

TRAP 结合液体闪烁计数法半定量检测端粒酶活性

吴成秋* 陈雯¹ 张桥¹ 万德森²

¹中山医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室 ²肿瘤医院腹外科 广州 510089

摘要 本文介绍一种端粒酶检测方法,该方法是将 TRAP 法在 PCR 过程中引入³H-dCTP,结合液闪计数 cpm 半定量分析端粒酶活性。应用该方法检测端粒酶阳性的 CNE₂ 细胞和部分组织标本及 RNase A 或加热预处理后的对照标本,并与 TRAP 法相比较,结果显示 CNE₂ 细胞端粒酶阳性,10 个 CNE₂ 细胞中仍可检测到端粒酶,组织样品的端粒酶与文献值基本一致;放射性活性计数(cpm)与 CNE₂ 细胞抽提液中端粒酶活性具有良好的线性关系;用 RNase A 或加热处理后标本为阴性,cpm 值接近阴性对照;批内和批间变异度分别为 11.68% 和 20.99%。该方法不需使用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和放射自显影,简便快速,当天可观察结果,并具有灵敏度高、特异性和批内重复性好之特点。

关键词 端粒酶;定量分析;端粒重复序列扩增法;液体闪烁计数

QUANTITATIVE DETECTION OF TELOMERASE ACTIVITY BY COMBINATION OF TRAP METHOD AND SCINTILLATION COUNT ASSAY

Wu Chengqiu, Chen Wen, Zhang Qiao, et al

¹Department of Health Toxicology, School of Public Health, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guang Zhou 510089, ²Department of Hygiene, Heng Yang Medical College, Heng Yang, Hu Nan 421001

Abstract This study developed a semi-quantitative method of telomerase activity. The method was based on the combination of TRAP assay and scintillation count assay (³H-dCTP incorporation). It was used to quantify telomerase activity in CNE₂ cells and some tissue specimens. RNase-pretreated or heat-treated cells were used as controls. The results demonstrated that telomerase activity measured by this method was positive in CNE₂ cells, and it could be clearly detected with as few as 10 cells. There was a linear correlation between the radioactive count and the telomerase activity. The telomerase activity of some tissue specimens were accordant with reported data. Telomerase activity of RNase-pretreated or heat-treated cells was negative, their radioactive counts were almost the same as lysis buffer control. The variations within group and between groups were 11.68% and 20.99%, respectively. This method was free of PAGE and radioautography, and hence simple and fast. The results could be obtained with one day. It showed high sensitivity, good specificity and repeatability.

Key words Telomerase; Quantitative Analysis; Telomeric Repeat Amplification Protocol; Scintillation Count Assay

端粒酶是一种核糖核蛋白酶,由小分子 RNA 和蛋白质组成,它能以自身一段 RNA 为模板合成端粒序列,以延长端粒⁽¹⁾。人正常体细胞检测不到端粒酶活性,而在约 90% 恶性肿瘤及永生化细胞中可检测到强端粒酶活性,因此认为端粒酶是维持肿瘤细胞无限增殖与分裂所必需的,可作为恶性肿瘤的共同生

本课题由美国中华医学会(CMB)及国家自然科学基金(39670644)资助

* 现在衡阳医学院卫生学教研室工作(湖南衡阳 421001)

物学标记⁽²⁻⁴⁾,并可根据端粒酶活性的变化估计肿瘤的预后⁽⁵⁾。端粒酶活性的定量检测对开展相关的工作具有重要意义。目前,端粒酶活性检测多用 Kim⁽⁶⁾等建立的 TRAP 法(Telomeric Repeat Amplification Protocol),但该方法只能定性,使用 ⁻³²P dCTP 标记半定量法,依靠电泳和放射自显影及图像分析,且需较好的实验防护条件,在国内开展存在一定的困难,不适用于大量标本的分析。为了解决这一问题,我们将 TRAP 法结合液体闪烁计数法,半定量检测端粒酶活性。

材料与方法

1 材料 仪器

人鼻咽癌低分化鳞癌细胞(CNE₂)由中山医科大学肿瘤研究所提供。

冲洗缓冲液:10mmol/L HEPES-KOH pH7.5、1.5mmol/L MgCl₂、10mmol/L KCl、1mmol/L DTT。

细胞裂解液:10mmol/L Tris·HCl pH7.5、1mmol/L MgCl₂、1mmol/L EGTA、0.1mmol/L 苯甲磺酰氟、5mmol/L β-巯基乙醇、0.5% CHAPS 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate、10%甘油。

10×TRAP 反应缓冲液:2mmol/L Tris·HCl pH8.3、15mmol/L MgCl₂、630mmol/L KCl、10mmol/L EGTA、0.5% Tween-20、0.1% BSA。

