

糖皮质激素受体 mRNA 的检测

金春华* 祁国荣** 杨义力 徐仁宝

(第二军医大学病理生理教研室,上海)

提 要

用盐酸胍法和苯酚法从大鼠肝脏分离出了完整的 RNA, 通过 oligo (dT) 纤维素亲和层析从中纯化 mRNA。然后用 GRcDNA 探针和 mRNA 进行 Northern 印迹杂交和斑点印迹杂交, 放射自显影后用光密度计对糖皮质激素受体 mRNA 进行定量, 获得了重复性较好的结果, 本方法为从基因转录水平上研究 GR 的变化打下了必要的基础。

关键词 糖皮质激素, 糖皮质激素受体, 信使核糖核酸, 核酸杂交

糖皮质激素受体 (GR) 是介导糖皮质激素 (GC) 生物效应的关键性蛋白质。迄今为止, 对它的研究采用的主要是放射配体结合法。此法简便易行。但此法不能分辨受体蛋白的数量和结合活性, 加之受体蛋白容易失活, 内源性激素的占据等影响测定结果的准确性。GR cDNA 的克隆成功^[1] 为我们从基因转录水平研究 GR 提供了可能性。检测受体的 mRNA, 可以排除放射配体结合测定的上述缺点, 从而提高受体的研究水平。因此, 我们建立了分子杂交检测 GR mRNA 的方法。

材 料 和 方 法

一、材料

1. wistar 大鼠, 雌性, 150—250g
2. GRcDNA 克隆 OB₇^[2]: 由 weinberger 惠赠
3. 试剂 (Sephadex G50 (pharmacia), DE-AE-纤维素纸 (Whatman), 硝酸纤维素滤膜 (S & S BA85 0.45 μ m), 焦碳酸二乙酯 (DEPC, Aldrich), 氯化铯 (Boehringer), α -³²P-dATP (Amersham), 脱氧核苷三磷酸 (Boehringer), 鲑鱼精 DNA (Boehringer), DNA 聚合酶 I

(Boehringer), DNase I (上海东风试剂厂); 盐酸胍(上海试剂二厂)。

二、方法

1. 大鼠肝总 RNA 的分离 (1) 盐酸胍法: 大鼠断头处死, 取肝称重剪碎。每克组织加 6ml 7.5mol/L 盐酸胍溶液(5mmol/L DTT, 2.5mmol/L 柠檬酸钠 pH7.0), 匀浆 3—5min 后于 10 $^{\circ}$ C 6000 r/min 离心 10min, 取上清加入 0.025 倍体积的 1mol/L 冰乙酸和 0.75 倍体积的无水乙醇, 摇匀后于 -20 $^{\circ}$ C 放置 1h 以上, 10000r/min, 0 $^{\circ}$ C 离心 10min, 于沉淀物内立即加入 7.5mol/L 盐酸胍溶液 (3ml/g 肝) 使其溶解, 再加入 0.025 倍体积 1mol/L 冰乙酸和 0.5 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 放置 1h 以上, 离心同前。所得 RNA 沉淀内加 20 mmol/L EDTA 水溶液溶解 (1~2ml/g 肝) 后, 加两倍体积的苯酚氯仿, 剧烈摇荡 5min 抽提, 10000 r/min, 4 $^{\circ}$ C 离心 5min。取上清再用等体积的氯仿苯酚和等体积的氯仿分别抽提一遍, 然后在此上清液中加入 1/10 体积的 3mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, -20 $^{\circ}$ C 过

* 现在地址: 广州第一军医大学病理生理教研室

** 中国科学院上海生物化学研究所

夜后, 10000r/min 4℃ 离心 30min 将 RNA 沉淀, 用 70% 乙醇洗两次后于真空干燥器抽干。用经焦碳酸二乙酯 (DEPC) 处理水溶解后, 取少量用于测定 260nm 和 280nm 的光吸收值, 以估计其纯度和含量, 其他用于 mRNA 的纯化。

