

小量快速RNA, DNA提取研究耐药株中GST π 及癌基因的表达

刘岳彪 陈亚军 吴德政

(军事医学科学院附属医院药理室, 北京 100039)

摘要 本文采用一种小量快速RNA制备法(硫氰酸胍-酚, 氯仿/异戊醇-液氮)和DNA-RNA联合提取法(硫氰酸胍-酚, 氯仿/异戊醇-液氮法), 提取RNA和同一样本中DNA与RNA, 同时采用一种快速液相杂交法, 通过标记探针与样品DNA或RNA经变性-复性杂交、凝胶电泳、凝胶抽干、放射自显影。经用本法研究P388/ADR耐药株中的GST π 及三种癌基因表达表明: 耐药株中的GST π 较敏感株增加1.56倍($p < 0.05$), 而c-myc、v-erb-B、N-ras癌基因的扩增分别减少1.33, 1.38和1.69倍($p < 0.05$)。

关键词: 总RNA提取; DNA-RNA提取; 快速基因杂交; 阿霉素耐药; GST π ; 癌基因

耐药是采用化疗药物治疗癌症遇到的主要问题之一。耐药性研究揭示耐药与肿瘤细胞内一系列生化和遗传学改变有关, 如: 多药耐药基因及其编码的P-GP糖蛋白的产生, DNA拓扑异构酶II的表达关闭, 谷胱甘肽-S-转移酶(GST π), O⁶-鸟嘌呤烷基转移酶, 二氢叶酸还原酶, 蛋白激酶C(PKC), 及抗氧化酶等变化^[1,2]。本文应用小量快速RNA、DNA提取及快速杂交法对P388/ADR耐药株进行了GST π 及三种癌基因分析, 为理解化疗耐药提供有益的资料。

材 料 和 方 法

一、材料

1. 同位素标记化合物: α -³²P-dCTP, 北京福瑞公司产品, 比活 ~ 3000 Ci/mmol。
2. 动物及细胞: P388/ADR阿霉素耐药株由作者诱导培养16个月, 耐药44.5倍。
3. 探针: (1) GST π 寡聚核苷酸序列, 45个bp(由本院遗传工程所合成),
5' -GCC-CTG-GTG-GAC-ATG-GTG-AAT-GAC-GGC-GTG-GAG-GAC-CTC-CGC-TGC-3'

为GST π 全序列的1352—1396位^[2,3], 为表达蛋白质的氨基酸序列87—101位编码。

(2) GST π 标记随机引物, 6个bp (本院遗传工程所合成), 为上述系列的3'-端互补引物, 3'-GCC-ACG-5'

(3) c-myc、v-erb-B、N-ras癌基因, 购自Sigma公司。

二、方法

1. RNA 最快速提取法:

(1) 细胞样品加适量GIT溶液混匀, 1—2min。

(2) 酚, 氯仿/异戊醇抽提, 12 000r/min离心2min, 重复抽提一次。

(3) 无水乙醇沉淀并置液氮2min。离心后保存。

2. DNA-RNA 联合提取法:

(1) 细胞样品加适量GIT溶液混匀, 4—5min。

(2) 酚、氯仿/异戊醇抽提, 5 000r/min离心5min, 将含DNA-RNA的上层水相移入新的EP管中, 加入酚, 氯仿/异戊醇, 12 000r/min离心5min。

(3) A: 取上层水相上部(含RNA)移入新的EP管, 按RNA提取法。

B: 步骤(2)的下层水相及酚、氯仿/异戊醇重新混匀, 按DNA提取法。

3. GIT一步RNA提取法, 见文献^[4]。

4. 快速杂交法:

(1) 杂交A: 取1 μ L³²P标记探针(2 \times 10²cpm, 探针比活2 \times 10⁸cpm/ μ g DNA, 掺入率为52—58%), 加入EP管, 1管中可同时加入2种以上探针。

B: 加入25ng样品DNA, 10 μ L杂交缓冲液(不含硅鱼精子DNA)^[4]于EP管中。

C1: 快速杂交, 将EP管置95 $^{\circ}$ C, 73 $^{\circ}$ C, 50 $^{\circ}$ C, 42 $^{\circ}$ C, 38 $^{\circ}$ C各水浴10min, 用于电泳。

