

银染 mRNA 差异显示法的建立及其应用

陈瑞川¹, 蔡克瑕¹, 马胜平¹, 陈福¹, 付永贵¹, 曾寰²

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005;

2. 厦门市第二医院肿瘤实验室, 福建 厦门 361003)

摘要: 以银染 mRNA 差异显示方法对原发及转移灶胃癌标本总 RNA 为研究对象进行银染差异分析和回收差异条带, 从中获得系列差异表达片段。随机选取 5 个从原发性胃癌样品回收的表达条带, 以取自体外培养胃癌细胞株的 RNA 进行点杂交验证, 均被证实为真实带。对 2 个差异表达片段进行分析、测序和 GenBank 同源比较结果表明: MGD1 片段与肿瘤转移相关基因 MTA1 完全同源, 属胃癌转移相关基因; PGD2 与胃癌转移抑制相关, 并与细胞周期抑制蛋白 p27/Kip1 具 99% 的同源性。结果表明, 银染差异显示法具有快速、直观、假阳性率低等优点, 同时也为进一步研究胃癌转移的相关基因提供了新线索。

关键词: 银染差异 PCR; 胃癌; 转移相关基因

中图分类号: R 730.49

文献标识码: A

目前, 在筛选、克隆差异表达基因方面最为有效的技术是 mRNA 差异显示 PCR 法 (mRNA differential display PCR, DD-PCR)^[1]; 但该方法通常采用测序胶-放射自显影来显示扩增条带, 不仅易造成放射性同位素污染, 且实验周期长, 对实验条件要求也高^[1]。本方法以临床收集的原发及转移灶胃癌标本为对象, 尝试采用银染 mRNA 差异法扩增和显示表达差异条带, 并运用于胃癌转移相关基因的筛选克隆, 具有快速、直观、假阳性率低等优点。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

试剂: AMV 逆转录酶、Taq 酶、DNase I、内切酶及 pGEM-T easy PCR 产物克隆试剂盒等为 Promega 公司产品, DIG DNA 标记及检测试剂盒为宝灵曼公司产品, 高敏 DNA 银染试剂盒和 TranFector 快速质粒转化试剂盒购自厦门中迅达科技有限公司; 有关的生化试剂等购自华美生物工程公司上海分公司; 其余均为国产分析纯试剂。

细胞株: 人胃腺癌 MGC 803 及 SGC 7901 由本单位细胞培养室提供, 于含 10% 小牛血清、

收稿日期: 2001-03-03

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(F00024)

作者简介: 陈瑞川(1963-) 男, 副研究员

100 U/mL 青霉素及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 RPMI 1640 培养液、5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养传代。

癌组织样品: 原发及肺转移胃癌组织标本取自同一胃癌患者的手术切除标本(2例), 样品均作常规病理检查。

引物及序列: DD-PCR 引物自行设计, 由上海生工生物工程公司合成。其中用于逆转录的简并“锚定”引物序列为: T_{12}MN (M 为 A、G 或 C, N 为 A、G、C 或 T); 用于 PCR 的“锚定”引物序列分别为: T_{12}AN 、 T_{12}GN 及 T_{12}CN (N 为 A、G、C 或 T)。

1.2 总 RNA 提取及逆转录

总 RNA 提取参照 Chomczynski 报道的酸性异硫脲一步法^[2], 甲醛凝胶电泳鉴定其完整性后以无 RNase 的 DNase I 消化去除残余 DNA: 在 100 μL DNase 消化体系中含 50 μg RNA、25 mmol/L Tris·Cl (pH 8.3)、37.5 mmol/L、2 mmol/L MgCl_2 、50 U RNasin 和 20 U RNA free DNase I, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 等体积酚/氯仿抽提 1 次, 水相加 20 μL 3 mol/L 乙酸钠及两倍体积无水乙醇, -20 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 离心收集 RNA 沉淀, 75% 冰乙醇洗涤 3 次, 室温晾干, 适量 DEPC 处理水溶解, 紫外吸收法定量后进行逆转录。逆转录体系总体积为 50 μL : 含 50 mmol/L Tris-Cl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L spermidine, 0.5 mmol/L dNTPs, 50 U RNasin, 50 U AMV 酶、200 pmol 简并“锚定”引物及 10 μg 经 DNase I 消化的总 RNA, 室温温育 10 min 后移入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴继续温育 1.5 h, 沸水浴 10 min 灭活逆转录酶, 加 DDW 至 100 μL , -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。