(2) 酚法: 取新鲜大鼠肝剪碎, 按 5ml/g 肝加入匀浆缓冲液 (100mmol/L NaCl, 0.5% SDS, 25mmol/L EDTA) 和等量经过重蒸馏的苯酚, 匀浆后加氯仿 (5ml/g 肝), 剧烈振荡 10min, 10000r/min, 4℃ 离心 10min, 小心取出上清, 然后用等体积苯酚氯仿抽提几次至无明显蛋白质层, 最后再用等体积氯仿抽提一次, 小心取出上清, 加入 1/10 体积 3mol/L 醋酸钠 (pH 5.2) 和 2.5 倍体积的无水乙醇, -20℃ 放置过夜, 10000 r/min, 4℃ 离心 30min, 收集核酸沉淀, 用 3mol/L 醋酸钠 (pH 6.0) 洗二次, 70% 乙醇洗两次后, 真空抽干备用。

2. 大鼠肝 mRNA 的纯化^[3] 将盐酸胍法或酚法制备的 RNA 样品, 在高盐 (0.5mol/L NaCl, 10mmol/L Tris · Cl pH 7.5, 1mmol/L EDTA, 0.1% SDS) 条件下上样到 oligo(dT)-纤维素柱, 先用该高盐缓冲液洗至 260nm 无吸收峰, 再用低盐缓冲液 (10 mmol/L Tris · Cl pH 7.5, 1mmol/L EDTA, 0.05% SDS) 洗脱回收 poly (A) mRNA, 然后用乙醇沉淀, -20℃ 保存。

3. GRcDNA 探针的制备及标记 按一般方法^[3] 将质粒 OB₇ 转化大肠杆菌 HB 101 经扩增、碱法抽提及氯化铯-溴乙锭超离心后得到闭环质粒。EcoR I 酶切后, 用 DEAE-滤膜插片法^[4] 分离出 GRcDNA 片段。然后用缺口平移

法 (nick translation) 将其进行 ³²P 标记, 经 Sephadex G50 柱层析得到高放射比度 α -³²P-GR cDNA 探针

4. Northern 印迹杂交膜的制备^[3] mRNA 经 1mol/L 乙二醛、50% 二甲亚砷变性后, 在 0.9% 琼脂糖凝胶中用 10mmol/L NaH₂PO₄ (pH 7.0) 缓冲液电泳 2—3h, 然后在 20×SSC 缓冲液中用纸巾吸印转移 15—24h, 使 mRNA 由凝胶转移到硝酸纤维素滤膜上。将滤膜自然晾干, 再 80℃ 真空烘烤 2h 左右。

5. mRNA 斑点杂交膜的制备 采用 White^[5] 方法制备含 7.4% 甲醛和 6×SSC 的 mRNA 溶液, 60℃ 加热 30min 后点在处理过的硝酸纤维素滤膜上 (5 μ l/点), 晾干再 80℃ 烘烤备用。

6. 杂交反应及结果分析 根据 Thomas 方法^[6] 略加修改。先于预杂交液 (50% 甲酰胺, 5×SSC, 50 mmol/L Na₃PO₄, pH 6.5, 鲑鱼精 DNA 250 μ g/L, 1×Denhardt 溶液) 中 42℃ 水浴 4—5h。再在含 ³²P-GRcDNA 探针的相同溶液中, 42℃ 杂交 20h 以上。洗膜条件为在 2×SSC, 0.1% SDS 溶液中室温洗涤 5min×4, 再于 0.1×SSC, 0.1% SDS 溶液中 50℃ 洗涤 30 min×2, 晾干后作放射自显影, 于 -70℃ (或 -20℃) 放置 2—7 天后冲洗。显影结果用 Shimadzu CS 930 密度计扫描。根据扫描峰面积的大小来表示 GR mRNA 的相对含量的多少。

结果与讨论

一、核酸的分离纯化

本文用盐酸胍法和酚法从大鼠肝脏分离出

表 1 所提取的 kNA 含量和纯度

方法	RNA (mg/g liver)	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	$\frac{\text{mRNA}}{\text{RNA}} \times 100$	$\frac{\text{DNA}}{\text{RNA}+\text{DNA}} \times 100$
盐酸胍法	1.036±0.1	2.012±0.06	1.37±0.21	0.0
酚法	2.813±1.1	2.013±0.08	2.74±1.26	6.73±1.07

