

mRNA 差异显示技术的改进及在肿瘤中的应用

李友军 关勇军 综述 陈主初 审校

湖南医科大学肿瘤研究所 长沙 410078

在真核生物中,从个体的发育、生长、衰老、死亡,到组织、细胞的分化、凋亡以及细胞对各种生物、理化因子的应答,本质上都涉及基因在时间上或空间上选择性表达,即基因的差异表达,因而获取差异表达的基因将有助于了解正常生理变化和病理改变的分子机制,为基因诊断、基因治疗和发现新的药物靶分子提供新的视野。

研究基因差异表达主要技术有:消减文库筛选(subtractive library screening)、差异杂交(differential hybridization)、mRNA 差异显示(mRNA differential display)、代表性差异分析(Representational Display Analysis, RDA)、基因表达系列分析(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)和电子消减(electronic subtraction)等技术。消减文库筛选和差异杂交是筛选两组分子间差异基因的常规方法⁽¹⁾;mRNA 差异显示⁽²⁾和代表性差异表达分析^(3,4)是基于 PCR 技术、很灵敏的检测差异表达基因的方法;而 SAGE 是通过快速和详细分析成千上万个 EST (Expressed Sequenced Tags)来寻找出表达丰度不同的 SAGE 标签序列^(5,6);电子消减则是通过比较相同基因的 cDNA 文库中被重复测序出现次数,可以粗略推算出该基因在不同文库中的丰度差异^(7,8,9)。表 1 总结了各种方法的技术关键、优缺点。

表 1 研究基因差异表达的方法比较

方 法	关键技术	优 点	缺 点
消减文库	基于差异杂交的 cDNA 消减	重复性高	灵敏度低 不易检测 低丰度基因 费时、费力
电子消减	基于计算机分析 EST 的消减	快速 可知差异表达基因的序列	要求大规模的测序 只能检测高丰度基因
SAGE	综合分析多重短的序列标签	快速 详细分析大量转录本	难获取全长 cDNA
RDA	基于 PCR 技术的消减杂交	非常灵敏	技术难、费时
mRNA 差异显示	改进的 RT-PCR 技术	灵敏,多样本比较 能检测高表达和低表达基因	假阳性高 片段为 3' 端非翻译区

迄今为止,上面的几种方法均已成功应用于研究基因的差异表达。尤其是新近发展的 mRNA 差异显示技术,具有简便、快速、灵敏等优点,已被许多实验室作为一种重要工具,应用于体内和体外差异表达基因的筛选。现将 mRNA 差异显示技术的简要工作流程,近来的改进和提高及在筛选肿瘤相关基因中的作用作简要综述。

and chlorothalonil) in human lymphocytes with the comet assay. *Mutat Res*, 1997;375:205

19 Slamenora D, Gabelova A, Ruzekova L, et al. Detection of MNNG induced DNA lesions in mammalian cell; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkalion elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 1997;383:243

20 张遵真,衡正昌,王涛. 彗星试验中两种染毒条件的对比研究. 现代预防医学杂志,1999;

21 马爱国,韩秀霞,刘四朝. 两种 DNA 断裂损伤检测方法敏感性的比较. 遗传. 1997;19(1):32

22 Ashby J, Yendle JE, Tinwell H, et al. The genetic toxicity of time to the outcome of single cell gel electrophoresis assays. *Mutat Res*, 1997;375:125

23 Klaude M, Eriksson S, Nygren J, et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res*, 1996;363:89

(1998 - 12 - 22 收稿,1999 - 04 - 09 修回)

如前所述,纺锤体关卡保证了细胞分裂过程中染色体正确分离和分配,从而维持了染色体的稳定性。如果纺锤体关卡基因发生突变,势必会影响染色体的稳定性。这种假设与 C. Lengauer 的推论是一致的。基于这种想法,Chaill 等人对 19 株具有 CIN 表型的结肠癌细胞株进行了检测,发现其中有两株 hBub1 基因发生突变。用这两种 hBub1 突变体分别构建载体,并载入 MIN 型结肠癌细胞株内,结果导致 MIN 型细胞内正常的纺锤体关卡失去作用而表现为 CIN 型细胞特性。⁽¹¹⁾ 尽管以上结果还不能肯定说明肿瘤细胞中关卡基因突变所起的作用,但足以说明关卡基因突变可能引起的 CIN。在乳腺癌 T47D 细胞系中纺锤体关卡失效同时 hsMad2p 含量低于正常细胞的 1/3,hsMad2p 功能降低有可能是该细胞系纺锤体关卡失效的原因,并且最终可能会促进乳腺癌的发生。⁽¹⁰⁾

