



## 端粒重复序列扩增法结合微孔板杂交法定量检测端粒酶活性

在大部分正常体细胞中没有端粒酶活性，而肿瘤细胞中端粒酶却特异性表达[1]。目前端粒酶活性检测方法以端粒重复序列扩增测定法(Telomeric repeat amplification protocol, TRAP)为主，该方法需繁琐的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳和放射自显影或银染，技术要求高，不适合大量标本的检测和临床应用，也难以定量反映端粒酶活性状态。为此我们将TRAP法与微孔板杂交相结合建立了非放射性定量检测端粒酶活性方法，取得了比较满意的效果。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 标本来源

3例正常肝组织及4例肝癌患者治疗前后的肝癌组织、瘤旁组织、肝癌凋亡组织(经病理切片证实)由南方医院肝胆外科提供。

#### 1.2 主要试剂

端粒酶活性恒表达人肾细胞(293细胞)抽提物购自宝灵曼公司。Biotin标记TS引物:5'-biotin-AATCCGTCGAGCAGAGTT, CX引物:5'-CCCTTA CCCTTACCCTTACCCTAA, 由上海生工公司合成。EGTA、CHAPS、Avidin、DIG-11-dUTP、Anti-DIG酶标单抗购于宝灵曼公司, TMB购于Sigma, pGEM-T载体、微孔板购于Promega。

#### 1.3 TRAP法

参照Kim法[1], 略加改进。直接将TS、CX引物加入反应体系进行延伸/PCR反应。步骤: ①裂解液和组织冰浴中匀浆, 冰浴30 min后, 12 000 r/min离心20 min, 取上清, 用紫外分光光度法测定蛋白量; ②端粒酶介导的端粒重复序列延伸和PCR: 取3  $\mu$ g蛋白加入30  $\mu$ l反应液(含0.05  $\mu$ g TS引物, 0.05  $\mu$ g CX引物, 2 U Taq酶)中, 25  $^{\circ}$ C水浴30 min后, 92  $^{\circ}$ C预变性5 min, 然后92  $^{\circ}$ C 45 s、50  $^{\circ}$ C 45 s、70  $^{\circ}$ C 60 s, 30个循环, 70  $^{\circ}$ C延伸5 min; ③产物进行微孔板杂交。

#### 1.4 杂交探针制备

293细胞抽提物的TRAP产物用10% PAGE电泳, 回收200~400 bp的片段, 与pGEM-T载体连接并转化TG1菌株。以TRAP法和12% PAGE电泳和银染鉴定。以重组质粒为模板制备探针, 具体方法如下: 100  $\mu$ l 反应体积(dCTP、dTTP、dATP各0.5 mmol/L, 1 nmol/L DIG-11-dUTP, 4  $\mu$ g CX引物, 4 U Taq酶, 2  $\mu$ g重组质粒), 92  $^{\circ}$ C 45 s、50  $^{\circ}$ C 45 s、70  $^{\circ}$ C 45 s, 60个循环, 异丙醇沉淀去除游离核苷酸。

#### 1.5 微孔板包被

碳酸缓冲液(pH 9.6)稀释Avidin至10  $\mu$ g/ml, 按100  $\mu$ l/孔加入微孔板中, 4  $^{\circ}$ C 16 h。甩去液体后加入100  $\mu$ l/孔的20%小牛血清-碳酸缓冲液(含鲑精DNA 10  $\mu$ g/ml), 4  $^{\circ}$ C封闭16 h。TS引物和TRAP产物通过Avidin固定于微孔板, 质粒DNA参照文献[2]包被。

#### 1.6 微孔板杂交

取2  $\mu\text{l}$ 扩增产物加入120  $\mu\text{l}$ 杂交液(50%甲酰胺, 5 $\times$ SSC, 0.1% Tween-20, 5 mmol/L EDTA, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肝素), 92  $^{\circ}\text{C}$ 热变性10 min, 37  $^{\circ}\text{C}$ 复性10 min。将100  $\mu\text{l}$ 杂交液加入微孔板, 37  $^{\circ}\text{C}$ 放置2 h。用洗涤液(0.1% Tween-20 生理盐水)洗5次(洗涤温度为30~37  $^{\circ}\text{C}$ )。加抗DIG酶标单抗100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 放置30 min。同前洗涤, 加显色剂100  $\mu\text{l}/\text{孔}$ , 室温蔽光显色20 min后450 nm测量吸光度。

## 2 结果

### 2.1 探针的特异性

人端粒重复序列TTAGGG以TRAP法扩增产生6个核苷酸梯状条带, TS链延伸不需dCTP, CX链不需dGTP, 故制备针对TS链的探针不需dGTP。重组质粒中插入了TRAP法扩增片段, 其TS和CX引物扩增产物PAGE电泳-银染图谱与293细胞TRAP产物相同。重组质粒、pGEM质粒、293细胞TRAP产物、293细胞RNase处理后TRAP产物、TS引物包被于微孔板后与DIG标记探针杂交和TMB显色, 重组质粒、293细胞TRAP产物包被孔呈蓝色, 其他孔无色。

