

文章编号:1004 - 616X(2001)01 - 0001 - 04

论著 ·

非同位素标记法检测人染色体端粒长度

许丽艳¹, 李恩民², 沈忠英^{1*}, 蔡唯佳¹, 沈 健¹

(1. 汕头大学医学院病理学教研室, 广东 汕头 515031; 2. 汕头大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 广东 汕头 515031)

摘要:目的:建立一种非同位素标记测定端粒长度的方法。方法:以地高辛标记寡核苷酸(CCCTAA)₃为探针,对基因组DNA进行Southern杂交,NBT/BCIP显色后与DNA标准分子量比较,图象分析系统测定端粒长度。结果:通过严格控制探针的工作浓度(1:1 280稀释)、DNA上样量(>20 μg)、杂交温度(47 ± 2)等主要影响因素,获得了比较好的杂交条带。结论:建立了一种稳定、可靠、低背景的地高辛标记检测端粒长度的方法。

关键词:端粒;端粒长度;非同位素标记中图分类号:Q523⁺.6;Q7-33 文献标识码:A

A NONRADIO - LABELLED METHOD ASSAYS TO MEASURE THE TELOMERE LENGTH OF HUMAN CHROMOSOME

XU Li - yan , LI En - min , SHEN Zhong - ying , *et al**(Pathological Department , Medical College of Shantou University , Shantou 515031 , China)*

Abstract : Purpose : To establish a nonradio - labelled method for measuring telomere length (mean length of telomere restriction fragment , TRF) of human chromosome. **Methods :** TRF was examined by Southern blotting by using labelled oligonucleotide (CCCTAA)₃ probe with digoxin. After hybridization , the blot was stained with NBT/BCIP , analysed by using a densitometric imaging system and mean length of TRF calculated , comparing with standard kilobase sized marker. **Results :** The hybridization bands were showed under stringently controlling the probe working concentration (1 : 1 280 dilution) , loaded DNA sample (> 20 μg) and hybridization temperature (47 ± 2) **Conclusion :** A digoxin - labelled , stable , reliable and low background method for determining the telomere length of human chromosome was established.

Key words : telomere ; telomere restriction fragment ; nonradio - label

端粒是真核生物染色体末端的一种特殊结构,由一连串富含G的DNA重复序列和相关蛋白组成。其功能主要是维护染色体的稳定,防止染色体发生丢失、重排、末端融合和被酶消化降解等。由于染色体线状DNA末端复制缺口问题,在真核细胞分裂时,端粒序列将变短。当端粒短至越过某一临界长度时将失去其维护染色体稳定的作用,并最终导致细胞的衰老和死亡。但在许多永生化和癌变细胞中,由于端

粒酶的表达活化,端粒将被稳定维持在一定长度范围内,使细胞能够持续分裂增殖下去。目前,检测端粒长度(mean length of telomere restriction fragment, TRF)的变化及端粒酶的活性已成为人们研究细胞癌变、衰老和死亡的重要指标之一^{1,2}。人的端粒重复序列是TTAGGG,以CCCTAA或TTAGGG为探针,通过Southern杂交就可以测出端粒长度。从目前的国内外

收稿日期:2000 - 04 - 03;修订日期:2000 - 05 - 29

基金项目:国家自然科学基金重点项目(39830380)

作者简介:许丽艳(1964 -)女,内蒙古奈曼旗人,副研究员,生理学硕士,主要从事食管癌变相关基因克隆方面的研究。

资料来看,大多数都采用³²P 标记进行检测^{3~5}。虽然同位素标记具有灵敏、准确等优点,但却受时间、实验室环境等制约。随着非同位素标记在分子生物学领域的广泛应用,我们尝试把非同位素标记用于检测端粒长度,取得了较好的结果。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 样品

