

研究工作

## 固相探针 DNA 圆点滤膜杂交法对大鼠肝和卵黄囊中甲胎蛋白及白蛋白基因表达的定性定量测定

李宝珪 吴大庆 仲金良 黄道培 曾庆镛

(中国科学院上海生物化学研究所)

卢惠卿

(上海生物制品研究所)

甲胎蛋白和白蛋白是二个分子大小相近的血清蛋白,两者除在氨基酸及核苷酸顺序上有很高的同源性(分别为34%和50%)外,二级结构也很相似,表明它们在进化上有密切的关系。目前普遍认为它们来源于一个共同的祖先基因,并组成一个基因家族<sup>[1-4]</sup>。但在发育过程中,它们的表达却很不相同。在哺乳动物的正常发育中,甲胎蛋白首先由卵黄囊,随后由胚肝合成。它的含量在胎儿血清中很高,临近出生时开始降低,出生后急剧下降,很快即达很低水平。成年动物的肝脏细胞仅合成很微量的甲胎蛋白。而与此同时,由肝脏合成的白蛋白却不断升高,出生后不久即可达正常水平,并保持稳定。二者互为消长。但是,当成年动物发生肝癌等病变时,这种表达关系发生了变化<sup>[2]</sup>,大多数患肝癌动物血清中的AFP含量急骤升高,现在已将以作为肝癌早期诊断的指标用于临床。很多研究工作表明,血清中甲胎蛋白和白蛋白含量的变化主要是由于基因转录或转录后水平的差别引起,因此不少实验室已将甲胎蛋白和白蛋白作为指标,用于肝癌的发病机理和治疗的研究及真核细胞基因表达的研究<sup>[5-8]</sup>。所以对于它们的基因转录产物信使核糖核酸的动态变化的测定,已成为基因调控研究的重要组成部分。本文介绍一种使用固相探针DNA圆点滤膜杂

交法(探针膜法,以下简称DISC法)定性、定量地测定大鼠甲胎蛋白和白蛋白基因转录产物——mRNA<sub>AFP</sub>和mRNA<sub>Alb</sub>含量的简便方法。DISC法的特点是在同一张滤膜上,固化不同的探针质粒DNA,然后与放射性的RNA杂交,本文中将有含有大鼠AFP和Alb基因片段的质粒DNA固相化在硝酸纤维素滤膜上,同碘-125标记的大鼠不同组织的总Poly A<sup>+</sup>RNA杂交,由放射自显影和计数来测定这些组织中此二个基因的表达变化。

### 材料与 方法

大鼠胚肝和卵黄囊取自胚龄为16-18天的大鼠胚胎。正常大鼠肝取自雄性健康之成年大鼠。琼脂糖(上海东海制药厂)。盐酸胍(上海试剂二厂)。硝酸纤维素滤膜(S&S BA85 0.45 μm)。酵母tRNA(上海东风生化试剂厂)。限制性内切酶PstI(BRL),Ficoll400(Pharmacia)。聚乙烯吡咯酮(PVP)(Sigma)。大鼠AFP(pRAF87, pRAF65)(pRSA13, pRSA57)和Alb质粒由美国T. D. Sargent博士提供。

#### 1. 大鼠不同组织 poly A<sup>+</sup> RNA 的纯化和标记

将新鲜或由液氮保存的大鼠肝、16-18天的鼠胚肝和卵黄囊按Chirgwin<sup>[9]</sup>介绍的盐酸胍

制备 RNA 的方法各制成总的 RNA (省去氯化铯梯度超离心一步),再将此 RNA 经由二次 oligo (dT)—cellulose 柱层析循环,将其制成总的 poly A<sup>+</sup> RNA,再按前法用碘-125 标记<sup>[10]</sup>,但标记体积减至 150 微升,并在开始保温时摇动 1—2 分钟。

## 2. RNA 电泳

基本上按刘朵花等介绍的方法<sup>[11]</sup>。agarose 浓度为 1%,每个样品上样量为 10 微克。

## 3. 探针 DNA 的制备和鉴定

按 Dagert 介绍的方法将含大鼠 AFP 和 Alb 基因片段的质粒 pRAF87, pRAF65, pRSA 13 和 pRSA57<sup>[1,12]</sup> 转化到 CaCl<sub>2</sub> 处理过的受体菌 C<sub>600</sub> 中<sup>[13]</sup>,并进行质粒 DNA 的扩增和纯化<sup>[10]</sup>。纯化后的质粒 DNA 由限制性内切酶 pST1 酶切图谱和 Southern 杂交进行鉴定<sup>[14]</sup>。