### 2.2 定量检测端粒酶活性

将293细胞抽提物系列稀释进行TRAP反应, 产物同时进行PAGE-银染和微孔板杂交, 结果显示端粒酶活性与所测吸光度值如PAGE-银染呈线性关系, 可进行定量分析。用TRAP-微孔板杂交的方法, 对3例正常肝组织和4例肝癌患者治疗前后标本进行端粒酶活性定量检测, 显示肿瘤组织具有较高端粒酶活性, 而正常肝组织和瘤旁组织无此酶活性, 凋亡组织端粒酶活性显著降低。

## 3 讨论

端粒酶RNA与端粒酶活性并不完全相关, 因此端粒酶RNA可能不是端粒酶活性较好的指标, 而TRAP测定只有在放射性标记、凝胶电泳后放射自显影时才能达到足够的灵敏度。我们建立的方法在同一体系中完成端粒酶介导的引物延伸和PCR扩增, 将扩增产物通过Avidin固定于微孔板后经DIG探针杂交检测。RNase处理破坏RNA或加热使蛋白质变性都能使端粒酶失活, 由此可鉴定本法的特异性[4]。微孔板杂交灵敏度和特异性极高, 敏感性是琼脂糖电泳10倍以上, 与PCR32P探针的Southern杂交法相当[3]。该法能达到与放射TRAP测定法相同的敏感性, 而避免了放射性标记和耗时的凝胶电泳及放射自显影, 有利于大量样本检测, 便于应用并可进一步进行定量或相对定量。该方法可以反映不同组织中的端粒酶活性, 特别在PAGE-银染不清晰的情况下可以比较准确地反映组织的端粒酶活性状态。

肿瘤组织具有比较高的端粒酶活性, 而正常组织和瘤旁组织无此酶活性[1][4], 可将其作为恶性肿瘤的一项指标。作为一种专门修补染色体末端/端粒损伤的蛋白质, 端粒酶开始显示出作为一种新型生化标记的前景, 不仅可作为恶性肿瘤的指标, 还可能用于评估化疗反应和疗效。文献报道永生化细胞和肿瘤细胞被诱导分化或凋亡之前端粒酶活性丧失或显著降低, 提示端粒酶活性可作为治疗癌症疗效的一个指标[5][6]。我们对4位肝癌患者治疗前后端粒酶活性进行了相对定量检测, 显示化疗后凋亡组织端粒酶活性显著降低, 这可能是治疗诱导肿瘤细胞凋亡, 端粒酶活性先于凋亡显著降低, 至出现明显凋亡时凋亡细胞比率已远高于增殖细胞, 使端粒酶活性不表达或显著降低。但如果增殖细胞较多, 仍可能出现低水平的端粒酶活性。在未有明显分化或凋亡形态发生前端粒酶活性可能已显著降低, 因此有些肿瘤组织不能检测出端粒酶活性或活性很低, 这一点在端粒酶活性检测中值得注意。至于治疗过程中端粒酶活性的变化和治疗后的端粒酶情况, 有待进一步研究。

### 参考文献:

[1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266 (5193):2011-5.

Hataya T, Inoue AK, Shikata E. A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection[J]. J Virol Methods, 1994, 46 (2): 223-36.

[3] Keller GH, Huang DP, Shih WK, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase reaction amplification and microtiter sandwich hybridization[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(6):1441-6.

[4] Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) [J]. Methods Cell Sci, 1995, 17(1):1-6.

[5] Fu W, Begkey JG, Killen MW, et al. Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cell[J]. J Biol Chem, 1999, 274(11): 7264-71.

[6] Bestcotive LJ, Brown CB, Miura Y, et al. Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines[J]. Cancer Res, 1996, 56 (16):3796-802.

#### 参考文献:

[1] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266 (5193):2011-5.

Hataya T, Inoue AK, Shikata E. A PCR-microplate hybridization method for plant virus detection[J]. J Virol Methods, 1994, 46 (2): 223-36.

[3] Keller GH, Huang DP, Shih WK, et al. Detection of hepatitis B virus DNA in serum by polymerase reaction amplification and microtiter sandwich hybridization[J]. J Clin Microbiol, 1990, 28(6):1441-6.

[4] Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, et al. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) [J]. Methods Cell Sci, 1995, 17(1):1-6.

[5] Fu W, Begkey JG, Killen MW, et al. Anti-apoptotic role of telomerase in pheochromocytoma cell[J]. J Biol Chem, 1999, 274(11): 7264-71.

[6] Bestcotive LJ, Brown CB, Miura Y, et al. Selective inhibition of telomerase activity during terminal differentiation of immortal cell lines[J]. Cancer Res, 1996, 56 (16):3796-802.