C2: 一般杂交, 将EP管置95 $^{\circ}$ C, 水浴10min, 速置-20 $^{\circ}$ C 5min, 42 $^{\circ}$ C, 杂交16—24h, 用于电泳。

(2) 琼脂糖凝胶电泳: 样品RNA同DNA凝胶电泳^[5]。

A: 设一孔探针marker, 直接加入5 μ L稀释的³²P标记的DNA探针, 几种探针则设几种探针marker。

B: 一孔可同时加DNA杂交样品和RNA杂交样品, 各5 μ L。只加1种杂交样品则10 μ L。

(3) 凝胶抽干-放射自显影-图像分析。

结 果

(一) 小量快速RNA及DNA提取: Fig.1-a: 最快速法提取的RNA 28S、18S和5S带清晰; DNA-RNA联合提取的RNA可见18S、5S; AGPC一步法提取的RNA有降解。

Fig.1-b中常规法提取的DNA与DNA-RNA联合提取的DNA无差别。

(二) 快速杂交法结果:

(1) c-myc与DNA的快速杂交: 结果见Fig.2, 与探针marker比较可测杂交的DNA相对量。P388/ADR耐药株较敏感株P388/0 c-myc癌基因表达减少。

(2) GST π 合成探针的杂交: 结果见Fig.3, Table 1, RNA 0.8kb, DNA 3.8kb处出现

杂交带, 0.1kb 为未杂交的探针。P388/ADR 耐药株较敏感株 P388/0 GST π RNA 表达增加 1.56倍 (β -actin 为内标)。

Table 1 The amplification and expression of GST π and three oncogenes in P388/ADR resistant lines

Sample	GST π / β RNA	c-myc/ β DNA	v-erb-B/ β DNA	N-ras/ β DNA
P388	0.632 \pm 0.12	14.6 \pm 2.45	2.936 \pm 0.67	13.9 \pm 2.57
P388/ADR	0.991 \pm 0.18	10.96 \pm 1.94	2.123 \pm 0.56	8.21 \pm 1.87
Amplification and expression-fold	1.56 *	-1.33 *	-1.38 *	-1.69 *

$\bar{x} \pm s$ n=6 “*” p<0.05

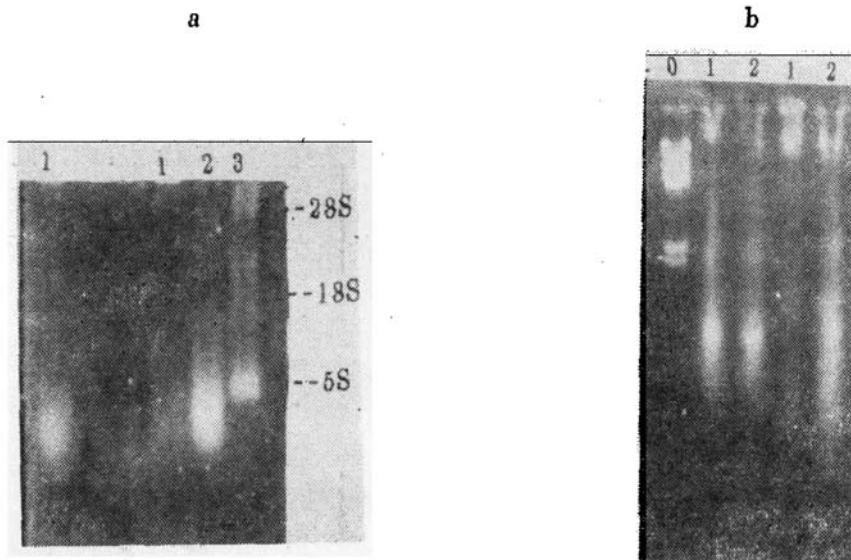


Fig.1 RNA or DNA by using the most rapid method of RNA isolation (MRRI) and DNA-RNA isolation (D-RCI) a, 1, RNA by AGPC single step method. 2, RNA by D-RCI. 3, RNA by MRRI electrophoresed in 1% formaldehyde-agarose gel b, 1, DNA by conventional DNA isolation method. 2, DNA by D-RCI. 0, λ -Hind III marker electrophoresed in 0.8% agarose gel after digested with Hind III.