## 4. 固化 DNA 圆点滤膜(DISC 膜)的制备和大鼠 mRNA<sub>AFP</sub>、mRNA<sub>Alb</sub> 的定性、定量杂交测定

将扩增、纯化的含大鼠 AFP 基因片段的质粒 pRAF87 和 pRAF65 以及含大鼠白蛋白基因片段的质粒 pRSA13 和 pRSA57 分别等量混合,制成浓度各为 0.2 μg/μl 的 4×SSC 溶液,按以前所介绍的方法<sup>[10]</sup>,将一定量 (5 μl) 样品点于预处理过的同一块硝酸纤维素滤膜上,并以等量的 pBR322 作为对照制成 DISC 滤膜。用这种 DISC 膜与碘-125 标记的大鼠不同组织 poly A<sup>+</sup> RNA 杂交,结果由 DISC 膜对 X 光底片的放射自显影及其放射性记数来表示,前者得到的是定性结果,后者为定量结果。

# 结果与讨论

## 1. poly A<sup>+</sup> RNA 的质量比较和同位素标记

众所周知,在制备 poly A<sup>+</sup> RNA 过程中,最大的危险是来自核糖核酸酶的降解作用。在本实验中,除了试剂和器皿严格消毒防止外源酶的作用外,我们采用 Chirgwin 介绍的方法,在强烈的蛋白质变性剂盐酸胍中快速组织匀浆作为抽提 poly A<sup>+</sup> RNA 的第一步,以便降低

内源核酸酶的降解作用。制得的粗纯总 RNA 再进一步由 Oligo(dT)—cellulose (odc) 来分离纯化 poly A<sup>+</sup> RNA。由此得到的 poly A<sup>+</sup> RNA 比通过组织匀浆制备 polysomes 得到的 poly A<sup>+</sup> RNA,不仅方法简便、更重要的是获得的 poly A<sup>+</sup> RNA 分子量大、收率也高(见图 1,本文图均见封三)。因为 mRNA 的纯化仅用了 oligo (dT)—cellulose 柱层析一种方法,所以在 mRNA 制剂中难免会杂有一些核糖体 RNA (rRNA)。但从本文的结果来看,经二次 odc 柱纯化的 mRNA,已可直接用于同位素标记。

由于 poly A<sup>+</sup> RNA 的标记体积减小,并严格控制反应系统,使 pH < 5,所以碘-125 的标记率比较高,一般可达 4—6×10<sup>7</sup>cpm/μg poly A<sup>+</sup> RNA。再则碘-125 价格便宜,半衰期较长,又不必冷藏运输,用以代替 α<sup>32</sup>-PdNTP,经济上和上都合算,比较适应于我国的情况。

## 2. 大鼠不同组织总 poly A<sup>+</sup> RNA 和大鼠 AFP、Alb 探针的杂交鉴定

未经 pST 1 酶切和经由 pST 1 酶切处理后的含大鼠 AFP 和 Alb 基因片段的质粒 DNA,电泳后转移到硝酸纤维素滤膜上,然后和碘-125 标记的大鼠不同组织总 poly A<sup>+</sup> RNA 杂交,结果显示,由正常大鼠肝制得的 poly A<sup>+</sup> RNA 只和含大鼠 Alb 基因片段的质粒 DNA 和 Alb 基因片段杂交;来自卵黄囊的 poly A<sup>+</sup> RNA 仅和含大鼠 AFP 基因片段的质粒 DNA 和 AFP 基因片段杂交;而大鼠胚肝的 poly A<sup>+</sup> RNA 却与两者都有杂交(见图 2、图 3)。这与以前报道的结果相符<sup>[1,2]</sup>。证明扩增纯化的探针 DNA 和大鼠不同组织抽提得到的 poly A<sup>+</sup> RNA 可以用于杂交测定。

## 3. 大鼠不同组织中 mRNA<sub>AFP</sub> 和 mRNA<sub>Alb</sub> 的定性定量测定

三张同样含有 pBR322、pRAF 和 pRSA 质粒 DNA 的 DISC 膜在同样条件下,与碘-125 标记的不同大鼠组织的总 poly A<sup>+</sup> RNA 杂交<sup>[10]</sup>,杂交后的 DISC 膜由 X 光片自显影可以明显看出,某一组织内是否含有 mRNA<sub>AFP</sub> 或

mRNA<sub>Alb</sub>, 并可初步了解其相对含量(见图 4), 这和前面用 Southern 杂交鉴定探针 DNA 的杂交结果是一致的。如按以前介绍的方法<sup>[10]</sup>对 DISC 膜上的探针点进行  $\gamma$  射线计数测定, 则可得所测组织中二者相对含量的定量关系, 见下表。