此外,抑癌基因 P53 可能也是纺锤体关卡组成成分,对于维持细胞二倍体稳定起着重要作用。有文献报道,P53 缺陷细胞的纺锤体关卡失效。当这种细胞暴露于纺锤体阻滞剂时,细胞不会停留于中期而继续分裂形成遗传不稳定的多倍体。⁽²⁷⁾ P53 丢失或灭活可能是纺锤体关卡失效的原因,并最终导致多倍体或非整倍体的形成。

3 展望

纺锤体关卡基因的突变或表达低下在致癌过程中的确切作用还有待于进一步研究。对这一方面研究无疑具有较大的理论和实际意义。一方面可以丰富致癌理论,深入了解基因突变和染色体畸变之间的关系;并且作为新的遗传毒性终点,可以对一些致癌物加以重新认识和重新评价。另一方面可以为肿瘤的化疗和基因治疗提供新的思路。

参考文献

- 1 Kim Nasmyth. Viewpoint: putting the cell cycle in order. *Science*, 1996;274:1643
- 2 Elledge SJ. Cell cycle checkpoint: preventing an identity crisis. *Science*, 1996;274:1664
- 3 Hoyt MA, Totis L, Roberts BT. *S. Cerevisiae* gene required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, 1991;66:507
- 4 Li R, Murry AW. Feedback control of mitosis in Budding Yeast. *Cell*, 1991;66:519
- 5 Robert BT, Far KA, Hoyt MA, The *Saccharomyces cerevisiae* checkpoint gene Bub1 encodes a novel protein kinase. *Mol Cell Bio*, 1994;14:282
- 6 Hardwick KG, Murray AW, Mad1p, a phosphoprotein component of

- the spindle assembly checkpoint in Budding Yeast. *J Cell Biol*, 1995;131:709
- 7 Hardwick KG, Weiss E, Luca FC, et al. Activation of the Budding Yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science*, 1996;273:953
- 8 Chen RH, Waters JC, Salmon ED, et al. Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science*, 1996;274:242
- 9 Taylor SS, Mckeon F. Kinetochores localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, 1997;89:727
- 10 Li Y, Benezra R. Identification of human mitotic checkpoint gene: hSMAD2. *Science*, 1996;274:246
- 11 Ahill DP, Lengauer C, Yu J, et al. Mutation of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Science*, 1998;392:300
- 12 Pennisi E. Cell division gate keepers identified. *Science*, 1998;279:477
- 13 Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth N. Cohesins: chromosomal protein that prevent premature separation of sister chromatid. *Cell*, 1997;91:35
- 14 Guacci V, Koshland D, Strunnikov A. A direct link between sister chromatid cohesion and chromosome condensation revealed through the analysis of Mcd1 in *S. Cerevisiae*. *Cell*, 1997;91:47
- 15 Yamamoto A, Vguaca, Koshland D, Pds1p, an inhibitor of anaphase in Budding Yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J Cell Biol*, 1996;133:99
- 16 Funabiki H, Yamano H, Kumada K, et al. Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in Fission Yeast. *Nature*, 1996;381:438
- 17 King RW, Deshaies RJ, Peters J, et al. How proteolysis drives the cell cycle. *Science*, 1996;274:1652
- 18 Schwab M, Lutum AS, Sellfert W, Yeast Hct1 is a regulator of b2 cyclin prteolysis. *Cell*, 1997;90:683
- 19 Visintin R, Prinz S, Amon A, CDC20 and CDH1: a family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science*, 1997;278:460
- 20 Kim SH, Lin DP, Matsuiamoto S, et al. Fission Yeast sep1: an effector of Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science*, 1998;279:1045
- 21 Hwang LH, Lan LF, Smith DL, et al. Budding Yeast CDC20: target of spindle checkpoint. *Science*, 1998;279:1041
- 22 Elledge SJ, Mitotic arrest: Mad2 prevent sleepy from waking up the APC. *Science*, 1998;279:999
- 23 Hardwick KG. The spindle checkpoint. *TIG Journal*, 1998;14:1
- 24 Kadhiin MA, Macdonald DA, Goodhead DT, et al. Transition of chromosome instability after plutonium-particle irradiation. *Nature*, 1992;355:738
- 25 Limoli CL, Kaplan MI, Corconan J, et al. Chromosomal instability and its relationship to other end points of genomic instability. *Cancer Res*, 1997;57:5557
- 26 Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Genetic stability in colorectal cancers. *Nature*, 1997;368:623
- 27 Cross SM, Sanchez CA, Morgan CA, et al. A p⁵³-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, 1995;267:1353

(1998 - 10 - 28 收稿;1999 - 03 - 10 修回)

1 mRNA 差异显示的简要工作流程(如图 1)