(3) 四种探针的杂交: 如Fig.4, Table 1, 同一凝胶含 4 种探针同P388及 P388/ADR细胞DNA及RNA的杂交, 并有同一样品 DNA与RNA杂交的比较。P388/ADR 耐药株较敏感株 P388/0 GST π RNA 表达增加。P388/ADR 耐药株较敏感株 P388/0 c-myc、v-erb-B、N-ras癌基因表达减少分别为1.33, 1.38, 1.69倍 (β -actin 为内标)。

讨 论

DNA-RNA 联合提取法是利用差速离心方法将同一样品中的 RNA 和 DNA 分别抽提, 由于该法取样量少, 可用于临床疾病诊断尤其肿瘤诊断时待检组织或细胞的 DNA 和 RNA 的同

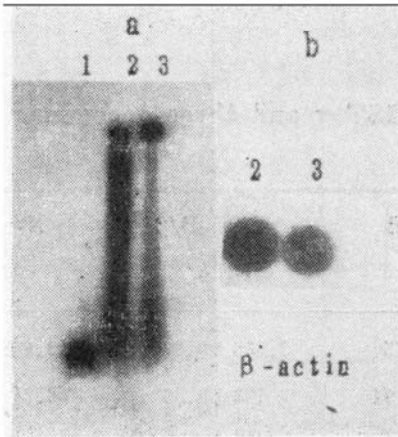


Fig. 2 DNA (100ng) hybridized to c-myc with the rapid hybridization method a,1, c-myc probe marker. 2, P388, 3, P388/ADR. b, β -actin control. The amplification of c-myc in P388/ADR resistant line was decreased.

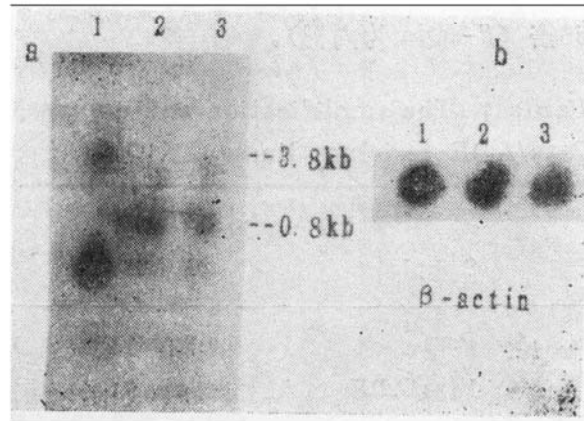


Fig. 3 DNA or RNA (100ng) hybridized to GST π probe with the rapid hybridization method a,1, DNA from P388. 2, RNA from P388/ADR. 3, RNA from P388. b, β -actin control.

时提取和分析。快速杂交法在小管中快速杂交-电泳-凝胶抽干-放射自显影，省略了经典方法中杂交袋内杂交和印迹转移等过程，且单个小管内杂交有许多优点：1，同一小管可以是DNA或RNA或二者在一起，与一种或多种探针杂交（本文只用了一种）。2，凝胶电泳时将多个不同小管内的杂交样品点样可同时有DNA及RNA的杂交结果，通过图像分析杂交点的光密