1.1.1 细胞 永生化食管上皮细胞系 SHEE 和食管癌细胞系 SHEEC 为本室自建的两株细胞系,在含 10%~15% 小牛血清的 199 培养基中传代培养^{6~8}。EC109 食管癌细胞系(中国医学科学院肿瘤医院吴昊院士惠赠)在含 10% 小牛血清的 MEM 培养基传代培养;B95.8 细胞系(EB 病毒感染的人 B 淋巴细胞,中山医科大学肿瘤医院曾益新教授惠赠)在含 5% 小牛血清的 1640 培养基中传代培养。收获不同代数的细胞, PBS 洗 3 次后,计数,按 $10^6 \sim 10^8$ 个细胞分装于离心管中,去尽残液,冻存于 -70。

1.1.2 组织 取外科手术切除的食管癌组织和正常食管粘膜上皮组织块, PBS 洗去残血后,冻存于 -70。

1.2 端粒长度检测

1.2.1 基因组 DNA 的提取 在 $10^6 \sim 10^8$ 个细胞或适量冻存的组织标本中,加入 400 μ l 抽提缓冲液(10 mmol/L Tris - Cl pH8.0, 0.1 mol/L EDTA pH8.0, 0.5% SDS) 涡流振荡充分混匀,加终浓度为 200 μ g/ml 的蛋白酶 K, 50 水浴消化 3 h 或过夜,用 Tris 饱和酚(pH 8.0)反复抽提 2 次,酚:氯仿和氯仿抽提各 1 次,加 1/10 体积 3 mol/L NaAc (pH5.2) 和 2 倍体积无水乙醇沉淀 DNA,用吸头挑出团块状 DNA 沉淀物,70% 乙醇漂洗 1 次后,置一新的离心管中,室温干燥 10 min,加 50 μ l 含 RNase A (浓度为 20 μ g/ml) 的 TE (10 mmol/L Tris - Cl pH8.0, 1 mmol/L EDTA pH8.0) 彻底溶解沉淀,在 260 nm 和 280 nm 处测定光吸收值,计算 DNA 含量和纯度。

1.2.2 探针标记 采用地高辛标记试剂盒(BOEHRINGER MANNHEIM 公司),按试剂盒说明书进行操作,略加改动。取 6 μ l (1 μ g/ μ l) 的寡核苷酸 5' - CCCTAACCCCTAACCCCTAA - 3' (上海生工公司合成)于一无菌 0.5 ml 离心管中,冰浴下依次加入 2 μ l hexanucleotide mix, 2 μ l DIG DNA labeling mix, 2 μ l Klenow buffer, 7 μ l 无菌水及 1 μ l Klenow

(MBI 公司),充分混匀,稍离心,37 水浴孵育过夜,次日加 2 μ l 0.2 mol/L EDTA (pH8.0) 终止反应,补加 2.5 μ l 4 mol/L LiCl 和 75 μ l 无水乙醇,混匀,-20 放置 2 h 以沉淀标记的 DNA,离心,70% 冷乙醇漂洗沉淀,室温下干燥,溶于 50 μ l TE (10 mmol/L Tris - Cl, pH8.0; 1 mmol/L EDTA, pH8.0) 中。

1.2.3 探针最适工作浓度的确定 将试剂盒中已标记的标准 DNA (pBR328, 5 μ g/ml) 和新标记的 DNA 依次进行 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160、1:320、1:640、1:1280、1:2560、1:5120 倍稀释,各稀释度均取 1 μ l 点至尼龙膜上(HybondTMN⁺ nylon membrane, Amersham Life Science), 80 烤膜 2 h,用 solution I (100 mmol/L tris - Cl pH7.5, 150 mmol/L NaCl) 从下至上浸湿此膜,在 solution (100 mmol/L tris - Cl pH7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.5% blocking reagent) 中 37 封闭 30 min,在抗地高辛抗体反应液(用 solution 进行 5000 倍稀释)中 37 孵育 30 min,在 solution (100 mmol/L tris - Cl pH9.5, 100 mmol/L NaCl, 50 mmol/L MgCl₂) 中平衡 5 min,转移膜至显色液(4.955 μ l solution, 22.5 μ l NBT, 17.5 μ l BCIP) 中避光显色,TE (10 mmol/L tris - Cl pH8.0, 1.0 mmol/L EDTA pH8.0) 终止反应。