1.3 PCR 扩增

20 μL 扩增体系中含: 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.8)、2.5 mmol/L MgCl_2 、50 mmol/L KCl、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dNTPs、10 核苷酸随机引物及 PCR “锚定”引物 T_{12}AN 、 T_{12}GN 或 T_{12}CN 各 20 pmol、1.5 U Taq DNA 聚合酶、2.5 μL (250 ng) cDNA; 94.5 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 3 min 后进入 PCR 循环, PCR 扩增参数如下: 94.5 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 40 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 40 个循环, 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染

扩增后的 PCR 产物于 5% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 凝胶板大小为 200 mm \times 200 mm, 胶厚度为 0.5 mm; 上样后以 200 V 电泳直至二甲苯青接近底部。电泳后的聚丙烯酰胺凝胶采用高敏 DNA 银染试剂盒染色。

1.5 差异表达 PCR 产物回收及再扩增

对比两组间的 PCR 产物条带, 回收差异较显著的 PCR 条带, 加 DDW 洗涤胶块 2~3 次后加 30 μL DDW 并捣碎, 于沸水浴中煮沸 5 min, 冷却后离心收集上清进行回收产物的再扩增。在 50 μL 扩增体系中含: 10 mmol/L Tris-Cl (pH 8.8)、2.5 mmol/L MgCl_2 、50 mmol/L KCl、200 $\mu\text{mol}/\text{L}$ dNTPs、原随机引物及原 PCR “锚定”引物各 40 pmol、2.5 U Taq DNA 聚合酶及 5 μL 回收 PCR 产物上清。94.5 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min 后进入 PCR 扩增, 循环参数如下: 94.5 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、42 $^{\circ}\text{C}$ 2 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环, 最后于 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、观察, 并回收再扩增的 PCR 产物。

1.6 RNA 点杂交鉴定

总 RNA 按上述 1.2 方法自原发性胃癌及肺转移胃癌组织标本中提取, 点样量为 20 μg

点;另取上述回收再扩增的部分 PCR 产物作为探针标记模板,参照 DIG DNA 标记及检测试剂盒说明进行探针标记及杂交检测.

1.7 PCR 产物克隆及测序

按 PCR 产物克隆试剂盒说明将回收再扩增的 PCR 产物克隆入 pGEM T-A 克隆质粒载体.按快速转化试剂盒说明将重组质粒转化宿主菌,经蓝/白选择、Not I 及 Kpn I 双酶切鉴定菌落后,采用自动测序仪进行正、反向测序;对测序结果进行 GenBank 同源性检索.

2 结果

2.1 银染 DD-PCR 条件选择

首先取来自体外培养 MGC 803 和 SGC 7901 胃癌细胞的总 RNA 建立银染 DD-PCR 方法,并对 PCR 扩增条件及 cDNA 模板投入量进行了优化和选择.图 1 所示为不同 cDNA 投入量的银染差异显示结果,可见投入量为 250 ng 时差示效果最好,500 ng 时扩增条带密集而难以分辨,而低于 250 ng 则使条带明显减少.以所选条件对原发性胃癌和肺转移胃癌进行差异显示分析,银染后 DNA 条带在 200~1000 bp 以上范围内可清楚分辨出 20~60 多条 PCR 产物条带,两组间的条带有较好的可比性.采用不同 PCR 引物组合进行扩增和差示,可见原发性胃癌与肺转移胃癌在基因表达上存在一定差异,部分结果见图 2.为检验 DD-PCR 扩增带的真实性,从原发性胃癌所展示的扩增带中随机取 5 个条带,再扩增后以取自 MGC 803 和 SGC 7901 细胞的 RNA 点样进行点杂交,显示 5 个回收条带均有杂交信号,表明所回收的条带均为真实带.