RNA 和 mRNA, 两种方法都得到了纯度较好 (OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值大于 2.0)、无蛋白质等杂质、

DNA 成分少的核糖核酸。(结果见表 1)。琼脂糖凝胶电泳鉴定表明核酸的完整性很好,

Northern 杂交结果也证明了这一点。

二、GR mRNA 的分子杂交测定

GRcDNA 克隆 OB₇ 经扩增、纯化及用限制性内切酶 EcoR 1 酶切, 得到一大约为 0.73 kb 的 GRcDNA 片段。标记的 GRcDNA 探针, 其放射比活可以达到 $2-4 \times 10^7$ cpm/ μ g DNA, 同位素掺入率为 41.8—62.3%。

Northern 印迹杂交结果表明, 大鼠肝 GR mRNA 是约为 6kb 的单一一条带, 这和文献报告的结果^[4,7]一致。

为了能够定量分析组织中的 GR mRNA 含量, 研究了斑点杂交、放射自显影、密度计扫描峰面积和打点的 mRNA 的量之间的关系。结果表明 mRNA 含量在 12.5 μ g 以下时, 二者之间有很好的线性关系(图 1)。同一样品作三个重复杂交点, 密度计扫描结果重复性比较好, 变异系数为 $12.5 \pm 4.8\%$ 。实验中要注意掌握好 X 光胶片的曝光和冲洗时间, 以确保结果在线性范围内, 否则将影响定量分析的准确性(本实验中数据为 5 次重复实验的结果)。

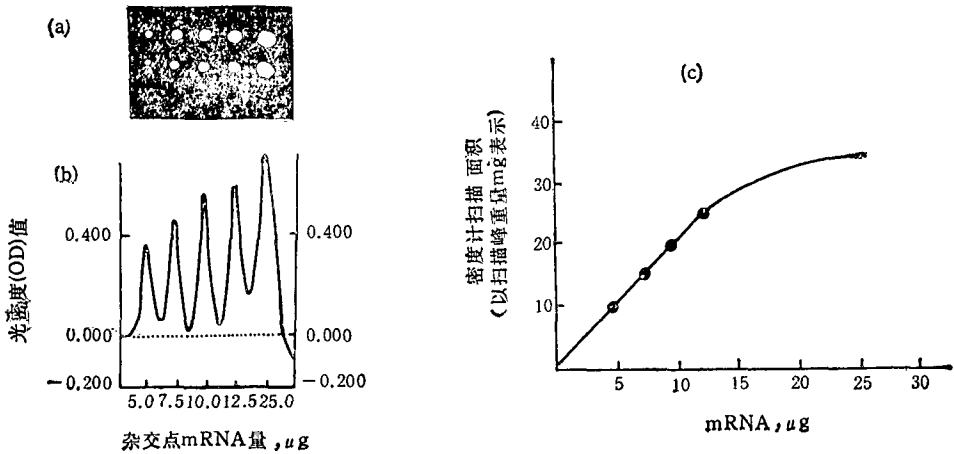


图1 GRmRNA 的斑点杂交

- (a) 放射自显影结果(同一样品的 5 个不同 mRNA 浓度, 上下两排为重复杂交点);
(b) 密度计扫描图;
(c) 扫描面积对 mRNA 含量作图

参 考 文 献

- 1 Miesfeld R *et al.* *Nature*, 1984; **312** (5996): 779
- 2 Hollenberg S M *et al.* *Nature*, 1985; **318** (6047): 635
- 3 曼尼阿蒂斯 T 等, 分子克隆-操作指南。北京: 科学出版社, 1987: 128—129, 163—164
- 4 彭秀玲, 袁汉英: 基因工程实验技术, 长沙, 湖南科学出版社, 1987: 107—118
- 5 White B A. *J Biol Chem*, 1982; **257** (15): 8569
- 6 Thomas P. S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980; **77** (9): 5201
- 7 Kalinyak J E *et al.* *J Biol Chem*, 1987; **262** (22): 10441

[本文于 1989 年 1 月 3 日收到]