引物 1 序列:5'-AATCCGTCGAGCA GACTT-3'

引物 2 序列:5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3'

沉淀性洗脱液:2.25mol/L 醋酸铵的 66%乙醇溶液

闪烁液:0.7% PPO 与 0.05% POPOP 的二甲苯溶液

其它主要试剂:³H-dCTP、dNTPs、TaqDNA 聚合酶、丙烯酰胺、N,N'-亚甲叉丙烯酰胺、TEMED 等均为进口试剂,PBR322DNA/Hae Marker 购自华美生物工程公司。

主要仪器:低温离心机、低温冰箱、PCR 仪、电泳仪、液体闪烁计数仪、抽滤器。

2 方法

2.1 蛋白提取和蛋白浓度测定 细胞蛋白和组织蛋白提取方法,分别按 Kim⁽⁶⁾等方法进行;蛋白质含量测定用考马斯亮蓝 G-250 显色法,并调节蛋白含量为 1μg/μl。抽提液贮存于 80℃,以备端粒酶活性分析。

2.2 端粒酶活性的 TRAP 分析 由于端粒酶含 RNA 组份,为了防止 RNase 酶污染,所有实验用品都需经过高压消毒,整过操作过程带上手套,蛋白提取和 PCR 反应在不同的工作台上操作,以避免交叉污染出现假阳性。TRAP 反应体系的建立基本按 Kim⁽⁶⁾等方法,但在反应体系中加入 2μCi ³H-dCTP,并对 PCR 的扩增条件进行修改⁽⁷⁾,由循环参数(94 / 30Sec、60 / 30Sec)×30 个循环变为(94 / 30Sec、50 / 30Sec、72 / 1.5min)×31 个循环,72 延伸 10min。PCR 扩增产物用 12.5%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(电压 125V、电泳约 4 小时),再用硝酸银染色法来观察结果。

2.3 端粒酶活性的 TRAP-液闪计数分析 将 PCR 扩增产物加到直径为 2.5cm 玻璃纤维滤纸的中央,80℃固定 2hr,然后将玻璃纤维滤纸置于负压抽滤器上,用 5ml 沉淀洗脱液行负压洗脱至压力为零,以除去游离的 ³H-dCTP,取下滤纸放入闪烁瓶中,加入 4ml 闪烁液进行液闪计数 cpm 值。端粒酶活性值以 1μg 抽提蛋白的 cpm 值表示;或者以相对于阳性细胞端粒酶活性的百分比来表示。

结果

1 方法的特异性及灵敏性 端粒酶经 TRAP 扩增后,其产物经电泳银染显影后为相隔 6bp 的梯状电泳图,相隔 6bp 的梯状电泳图有 4 条带以上即为阳性结果⁽⁷⁾。图 1 为 TRAP 法检测端粒酶的特异性及敏感性。M 为 PBR 322DNA/Hae Marker;L₁ 为 10⁵ 个 CNE₂ 细胞抽提液扩增的结果,显示有明显的相隔 6bp 的梯形带;L₂ 为用裂解液取代细胞抽提液的结果,未见梯形条带;L₃ 为约 10 个 CNE₂ 细胞抽提液扩增结果;L₄ 为 CNE₂ 抽提液经 85℃加热 10min;L₅ 为 CNE₂ 抽提液 20μl 加 2μg RNase A、37℃水浴 20min;L₄、L₅ 均未出现端粒酶扩增产物的梯形条带,L₆ 为正常大鼠睾丸组织抽提液扩增产物,显示有较强的端粒酶活性。图 2 为 TRAP-液体闪烁计数法检测端粒酶活性的灵敏度及特异度,显示 10⁵ 个 CNE₂ 细胞中端粒酶活性较高,10 个 CNE₂ 中仍有端粒酶活性;通过加热处理或 RNase A 处理后,cpm 值接近阴性对照组的 cpm 值,大鼠睾丸中有酶的活性。

2 重复性 同一样品 CNE₂ 抽提液隔天测定两次,每次做 5 支重复管,批内变异系数为 11.68%,两批间的偏差为 20.99%。

3 端粒酶活性标准曲线 由于目前没有纯的端粒酶

制剂,故在实验中以 CNE₂ 抽提液做阳性对照标准,按不同比例稀释调整到相应的蛋白浓度,进行 PCR 扩增测定其端粒酶活性值(cpm),以 CNE₂ 抽提液中蛋白含量(X)与测得的 cpm 值(Y)绘制标准曲线(图3)。图3示端粒酶活性水平与 cpm 值存在着良好的线性关系($Y = 33.87 + 592.12 X$ $r = 0.9640$ $P < 0.01$ 差异有高度显著性)。