2.2 差示分析及回收条带验证

从上述对原发性胃癌与肺转移胃癌 RNA 的银染差示分析中获得一系列的差异表达条带,本文对其中 2 条差异表达 PCR 产物条带进行了分析.两回收条带以原引物再扩增后电泳显示均有扩增条带(见图 3).以原发性胃癌及肺转移胃癌的总 RNA 对两再扩增产物进行点杂交验证的结果显示:其中 1 条(MGD1)在肺转移胃癌呈高表达,而在原发性胃癌中则呈低表达,而另 1 条(PGD2)在肺转移性胃癌中呈低表达,但在原发性胃癌中呈高表达(见图 4).提示 MGD1 与胃癌转移相关,而 PGD2 则与转移抑制有关.

2.3 差异表达条带克隆及测序分析

上述 2 条 PCR 产物条带克隆、转化后,经 NotI 及 Kpn I 双酶切鉴定显示均有克隆片段.分别测序显示片段 MGD1 及 PGD2 大小分别为:372 bp 及 749 bp.经 GenBank 同源性分析显示:MGD1 与肿瘤转移相关基因 MTA1(metastasis-associated gene 1)完全同源,PGD2 则与细胞周期抑制蛋白 p27/Kp1 具 99% 的同源性.部分序列如下:

MGD1(与 MTA1 100% 同源)

```
CCTCCGCCCTCACCTGAAGAGAAACGCGCTCCTTGCGGACACTGGGGGAGGAGAGGAAGAA GCGCG
GCTAACTTATTCCGAGAATGCCGAGGAGTTGTCTTTTTAGCTTTGTGTTTACTTTTTGGCTGGAGCGGA
GATGAGGGCCACCCCGTGCCCTGTGCTGCGGGCCTTTGCCCGGAGGCCGGCCCTAAGGTTTTGT
TGTGTTCTGTTGAAGGTGCCATTTTAAATTTTATTTTTATTACTTTTTTTGTAGATGAACTTGAGCTCTGTA
ACTTACACCTGGAATGTTAGGATCGTGCGCCGCGGCCCGCCGAGCTGCCTGCCGGGTGGCCCTTGT
CTTTTACCCGCCC
```

PGD2(与 p27/Kip1 99% 同源)

```

GGCTTTAATATTTAAGCAACAGAAACCTATCCTCACTGCCCTCCCCAGTCTCTCTTAAAAGTTGGAATTTACC
AGTTAATTACTCAGCAGAATGGTGATCACTCCAGGTAAGTTGGGGCAAAAATCCGAGGTGCTTGGGAGTT
TTGAATGTTAAGAATTGACCATCTGCTTTTATTAATTTGTTGACAAAATTTTCTCATATTCTTTTCACTTCG
GGCTGTGTAAACACAGTCAAAATAATTTCTAAATCCCTCGATATTTTTAAAGATCTGTAAGTAACTTCACATT
AAAAAATGAAATATTTAATAATTAAAGCTTACTCTGTCCATTTATCCACAGGAAAAGTGTTATTTTTAAAGGA
AGGTTTATGTAGAGAAAAGCACACTTGTAGGATAAGTGAAATGGATACTACATCTTTAAACAGTATTTTCAT
TGCCCTGTGTATGGAAAAACCATTTGAAGTGTACCTGTGTACA TAACTCTGTAAAAACACTGAAAAATATA
CTAACTTATTTATGTTAAAAGATTTAAATTAACTCTAGACAATATACAAGCCAAA GTGGCATGTTTTGTGCATT
TGTAAATGCTGTGTTGGGTAGAATAGGTTTTCCCCTCTTTGTTAAAT AATATGGCTATGCTTAAAAGGTTG
CATACTGAGCCAAGTATAATTTTTTGTAAATGTGTGAAAAAGATGCCAATTATTGTTACACATTAAGTAATCA
ATAAAGAAAACCTCCATAGCT

