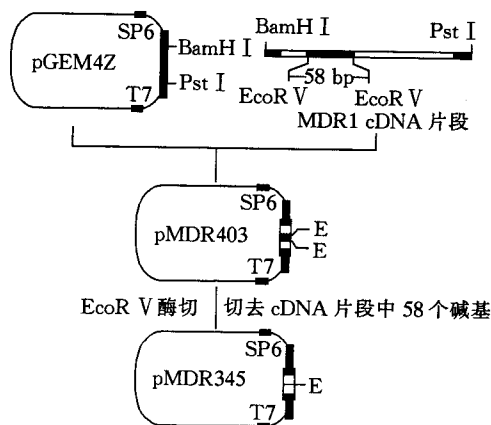


图 1 载体构建示意图

E: EcoRV.

首先通过 PCR 从质粒上扩增出 MDR1 cDNA 片段并亚克隆入质粒 pGEM4Z, 得到质粒 pMDR403. 再用 EcoRV 切去 58 bp 得到质粒 pMDR345.

1.2.2 cRNA 内参的体外转录及纯化: 利用质粒 pMDR345 上的 T7 启动子和 T7 转录试剂盒在体外转录出 cRNA 内参照 (详见 T7 转录试剂盒说明书). 该 cRNA 经 RNAase-Free DNAase 消化 DNA; 酚, 氯仿抽提蛋白两次; 异丙醇沉淀. 再将 cRNA 沉淀溶于 1 ml 无 RNA 酶水进行 Sephadex G-50 柱层析, 在紫外监测下收集 RNA 溶液. 754 型分光光度计测定 RNA 溶液的纯度及浓度.

1.2.3 耐药细胞总 RNA 的提取: 使用总 RNA 提取试剂盒 (详见说明书).

1.2.4 竞争 PCR 法测定 MDR1 的表达: 将 1 μ g KB_{v200} 总 RNA 分别与 5 个不同浓度的 cRNA 在同一体系内进行反转录 (RNA 变性 65 $^{\circ}$ C, 10 min; 反转录 42 $^{\circ}$ C, 60 min) 和 PCR 过程 (预变性 95 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火 55 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸 72 $^{\circ}$ C, 1 min; 补平 72 $^{\circ}$ C, 10 min; 共 35 个循环).

PCR 产物经含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶分离, 电泳结果如图 2. 用成相系统 (BIO-

RAD) 分析, 分别求出电泳胶上 5 对 PCR 产物的辉度比 (int_{345}/int_{403}), (因 PCR 产物长度不同其 EB 的掺入量也不同, 长度越长掺入的 EB 越多, 辉度也越高. 所以靶 RNA 产物的辉度应乘以校正系数 345/403, 经过校正的辉度比代表分子数之比).

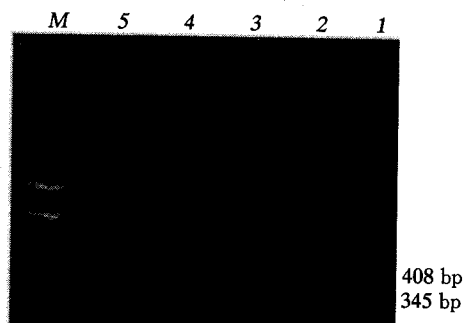


图 2 竞争 RT-PCR 产物的电泳结果

M: 分子质量标准, 1~5: 总 RNA (1 μ g) 分别和 5 种不同分子数 (20×10^8 , 15×10^8 , 10×10^8 , 5×10^8 , 1×10^8) 的 cRNA 内参的竞争性 RT-PCR 产物.