表 1 大鼠不同组织中 mRNA<sub>AFP</sub> 和 mRNA<sub>Alb</sub> 的相对含量

组 织	DISC 点计数 (cpm)*		mRNA <sub>AFP</sub> / mRNA <sub>Alb</sub>
	mRNA <sub>AFP</sub>	mRNA <sub>Alb</sub>	
正常成年大鼠肝	11	1577	0.007
大鼠胚肝(16-18天)	561	840	0.68
大鼠卵黄囊(16-18天)	1139	1	1139

\* 已减去 pBR322 对照点的背景数

以上结果和文献报道的用其它方法得到的结果也相符合<sup>[15-17]</sup>, 说明此方法可以用于大鼠 mRNA<sub>AFP</sub> 和 mRNA<sub>Alb</sub> 的定性及相对定量测定。可见此法是定量跟踪此二种基因表达变化关系的一种方便的检测手段。如果利用竞争杂交方法, 只要标记已知仅含 mRNA<sub>AFP</sub> 的大鼠卵黄囊 poly A<sup>+</sup> RNA 或只含 mRNA<sub>Alb</sub> 的大鼠肝 polyA<sup>+</sup> RNA, 在杂交时加入不同的 poly-A<sup>+</sup> RNA 实验样品, 即可从竞争抑制的水平求出实验样品中二种基因转录产物的定量水平, 而使其应用范围扩大。另外, 增加 DISC 膜上的样品点, 即可在一次实验中测定更多的指标。

DISC 膜制备得好坏, 直接关系到测定的质

量, 因此探针 DNA 在膜上分布要均匀, 否则可能会影响测定结果。DNA 纯度高, 溶解度好也是制备均匀 DISC 膜的一个关键。

本工作曾得到周光宇教授和美国佛蒙特大学邱政夫教授的帮助, 特此致谢。

## 参 考 文 献

- [1] L. L. Jagodzinski, et. al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 3521, 1981.
- [2] J. M. Sala-Trepat: et al.: *Biochem.*, **18**, 2167, 1979.
- [3] D. Kioussis, et. al.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1960, 1981.
- [4] R. S. Ingram et. al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4694, 1981.
- [5] M. A. Innis, et. al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 8469, 1977.
- [6] S. Sell, et. al.: *Biochem. Biophys. Acta*, **564**, 173, 1979.
- [7] J. F. Chiu et. al.: *Nucleic Acids Res.*, **9**, 6917, 1981.
- [8] J. F. Chiu, et. al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **222**, 310, 1983.
- [9] J. M. Chirgwin, et. al.: *Biochem.*, **18**, 5294, 1979.
- [10] 李宝珪等: 《生物化学与生物物理进展》, (2), 60, 1984.
- [11] 刘朵花等: 《生物化学与生物物理进展》, (5), 58, 1982.
- [12] T. D. Sargent, et. al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3256, 1979.
- [13] M. Dagert, et. al.: *Gene*, **6**, 23, 1979.
- [14] E. M. Southern: *J. Mol. Biol.*, **98**, 503, 1975.
- [15] L. Belanger, et. al.: *Cancer Res.*, **39**, 2141, 1979.
- [16] K. Koga, et. al.: *Biochem.*, **13**, 3024, 1974.
- [17] R. C. Feldhoff, et. al.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 3611, 1977.

[本文于 1985 年 9 月 28 日收到]