```

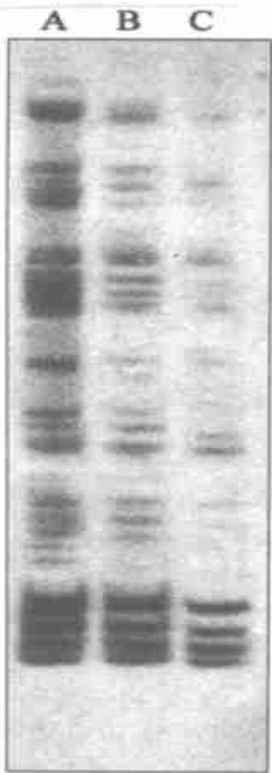


图 1 不同 cDNA 投入量对银染差示结果的影响

A: 500 ng; B: 250 ng; C: 100 ng

Fig. 1 Effect of different amount of cDNA on results of silver stained DD-PCR

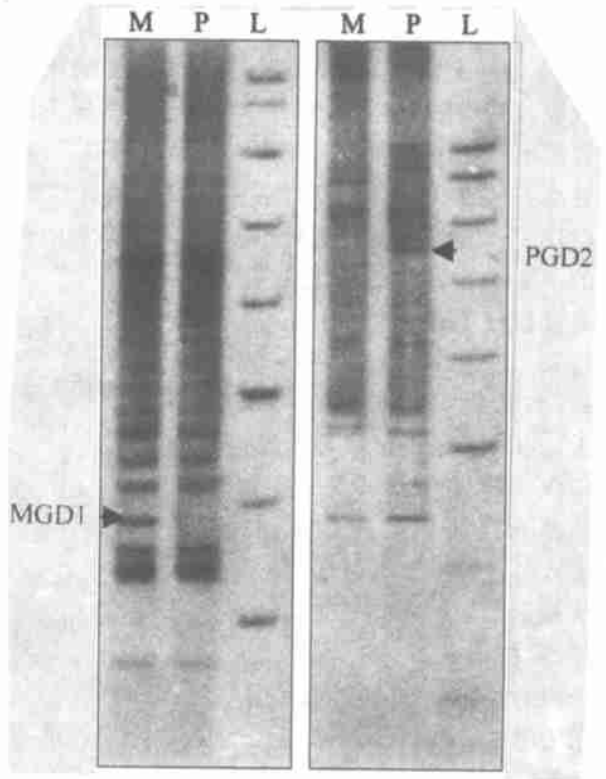


图 2 原发性胃癌和转移性胃癌银染差示部分结果

M: 肺转移灶胃癌; P: 原发灶胃癌;

L: 100 bp DNA Ladder

Fig. 2 Results of silver stained DD-PCR on primary and metastatic gastric cancer

3 讨论

在生命科学领域中相当多的研究工作集中于基因表达的分析 and 功能基因的筛选与克隆, mRNA DD-PCR 技术是近年在这方面应用最广泛的技术之一^[1]. 与消减杂交技术相比, DD-PCR 技术不仅简便快速, 而且可同时处理多个样品. 在进行 DD-PCR 时, 人们通常采用同位素放射自显影来展示 PCR 扩增产物. 放射自显影技术虽可提高显示扩增产物的敏感性, 观察到较多的扩增条带, 但使用放射自显影技术展示扩增产物只能从显影的底片上观察条带的图象, 凝胶上真正的条带却是肉眼不可见的, 因此从测序胶上回收差异 DNA 条带就成为一大技术难题^[3]. 为割下差异 DNA 条带, 需将显影了的底片与凝胶片准确贴合, 再根据底片上显示的差异条带位置割出凝胶块, 只要底片与凝胶片稍微错位, 所割的就会是不含 DNA 条带的空白凝胶块或含非差异 DNA 条带的凝胶块, 这是造成 DD-PCR 高假阳性率的主要原因^[3]. 此外, 采用放射自显影法不仅易造成同位素污染, 而且对实验设备要求高、实验周期也长(约 5~6 天). 本文所采用银染显示法, 不仅快速简便(从 RNA 提取到差异条带回收仅需 2~3 天), 而且假阳性率很低, 我们从差示胶上回收 5 条扩增条带, 再扩增及 RNA 点杂交验证均为真实条带. 虽然银染显示法所显示的 DNA 条带较少, 但凝胶上所显示的条带直观可见, 即使是初学者也易割出差异条带, 而且假阳性带的减少不仅大大减少验证回收带的工作量, 同时也节约了珍贵的 RNA 样品.