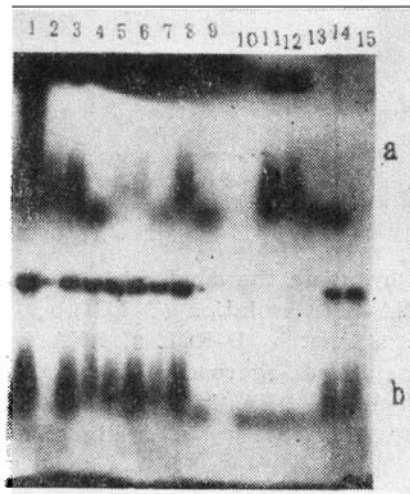


Fig. 4 DNA or RNA (100ng) isolated with the rapid hybridization methods hybridized to c-myc, N-ras, v-erbB, GST π probe. a,2-7 for c-myc, 2-3,4, DNA and RNA from P388, 5, 6, 7, DNA and RNA from P388/ADR. 8-14 for N-ras, 8, 9-DNA and RNA from P388, 11, 12-DNA from P388/ADR and P388, 13, 14-RNA from P388/ADR and P388. b, 1-8 for v-erbB,1, 3, 6, 8, DNA from K562 S180 P388/ADR, P388 cells respectively, 4, 5, 7, DNA from P388/ADR and P388. 9-15 for GST π , 9-11, 12,13, RNA from P388 and P388/ADR, 14, 15, DNA from P388/ADR and P388.

度进行半定量分析。因此与Southern和Northern方法及国内报道的直接杂交法^[6,7]有区别。

目前一些研究^[1,2]表明: GST π 在耐药株细胞中增高, 例如, 在 ADR 耐药的乳腺癌 MCF-7/ADR 中 GST π 高 45 倍。Deffie 研究 P388 对阿霉素的耐药, Northern Blot 发现 GST π 的耐药株比敏感株 mRNA 增高 2 倍, GST 酶活性比敏感株增高 1.44 倍^[1]。本文杂交的结果显示: 耐药株 P388/ADR 比敏感株 P388/0 的 GST π 表达增高 1.56 倍, P388/ADR 耐药株较敏感株 P388/0 的 c-myc、v-erb-B、N-ras 癌基因表达减少与作者用常规方法所得结果一致^[8]。通过应用快速杂交法研究 P388/ADR 中的 GST π 及三种癌基因的表达表明该方法在所需探针量, 样品量及多种基因的比较明显优于其它杂交方法, 且简单方便, 快速, 还可通过同一样品中 DNA-RNA 的提取应用该法研究同一样品中的 DNA 的扩增及 RNA 的表达及其关系, 所以该方法值得推广应用。

参 考 文 献

- 1 Deffie A M, et al. *Cancer Research*, 1988, 48:3595-3602
- 2 Fairchild C R, et al. *Mol Pharmacol*, 1990, 37(6):801-809
- 3 Morrow C S, et al. *Gene*, 1989, 75:3-11
- 4 Piotk Chomczynski, Niedetta Sacchit. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162:156-159
- 5 蔡良旋. 核酸研究技术 (上册), 科学技术出版社, 1989, 59
- 6 黄承汉, 等. 生物化学杂志, 1986, 2(4):9-15
- 7 金顺钱, 等. 生物化学与生物物理进展, 1992, 19(3):240-241
- 8 刘岳彪, 等. 中华医学杂志, 1993, 73(9): 544-546

A Rapid Mini-Preparation Method for RNA, DNA Isolation to Study the Expression of GST π and Oncogenes in Resistant Lines

Liu, Yue-biao Chen, Ya-jun Wu, De-zheng

(Department of Clinical Pharmacology, North Taiping Road Hospital, Beijing 100039)

Abstract A rapid mini-preparation method for RNA isolation (MRRI) by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform-liquid nitrogen-extraction is described. The DNA-RNA combining method for DNA and RNA isolation (DRCI) in uniform cells by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform-liquid nitrogen extraction was adapted. We also adapted a rapid liquid hybridization method (RLH), a new rapid procedure that DNA or RNA hybridized to ³²p-labeled probe after denature-annealing-renaturation of sample and probe in Eppendorf tube, followed by 1.0% agarose gel electrophoresis, agarose gel dryer and autoradiography. The expression of GST π and three oncogenes in P388/ADR resistant lines by using the MRRI, DRCI and RLH method had shown that the expression of GST π RNA in P388/ADR resistant lines was increased by 1.56-fold ($p < 0.05$), whereas the amplification of c-myc, v-erbB, N-ras oncogenes was decreased by 1.33, 1.38, 1.69-fold ($p < 0.05$) respectively as compared with P388/0 sensitive lines.

Key words: RNA Isolation; DNA-RNA Isolation; Rapid Gene Hybridization Methods; Adriamycin Resistant; Glutathione S-Transferases π ; Oncogene