4 大鼠正常组织和大肠癌中的端粒酶活性 应用该方法检测5例SD大鼠肠粘膜、肝组织、睾丸组织及二甲胂诱导的5例大鼠肠腺癌标本,结果见图4。可见大鼠肠癌组织中端粒酶活性高于正常组织的端粒酶($P < 0.05$)。

讨论

端粒酶能以自身携带的 RNA 模板,将重复序列 TTA GGG 加到染色体的末端,以延长端粒。各种端粒酶活性测定方法都是根据其能在体外延伸引物的这种特性为基础。目前,端粒酶活性检测大都采用1994年 Kim 等建立的 TRAP 法,该方法虽然灵敏度高,特异性高,但需经 PAGE、放射自显影等方法,其检测时间长,需要使用价格昂贵的图像分析系统,且其使用的同位素 ^{32}P 因半衰期短,及需要较好的实验防护条件,国内难于开展工作。

L₅ L₄ L₃ L₂ L₁ M L₆

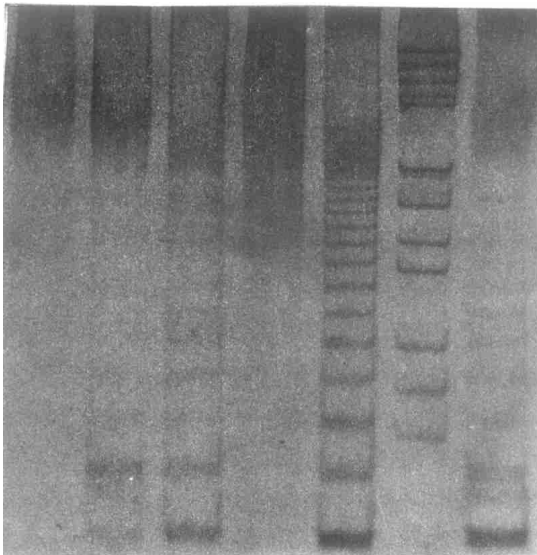


Figure 1 TRAP detect telomerase activity in CNE₂ cell
M: PBR 322 DNA/ Hae Marker,
L₁: positive control with extract of 10⁵ CNE₂ cells;
L₂: negative control with lysis buffer,
L₃: positive control with extract of 10 CNE₂ cells;

L₄: extracts of CNE₂ cell pretreated with heating;
L₅: extracts of CNE₂ cell pretreated with RNase;
L₆: testis tissue.

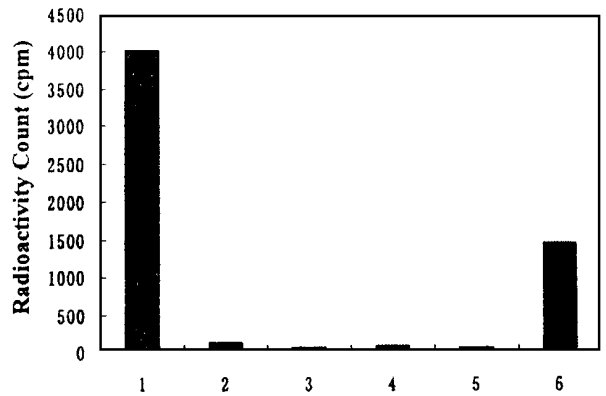


Figure 2 The Sensivity and Specificity of TRAP-Scintillation Count Assay

1. telomerase activity in 10⁵ CNE₂ cells
2. telomerase activity in 10 CNE₂ cells
3. negative control with lysis buffer
4. extracts of CNE₂ cell pretreated with heating
5. extracts of CNE₂ cell pretreated with RNase A
6. telomerase activity in the testis tissue