文献报道的 DD-PCR 通常采用一组“锚定”引物(anchor primer), 并配合不同的十核苷酸任意引物. 逆转录时, RNA 需分组以不同的“锚定”引物进行逆转录, 然后各组 cDNA 再以原“锚定”引物组合不同十核苷酸任意引物进行 PCR 扩增^[1,4]; 不仅繁琐, 也易造成样品间的不一致. 本文采用简并“锚定”引物对 RNA 进行一次性逆转录, 再以不同的 PCR “锚定”引物组合十核苷酸任意引物进行 PCR 扩增, 从而简化实验步骤. 此外, 回收差异条带的验证通常只是为了证实回收的 DNA 片段的真实性^[5], 因此采用 RNA 点杂交也同样能达到目的, 而与通常采用的 Northern Blot 法比较, RNA 点杂交显然要方便和快速的多.

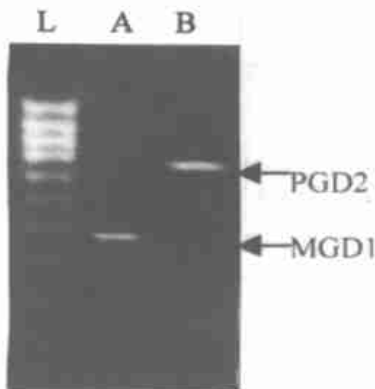


图 3 回收条带再扩增产物琼脂糖电泳鉴定结果
A: MGDL; B: PGD2; L: 100 bp ladder

Fig. 3 Identification results of electrophoresis on 2 recovered and re-amplified DNA bands

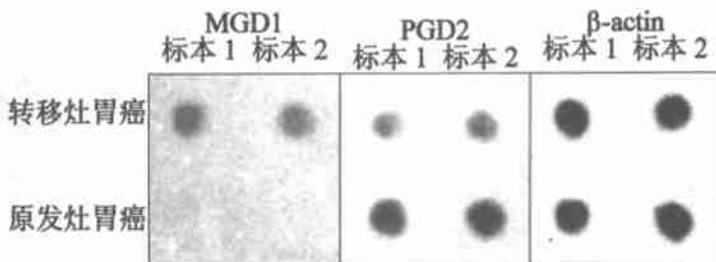


图 4 2 个差异表达产物 RNA 点杂交验证结果

Fig. 4 Identification results of RNA dot blot on 2 differential expression DNA bands

通过差异比较,我们从银染凝胶上获得系列差异表达的 DNA 条带,本文对其中 2 个回收条带作了分析.经测序和 GeneBank 同源检索,其中 MGD1 在转移性胃癌组织中呈高表达,与肿瘤转移相关基因 MTA1 同源;PGD2 在原发性胃癌组织中呈高表达并与编码细胞周期抑制蛋白的 p27/Kip1 具 99% 的同源性.MTA1 是 Toh 等^[6]于 1994 年采用 cDNA 文库差选法从大鼠乳腺癌细胞中筛选到转移相关基因,随后他们采用 Northern Blot 及 RT-PCR 法相继证实具有浸润和转移倾向的人乳腺癌、结直肠癌、胃癌及食道癌,MTA1 基因也呈高表达^[7-9],表明 MTA1 是一种序列保守的且作用广泛的肿瘤转移相关基因,最近他们已克隆出人 MTA1 基因,并初步认为是一种核转录因子^[10].p27Kip1 是细胞周期抑制蛋白之一,可以化学计量方式结合到 cyclinE-CDK2 和 cyclinD-CDK4 复合物上并抑制其活性,从而参与对细胞周期 G₁S 调控点(check point)的调控^[11].新近的文献报道表明 p27Kip1 低表达也与肝癌、结直肠癌、胃癌及食道癌等消化系统肿瘤的浸润和转移倾向有关,可能是一种转移抑制基因^[12-15];但与乳腺癌转移无相关性^[16].本文以银染差异显示技术所获得的结果也表明:MTA1 的高表达和 p27Kip1 的低表达与胃癌转移存在相关性,同时也表明本文所建立银染差异显示技术适用于差异表达基因的分析 and 克隆.