1.2.4 Southern 杂交 各检测样品分别取 20 μ g 基因组 DNA, Hinf I 酶切过夜,0.7% 琼脂糖,40 V 电泳过夜,然后将凝胶依次进行下列处理:0.25 mol/L HCl 脱嘌呤 15 min,水洗 5 min,1.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L NaOH 中变性 30 min,水洗 5 min,1.5 mol/L NaCl、0.5 mol/L tris - Cl (pH7.2)、1.0 mmol/L EDTA (pH8.0) 中和 2 次,每次 15 min,毛细管法转膜(HybondTMN⁺ nylon membrane, Amersham Life Science),然后将膜在 2 \times SSC 中漂洗,80 烤干 2 h,在 68 下预杂交(5 \times SSC、0.5% blocking reagent、0.1% SLS、0.02% SDS) 6 h,47 下杂交(杂交液含适量的探针,不含 blocking reagent) 过夜,回收杂交液,漂洗杂交膜(2 \times SSC、0.1 \times SSC、0.1% SDS 中 50 下漂洗 2 次,每次 5 min)。最后按上述步骤依次进行免疫反应,NBT/BCIP 显色,TE 终止反应,照相,并进行图象分析,计算端粒平均长度。

2 结果与讨论

2.1 探针最适工作浓度 采用此方法标记寡核苷酸探针获得了较高的效价,在 1:5120 稀释度下仍有明

显的显色(图 1)。如此高的标记率是提高模板量的结果(试剂盒要求 3 μg,我们提高为 6 μg)。在进行下面的 Southern 杂交时,所采用的探针工作浓度为 1:1 280 稀释。这是因为考虑到寡核苷酸作探针需使用比一般情况下稍高一些的探针浓度。

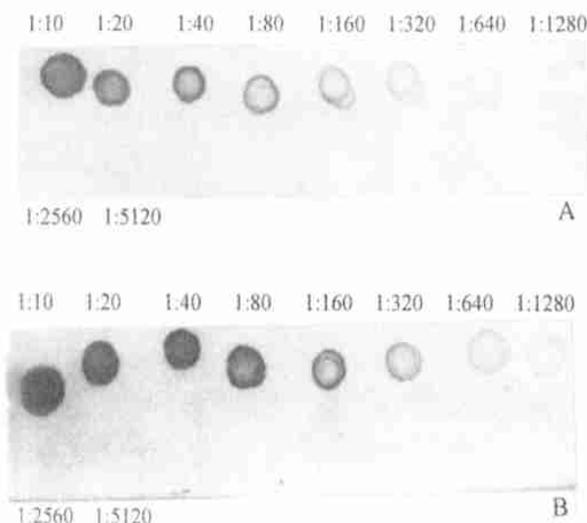


图 1. 探针工作浓度测定

A. 标准地高辛标记 DNA(pBR328, 5 μg/ml); B. 标记 DNA

Figure 1. Measurement of probe working concentration

A. standard digoxin - labelled DNA(pBR328, 5 μg/ml);

B. labelled DNA.

2.2 DNA 样品上样量 一般情况下,进行 Southern 杂交时,凝胶上每一加样孔应加 10 μg 基因组 DNA 样品,但用寡核苷酸作探针时应适当增大 DNA 样品上样量,至少为 20 μg。从我们的实验结果看(图 2),由于 SHEE18 代和 SHEE77 代其 DNA 上样量较少,约为 10 μg,所以杂交信号明显变弱,而其他各组 DNA 上样量均达到了 20 μg 以上,因此杂交信号非常明显。

2.3 杂交条件的选择 杂交条件是影响最后实验结果的主要因素。但杂交条件包括许多方面,其中以凝胶处理、杂交液成份和杂交温度等为重要影响因素。

凝胶处理:电泳后凝胶必须经脱嘌呤处理,否则将影响毛细管转移效率。因为一般情况下端粒均较长,约为 20 kb。所以进行 Southern 杂交时,为了提高转移效率,需对凝胶中的 DNA 先用弱酸(引起部分脱嘌呤反应)而后用强碱(水解脱嘌呤部位的磷酸二酯键主链)处理,这样产生的 DNA 片段可高效率地