2 结果

对所得的 5 个辉度比, 以 $\lg(int_{345}/int_{403})$ 为纵坐标; 以每个稀释度的 cRNA 含量为横坐标, 用 SAS (statistic analysis system) 6.04 软件作直线回归, 得回归方程 $Y = 0.056X - 0.18$, 由此方程计算得 $Y = 0$ 时, $X = 3.28 \times 10^8$ (图 3). 当纵坐标为零时, $int_{345}/int_{403} = 1$, 靶 RNA 分子数与 cRNA 内参的分子数相同, 通过该点求出靶 RNA 的精

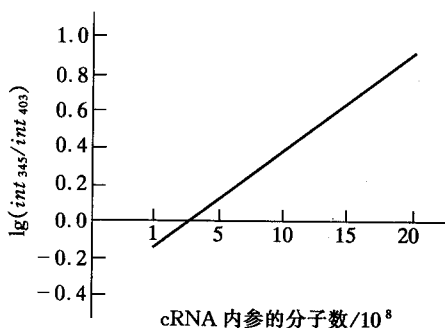


图 3 竞争 RT-PCR 结果的统计分析

确分子数. 本实验测定 MDR1 mRNA 在 KB_{V200} 中的表达量为每 1 μg 总 RNA 中含有 3.28×10^8 个分子.

3 讨 论

竞争 RT-PCR 定量方法的特点是用一段与靶 RNA 有相同的引物结合区但又与靶 RNA 在长度上有差别 cRNA 作为内参照. 使用该 cRNA 内参的优点是: a. cRNA 内参与靶 RNA 在同一体系内共同进行反转录, 二者的反转录效率一样. 从而避免了因反转录效率低于 100% 而低估靶 RNA 的含量. b. PCR 过程中, RNA 内参与靶 RNA 没有引物引导效率间的差别. c. 因 RNA 内参与靶 RNA 在长度上有区别, 其 PCR 产物可通过电泳分开. 通过对电泳胶的分析可准确计算出靶 RNA 绝对含量. 本文在参考文献 [5] 的同时, 又作了一定改进. 首先在实验方法上, 我们利用 MDR1 cDNA 本身具有的 EcoR V 酶切位点制作标准 cRNA, 比国外文献所报道的引入新的酶切位点和外源片段来制做标准 cRNA 要简单得多. 其次在实验数据的分析上, 我们采用了 SAS 6.04 统计软件对数据进行线性回归, 使实验结果更为精确. 另外在实验过程中, 我们发现竞争性 PCR 作为一种精确的定量方法, 对实验操作, 实验设备要求很高. 在整个实验过程都必须十分小心, 尽可能保持反应体系间的平行性.

竞争性 RT-PCR 作为一种定量检测 MDR1 基因表达的方法, 具有灵敏、可靠、准确的优点, 存在广泛的应用前景: 在临床上可应用于预测化疗效果, 评价化疗药物等方面; 在基础医学方面可应用于研究肿瘤细胞耐药性的发生、发展, 寻找 MDR 逆转剂等方面.

致谢 感谢柴富贵同志 (北京军区总医院消化内科) 在测定细胞 KB_{V200} 中 MDR1 表达量的实验中所给予的大力帮助.

参 考 文 献

1 Chen C J, Clark D, Ueda K *et al.* Genomic organization of

the human multidrug resistance (MDR1) gene and origin of P-glycoproteins. *J Biol Chem*, 1990, **265** (1): 506~ 514

2 Siebert P D, Larrick J W. Competitive PCR. *Nature*, 1992, **359** (8): 557~ 558

3 张晓红, 张富荣, 籍秀娟等. KB 细胞耐药株的建立及其耐药机制的探讨. *药学报*, 1994, **29** (4): 246~ 251

4 Pastan I, Gottesman M M, Ueda K *et al.* A retrovirus carrying an MDR1 cDNA confers multidrug resistance and polarized expression of P-glycoprotein in MDCK cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85** (2): 4486~ 4490

5 Grunbach F, Griese E-U, Shumacher K. Competitive nested polymerase chain reaction for quantification of human MDR1 gene expression. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1994, **120** (2): 539~ 544

Competitive RT-PCR Assay to Quantification of Human MDR1 Gene Expression. LI Yong, WANG Yu-zhi (*Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850, China*).