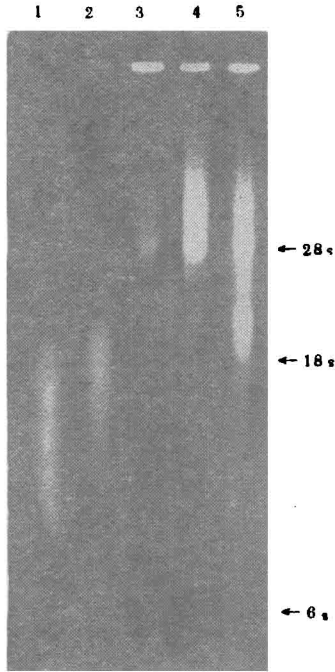


图 1

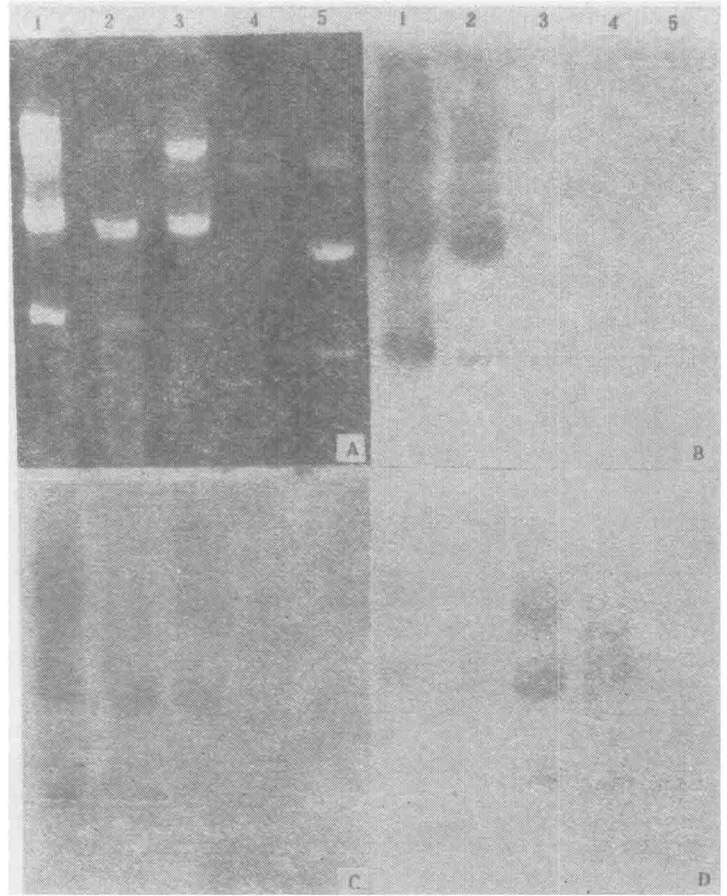


图 2

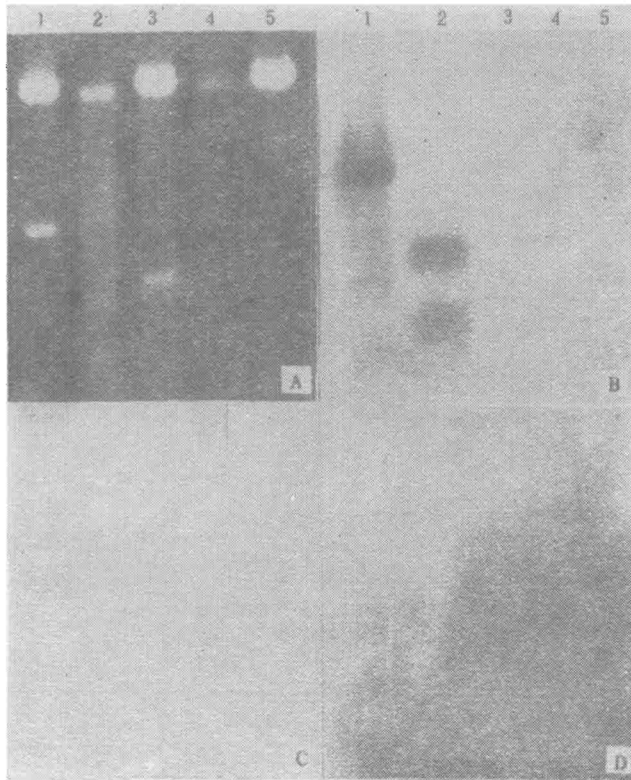


图 3

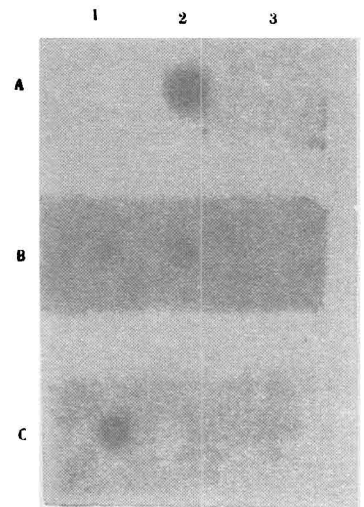


图 4