从凝胶上迅速转移。然而需特别注意的是防止脱嘌呤反应过甚,否则 DNA 断裂成过小的片段而不能有效地结合到固相支持物上,以 10 min ~ 15 min 为宜。

杂交液成份:由于在使用寡核苷酸探针时,高浓度的蛋白质会干扰探针与其结合至尼龙膜上的靶核酸的退火,故将杂交液中的封闭组分去掉,否则会造成杂交信号的熄灭。杂交温度的确定:首先应根据经验公式计算杂交体的解链温度 T_m 值。对短于 18 个核苷酸的寡核苷酸,其 T_m 值是将杂交体中 A 残基数与 T 残基数的和乘以 2,再将 G 残基数与 C 残基数的和乘以 4,两积相加便得出杂交体的 T_m 值。本实验所用探针是 CCCTAACCTAACCTAA,所以其 T_m 值是 $9 \times 2 + 9 \times 4 = 54$ 。而杂交温度应比 T_m 值低 5 ~ 10,所以本实验的杂交温度选为 47 ± 2 。这与用同位素进行标记检测端粒长度所用杂交温度相类似³。

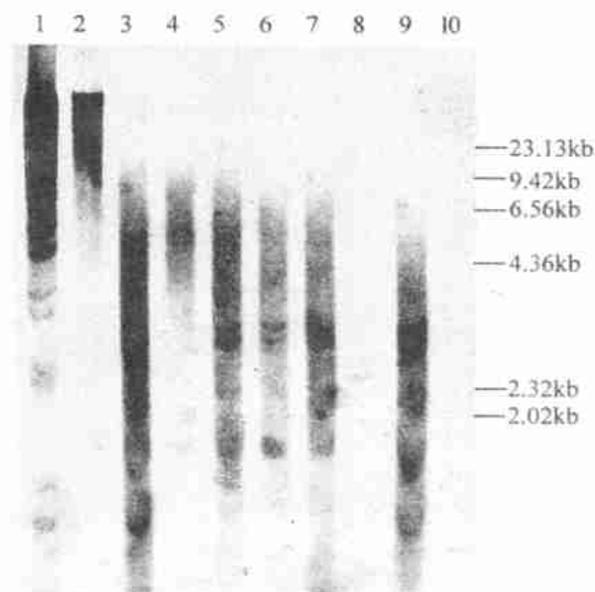


图 2. 应用地高辛标记(CCCTAA)₃ 探针对细胞系和组织的端粒长度进行 Southern 印迹分析。

1. B95.8 细胞系; 2. 正常食管上皮组织; 3. 食管癌组织; 4. EC109 细胞系; 5. SHEEC 细胞系, 第 55 代; 6. SHEEC 细胞系, 第 54 代; 7. SHEE 细胞系, 第 81 代; 8. SHEE 细胞系, 第 77 代; 9. SHEE 细胞系, 第 19 代; 10. SHEE 细胞系, 第 18 代。

Figure 2. Southern blot analysis of telomere length in the cell lines and tissues by using digoxin - labelled(CCCTAA)₃ probe. 1. B95.8 cell line; 2. normal esophageal epithelial tissue; 3. esophageal cancer tissue; 4. EC109 cell line; 5. SHEEC cell line, 55th passage; 6. SHEEC cell line, 54th passage; 7. SHEE cell line, 81st passage; 8. SHEE cell line, 77th passage; 9. SHEE cell line, 19th passage; 10. SHEE cell line, 18th passage.