参考文献:

- [1] Matz MV, Lukyanov SA. Different strategies of differential display: areas of application[J]. Nucleic Acids Res, 1998, 26(24): 5 537- 5 543.
- [2] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal. Biochem., 1987, 162(2): 156- 159.
- [3] Schnabel M, Bortolussi G, Fichtel I, et al. Detection of differential gene expression in human osteoblastic cells by non-radioactive RNA arbitrarily primed PCR[J]. Int J Mol Med, 1998, 1(3): 593 - 595.
- [4] Zhang JS, Duncan EL, Chang AC, et al. Differential display of mRNA[J]. Mol Biotechnol, 1998, 10(2): 155- 165.
- [5] Corton JC, Gustafsson JA. Increased efficiency in screening large numbers of cDNA fragments generated by differential display[J]. Biotechniques, 1997, 22(5): 802- 804, 806, 808.
- [6] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. A novel candidate metastasis-associated gene, mtal, differentially expressed in highly metastatic mammary adenocarcinoma cell lines. cDNA cloning, expression, and protein analyses[J]. J. Biol. Chem., 1994, 269(37): 22 958- 22 963.
- [7] Toh Y, Pencil SD, Nicolson GL. Analysis of the complete sequence of the novel metastasis-associated candidate gene, mtal, differentially expressed in mammary adenocarcinoma and breast cancer cell lines [J]. Gene, 1995, 159(1): 97- 104.
- [8] Toh Y, Oki E, Oda S, et al. Overexpression of the MTA1 gene in gastrointestinal carcinomas: correlation with invasion and metastasis[J]. Int J Cancer, 1997, 74(4): 459- 463.
- [9] Toh Y, Kuwano H, Mori M, et al. Overexpression of metastasis-associated MTA1 mRNA in invasive oesophageal carcinomas[J]. Br J Cancer, 1999, 79(11- 12): 1 723- 1 726.
- [10] Toh Y, Kuninaka S, Endo K, et al. Molecular analysis of a candidate metastasis-associated gene, MTA1: possible interaction with histone deacetylase 1[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2000, 19(1): 105

- [11] 陈坚. 参与细胞调控的多功能分子 p27[J]. 国外医学遗传学分册, 1998, 21(1): 7- 10.
- [12] Kim DH, Lee HI, Nam ES, et al. Reduced expression of the cell-cycle inhibitor p27Kip1 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma[J]. *Histopathology*, 2000, 36(3): 245- 251.
- [13] Tannapfel A, Grund D, Katalinic A, et al. Decreased expression of p27 protein is associated with advanced tumor stage in hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(4): 350- 355.
- [14] Yao J, Eu KW, Seow-Choen F, et al. Down-regulation of p27 is a significant predictor of poor overall survival and may facilitate metastasis in colorectal carcinomas[J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(3): 213- 216.
- [15] Shamma A, Doki Y, Tsujinaka T, et al. Loss of p27(KIP1) expression predicts poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Oncology*, 2000, 58(2): 152- 158.
- [16] Barbareschi M, van Tinteren H, Mauri FA, et al. p27(kip1) expression in breast carcinomas: an immunohistochemical study on 512 patients with long-term follow-up[J]. *Int J Cancer*. 2000, 89(3): 236- 241.

A Modified Silver Stained Differential Display Method and Its Application

CHEN Rui-chuan¹, CAI Ke-xia¹, MA Shen-ping¹,

CHEN Fu¹, FU Yong-gui¹, ZENG Huan²

(1. Life Science School, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China;

2. Lab. of Oncolog, Xiamen Second Hospital, Xiamen 361003, China)

Abstract: Described here was a silver stained mRNA differential display PCR (DD-PCR) method which was modified from traditional DD-PCR technique and used for analysis of differential expressed genes between primary and metastatic gastric cancer tissues. To confirm the reliability of this method, five PCR fragments were randomly selected from primary gastric cancer sample and were verified by RNA dot blot with total RNA extracted from cultured gastric cancer cell lines. Two fragments — MGD1 and PGD2 were subjected to verification by RNA dot blot with total RNA respectively extracted from primary and metastatic gastric cancer tissues and final sequencing. The confirmation results of five fragments showed that the randomly selected five fragments were all real products, indicating that the silver stained DD-PCR method possesses a good reliability. The analysis results of two fragments showed that MGD1, highly expressed in metastatic gastric cancer, is homology to MTA1 (metastasis-associated gene 1), and PGD2, highly expressed in primary gastric cancer, is 99% homology to cell cycle inhibitor p27/Kip1 gene, which may provide the new clues for research of molecular mechanism of gastric cancer metastasis.

Key words: silver stained DD-PCR; gastric cancer; metastasis associated gene