总 RNA 分离

DNase⁻ 消化基因组 DNA

RT-PCR、测序胶分离

回收差异带和重扩增

Northern 杂交证实

亚克隆、测序和同源性分析

新序列,全长 cDNA 的克隆

基因的功能分析

2 mRNA 差异显示技术的改进和提高

2.1 引物设计的优化和逆转录的简化

Liang 等开始建立差异显示技术时,设计的 3 端引物 T₁₂MN(M 为 A、C 或 G,N 为 A、G 或 T)即 3 端有 12 条引物,而 5 端有 20 条随机引物,每条引物由 10 个碱基组成。通过计算机分析表明:这种组合从统计学上讲,差异表达的基因会 100%地被筛选出来。实践证明,此法虽有效,但非特异性带较多,假阳性较高,后续步骤较麻烦。1994 年, Ito 等⁽¹⁰⁾对 3 端引物进行简化,把 12 种引物改为 3 种即 T₁₂A、T₁₂C、T₁₂G,减少了反应数。1996 年, Clontech 公司对 3 端引物加上 5'-CAT TAT GCT GAG TGA TA-3' 17bp,5 端引物加上 5'-ATT AAC CCT CAC TAA A-3' 16bp,这样使的 3 端、5 端引物分别达 29nt、25nt 长。经这样的改进,引物的 T_m 值可达 60℃,从而使后续 PCR 严谨性提高,重复性更好和背景更低。而且由于 Taq 酶要求较理想的引物长度大于 11nt,因而长引物比短引物能使后续 PCR 更有效,并增加差异带的特异性⁽¹¹⁾。

Liang 等开始创建的 mRNA 差异显示,利用 3 端引物 T₁₂MN(M,N 为四种碱基中的一种,M 为能为 T)共 12 种,分别对 RNA 进行 cDNA 合成。1994 年, Ito 等⁽¹⁰⁾利用简化 3 端引物 T₁₂A、T₁₂G、T₁₂C 分别对 RNA 进行 cDNA 合成。而 1996 年, Luda B 等⁽¹¹⁾只用锚定引物 Oligo(dt)₂₅MN 对 RNA 进行单一 cDNA

合成,在 PCR 时进行分组。经这样的简化,能节省 RNA,特别是微量 RNA,且对于昂贵的逆转录酶,较经济,而且还增加了重复性。

2.2 PCR 的改进

1992 年, Liang 等开始提供的 PCR 参数为 94 30sec,42 1min,72 30sec,共 40 个循环,最后 72 延伸 5min。1995 年, Marten 等人⁽¹²⁾建议两步 PCR 法,开始 4 个循环为低严谨,然后采用高严谨。1996 年, Clontech 公司推荐的 PCR 参数为:开始 3 个低严谨循环:第一个循环,94 5min,40 5min,68 5min;接着两个循环:94 2min,40 2min,68 5min;而随后的 22 - 25 个为高严谨的循环:94 1min,60 1min,68 2min,最后 68 延伸 7min。经这样的改进,不仅保持差异带的特征性,而且还显著地增强了复重性和敏感性,降低了背景。

Marten⁽¹²⁾将利用长引物和上面两步 PCR 扩增的 mRNA 差异显示技术称为 EDD(Enhanced Differential Display)。

1996 年, Clontech 公司在 Delta RNA Fingerprinting kit 中引进 LA PCR(Long and Accuracy PCR)或 LD PCR(Long-Distance PCR)。较一般 PCR,LA PCR 能扩增长而准确的产物。据我们的经验,在 mRNA 差异显示中利用 LA PCR 具有以下优点:首先,LA PCR 结合长引物可以明显减少 PCR 循环数,减少非特异性扩增,从而降低背景;其次,常规 mRNA 差异显示只能检测 100 - 600bp 的范围,LA PCR 的引进,则显著提高差异带的检测范围(100bp - 2kb);最后,LA PCR 能对原始 mRNA 具有高度的忠实性,使后续步骤更为简便⁽¹¹⁾。

2.3 消除假阳性方法的建立

mRNA 差异显示技术在理论上十分简捷明了,但在实际操作中却存在许多问题。比较严重的是该技术的假阳性率较高,有时甚至高达 70%以上⁽¹³⁾。Hong 等认为从众多的带中筛选出差异表达的基因是这种技术的主要“瓶颈”(Bottle Neck)之一⁽¹⁴⁾。对于消除假阳性,设置对照和进行必要的跟踪实验是行之有效的。Sompayrac⁽¹⁵⁾提出以下一些策略:第一、进行双复管实验;第二、尽可能用细胞质 RNA,避免核 RNA 的污染;第三、消除基因组 DNA 的污染;第四、减少 PCR 循环数。此外,在 mRNA 差异显示中引入更严格和更特异扩增条件,如上面的 EDD,也可最大限度降低假阳性。

mRNA 差异显示中,分子大小相同的带重叠既会掩盖真阳性,也会造成假阳性。1994 年, Li (待续)