文章编号:1004 - 616X(2001)01 - 0004 - 03

论著 ·

彗星试验检测间接诱变剂对小鼠睾丸细胞的 DNA 损伤

张遵真¹, 衡正昌¹, 廖 艳², 赵 蓉²

(1. 华西医科大学环境卫生教研室, 四川 成都 610041; 2. 华西医科大学预防医学 95 级毕业生)

收稿日期:1999 - 06 - 25; 修订日期:2000 - 10 - 15

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670625)

作者简介:张遵真(1962 -), 女(苗族), 贵州道真人, 副教授, 硕士, 研究环境化学物对人体健康的影响。

2.4 漂洗时间 由于寡核苷酸探针与其靶序列之间所形成的杂交体极易解体, 所以杂交后必须马上进行漂洗, 而且漂洗时间要比长核苷酸(大于 200 bp)探针短, 以防探针从靶序列上解离。如在 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDS 中漂洗由 10 min 降为 5 min。

总之, 通过对上述几方面影响实验结果因素严格控制, 本研究建立了一种稳定可靠、低背景和重复性好的非同位素标记检测端粒长度的方法, 并用此方法检测了几种细胞系和组织的端粒长度(图 2, 3)。

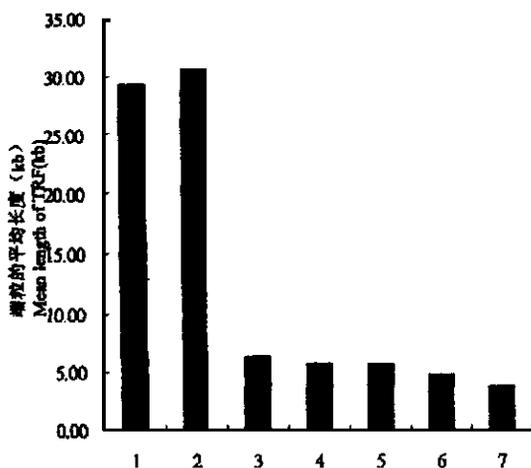


图 3. 不同细胞系和组织的平均端粒长度直方图。

1. B95.8 细胞系; 2. 正常食管上皮组织; 3. 食管癌组织; 4. EC109 细胞系; 5. SHEEC 细胞系; 6. SHEE 细胞系 81 代; 7. SHEE 细胞系 19 代。

Figure 3. Telomere length in different cell lines and tissues. The data were obtained from Figure 2. 1. B95.8; 2. normal esophageal epithelial tissue; 3. esophageal cancer tissue; 4. EC109; 5. SHEEC; 6. SHEE 81st passage; 7. SHEE 19th passage.

从中可见, 食管癌组织或食管癌细胞系和永生化食管上皮细胞系的端粒长度均明显短于正常食管粘膜上皮组织。这提示细胞在向永生化或癌变转化时, 一开始细胞可能并没有端粒酶的表达, 所以端粒变短, 然而端粒酶一旦被表达活化, 就会使变短的端粒维持在一定长度, 细胞就可持续分裂增殖下去。

参考文献:

- 1 Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, *et al.* A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n present at the telomere of human chromosomes J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85 (18): 6 622 ~ 6 626.
- 2 Greider CW. Telomere length regulation J. *Ann Rev Biochem*, 1996, 65: 337 ~ 365.
- 3 Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, *et al.* Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing J. *Nature*, 1990. 346(6287): 866 ~ 868.
- 4 Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, *et al.* Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(21): 10 114 ~ 10 118.
- 5 Sprung CN, Sabatier L, Murnane JP. Telomere dynamics in a human cancer cell line J. *Exp Cell Res* 1999, 247(1): 29 ~ 37.
- 6 沈忠英, 蔡唯佳, 沈 健, 等. 人乳头状瘤病毒 18E6E7 和 TPA 协同诱导人胚食管上皮细胞恶性转化的研究 J. *病毒学报*, 1999, 15(1): 1 ~ 6.
- 7 沈忠英, 岑 山, 蔡唯佳, 等. 人乳头状瘤病毒 18 型 E6E7 基因诱导人胚食管上皮永生化 J. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(2): 121 ~ 124.
- 8 沈忠英, 沈 健, 蔡唯佳, 等. 人乳头状瘤病毒 18 型 E6E7 基因诱导胎儿食管永生化上皮的生物学特征 J. *中华实验和临床病毒学杂志*, 1999, 13(3): 209 ~ 212.