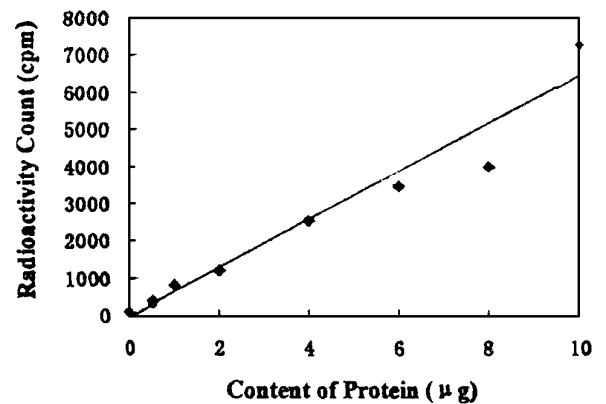


Figure 3 Relationship between radioactivity counts and telomerase activity

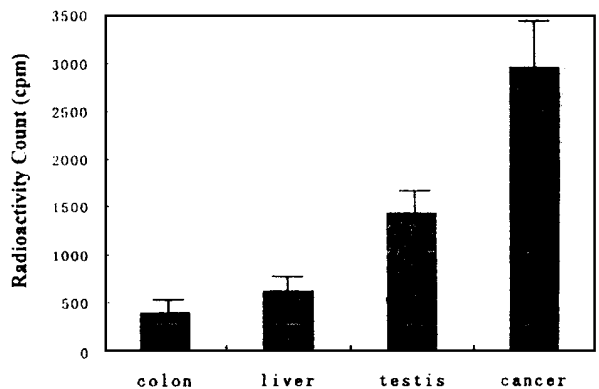


Figure 4 Telomerase activity of some tissue specimens

人肺癌组织 DNA - 蛋白质交联物的初步探讨

雷毅雄 易菲 陈家堃

广州医学院化学致癌研究所 广州 510182

摘要 为了探讨 DNA - 蛋白质交联物(DPC)与肺癌的联系,以人肺癌组织为研究对象,用敏感的¹²⁵I - 后标记新技术检测了不同细胞类型肺癌的 DPC 形成情况。结果显示,肺癌组织 DPC 的平均水平较癌旁对照肺组织高,提示较高的 DPC 水平可能与肺癌的发生或促进有关。研究结果未见肺鳞癌与肺腺癌之间的 DPC 水平有明显差别,亦未发现吸烟对肺癌组织 DPC 形成有明显的影响。

关键词 DNA - 蛋白质交联;肺癌;吸烟

A PRIMARY STUDY ON THE FORMATION OF DNA-PROTEIN CROSSLINKS IN HUMAN LUNG CANCER TISSUE

本研究将 Kim 的 TRAP 方法稍加修改,利用³H-dCTP 结合液体闪烁计数 cpm,进行端粒酶活性定量。其检测的原理是:在 PCR 扩增过程中,³H-dCTP 掺入到扩增产物中,然后用玻璃纤维滤纸负压抽滤分离游离³H-dCTP,液体闪烁计数扩增产物的 cpm 值。端粒酶活性水平越高,³H-dCTP 掺入量越多,cpm 值越高,根据 cpm 值计算出端粒酶活性水平。采用该方法检测 CNE₂ 细胞端粒酶活性,结果显示 10⁵ 个 CNE₂ 细胞中端粒酶活性 cpm 值很高,10 个细胞中仍可检测到端粒酶活性,通过加热处理或加 RNase A 处理灭活端粒酶后,其 cpm 值接近阴性对照,端粒酶活性水平与放射性活度具有良好的线性关系,说明该方法灵敏度高,特异性强,可用放射性活度 cpm 值半定量反应样品中端粒酶水平。

影响本方法测定结果的因素较多,如反应体系的组成、PCR 扩增前端粒酶延伸时间和温度、PCR 循环参数、产物固定在滤纸的时间和温度、沉淀性洗脱液类型及负压抽滤等均应特别注意,否则可能使实验结果产生偏性,方法的重复性研究结果表明:该半定量方法批内稳定性较好,但不同批次 PCR 扩增的结果有一定的偏差,为此,对不同时间不同批次检测结果应进行校正,以保证实验结果的前后一致性。在每一次 PCR 扩增中均应设立同一阳性细胞作参比,根据阳性细胞的 cpm 值高低,求得本次 PCR 扩增的效率,

然后再根据扩增效率对样本 cpm 值进行校正,校正方法如下:

$$\text{校正 cpm 值} = \text{实测 cpm 值} \times \text{校正系数}$$

$$\text{校正系数} = \frac{\text{各批次一定量的阳性细胞抽提液蛋白端粒酶活性平均值} - \text{空白对照平均值}(\text{cpm})}{\text{本批次等量的阳性细胞抽提液蛋白端粒酶活性值} - \text{空白对照值}(\text{cpm})}$$

总之:该方法具有灵敏性高、特异性强、重复性好,不需使用电泳及放射自显影等,简便快速、经济,可用于大批量样品端粒酶活性的定量检测,但不同时间不同批次的检测均应设立同一阳性标准对照,并严格控制实验条件。

参考文献

- Greider CW. Mammalian telomere dynamics: healing, fragmentation, shortening and stabilization. *Curr Opin Genet Dev*, 1994;4:203
- Shay JW, Chair PH, Wright WE, et al. Telomere, telomerase and tumors. *Amer Soc Clin Oncol*, 1997;9:49
- Shaw JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*, 1997;33(5):787
- Counter CM, Hirte HW, Bacchetti S, et al. Telomerase activity in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994;91:2900
- Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, et al. Telomerase activity: A prognostic indicator ordinary meningiomas. *Hum Pathol*, 1997;28:416
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowsa KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, 1994;266:2011
- 陈雯,张桥,万德森,等. 人胃癌结直肠癌组织中的端粒酶活性. *中华肿瘤杂志*, 1998;20(4):261