Abstract Multidrug resistance (MDR) of tumor cells lead by overexpression of MDR1 gene is considered as a major obstacle to successful chemotherapy. The amount of MDR1 mRNA has been correlated with the degree of drug resistance, so precise quantification of MDR1 mRNA should be useful in improving monitoring and design of chemotherapy. A competitive reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay for the absolute quantification of MDR1 mRNA is described. In the first, a plasmid was constructed, which contain a MDR1 cDNA fragment. The cDNA fragment share the same MDR1 primer sequence as the cellular cDNA, but it was less 58 bp in length than cellular cDNA because of shortening by EcoR V. In the second, the cDNA was transcribed *in vitro* as an internal standard, and then it was done RT-PCR procedure together with cellular cDNA. The two kinds of amplified cDNA fragments could be distinguished after agarose gel electrophoresis, because there were difference in their length. The concentration of cellular MDR1 mRNA was derided from the ratio

between the intensities of the bands corresponding to the amplified products. The test for characterizing the MDR1 expression offers high sensitivity and specificity and is therefore of great

clinical relevance.

Key words competitive RT-PCR, MDR1 (multidrug resistance) gene, tumor cells

低剂量辐射激活小鼠脾细胞 CREB 及 NF- κ B^{*}

陈沙力 刘树铮

(白求恩医科大学放射生物教研室, 长春 130021)

摘要 采用凝胶电泳迁移率变化分析和寡核苷酸竞争抑制方法检测低剂量 X 射线整体照射对小鼠脾细胞基因转录调控的影响. 75 mGy X 射线全身照射小鼠后 4 h, 脾细胞核蛋白提取物的 CREB 及 NF- κ B 与其基因启动部位增强子控制序列的结合活性较相同浓度的对照核蛋白提取物分别增强 7 倍及 5 倍. 竞争抑制试验证实 CREB 及 NF- κ B 与其控制序列特异地结合. 提示低剂量 X 射线全身照射选择性地激活脾细胞 CREB 及 NF- κ B, 通过与增强子控制序列位点的结合, 特异地诱导基因转录, 从而引起功能激活.

关键词 低剂量辐射, 脾细胞, CREB, NF- κ B, 转录水平调控

学科分类号 Q691

电离辐射作用于哺乳动物细胞可通过多种可能的调节机制控制基因表达^[1]. 主要包括转录因子与基因启动子特定部位或 RNA 多聚酶结合、转录后修饰和翻译后修饰等. 目前低剂量整体照射条件下转录调控及转录因子活性的变化尚缺乏研究, 探讨转录因子对控制序列识别机制具有重要意义. cAMP response element binding protein (CREB) 及 nuclear factor kappa B (NF- κ B) 是多功能转录因子, 在细胞信号传递过程中通过与增强子控制序列位点的结合, 参与许多特异基因的转录调节. 为了观察辐射后转录因子结合活性的变化, 采用凝胶电泳迁移率变化分析 (gel electrophoresis mobility shift assay, EMSA) 和寡核苷酸竞争抑制方法对低剂量 X 射线全身照射激活小鼠脾细胞转录因子 CREB 及 NF- κ B 的变化进行了分析, 现将结果报告如下.

1 材料与方法

1.1 动物及照射条件

健康雄性昆明系小鼠, 体重 18~22 g. 采

用 Philips 深部 X 射线机照射动物, 电压 220 kV, 电流 10 mA, 滤板 0.5 mmCu, 1.0 mmAl, 靶皮距离 212 cm. 单次全身照射, 剂量率 12.5 mGy/min, 照射剂量 75 mGy.

1.2 小鼠脾细胞悬液的制备

于照射后 4 h 断头处死小鼠, 取脾置 RPMI 1640 培养液中, 毛玻片挤压, 制成单细胞悬液, 200 目尼龙网过滤, 去除结缔组织, 1 000 r/min 离心 5 min, 沉淀细胞加 10 倍体积的红细胞裂解液, PBS 洗涤 2 次. 同时制备正常细胞悬液作为对照.

1.3 细胞核分离及蛋白质提取

在 4℃ 条件下将细胞悬于 5 倍容积的 A 液 [10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl, 0.5 mmol/L DTT] 中, 放置 10 min, 2 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀细胞悬于 2 倍细胞体积的 A 液中, 用匀浆器破碎细胞, 2 000 r/min 离心 10 min, 沉

^{*} 国家自然科学基金资助项目 (39270207).

收稿日期: 1997-02-03, 修回日期: 1997-07-17