

## 参 考 文 献

- [1] Wu Min et al., 1985, In *Familial Cancer*, ed by Muller, Weber, pp. 52—54. Ist. Int. Res. Conf. Basal.
- [2] 李光恒等, 1980, 肿瘤防治研究, 2:1—6。
- [3] 王秀琴等, 1980, 中国科学, 1:78—81。
- [4] 高燕宁等, 1986, 中国医学科学院学报, 8:171—174。
- [5] Hillman, E. A. et al., 1980, In *Methods in Cell Biology*, Vol. 21 B, ed. by Harris, C. C. et al., pp. 331—348. Academic Press, INC.
- [6] 鲍乐尧等, 1984, 中华病理学杂志, 13(1): 7—10。
- [7] 裴许芳等, 1985, 中华病理学杂志, 14(3): 169—171。
- [8] Lechner, J. F. et al., 1981, *Cancer Research.*, 41: 2294—2304.
- [9] Easty, G. C., 1970, In *Methods in Cancer Research*, ed. by Harris Busch, Vol. V. pp. 1—43. Academic Press, New York, London.

## 用简化的微量方法分析 EGF 受体基因在培养细胞中的表达

彭素芬 江万里 徐永华

(中国科学院上海细胞生物学研究所)

利用放射性同位素标记的基因片段或 cDNA 探针进行核酸分子杂交是分析基因表达的有效手段。将细胞 DNA 或 RNA 样品经琼脂糖凝胶电泳分离后转移到硝酸纤维素膜上, 然后与放射性探针杂交, 即 Southern 印迹法和 Northern 印迹法<sup>[1,2]</sup>已被普遍采用, 为了简化操作, 也常使用 (Dot Blot) 点印迹法<sup>[3]</sup>。利用上述技术进行基因或基因产物分析时, 首先需要从细胞分离、纯化 RNA 和 DNA<sup>[4,5]</sup>。如果需要同时分析多种细胞或细胞在不同条件下的基因表达, 那么, 大量的细胞培养和 RNA、DNA 分离纯化步骤将给工作带来不便。

我们为了分析人表皮生长因子受体 (EGFR) 基因在几株人体肿瘤细胞中的表达, 采用了一个简化的分离细胞 RNA 和 DNA 的微量方法, 结合点印迹杂交, 取得了满意的结果。该方法中每组细胞样品只需培养一个小北京瓶的细胞 ( $0.5-1 \times 10^6$  个细胞), 简化的 RNA、DNA 分离步骤都在 eppendorf 管中进行, 避免了超速离心或多次高速离心所制备样品的纯度达到实验要求, 在杂交实验中获得满意的杂交信号。

## 材 料 和 方 法

细胞培养:

人肝癌细胞株 7404、人鼻咽癌细胞株 CNE<sub>1</sub> 和人表皮癌细胞株 A<sub>431</sub> 细胞, 37°C 常规培养于 RPMI-1640 培养基-10% 小牛血清。用作样品制备时, 接种  $1-1.5 \times 10^5$  个细胞于小北京瓶 ( $4 \times 3 \text{ cm}^2$ ), 培养 3—5 天细胞长到  $0.5-1 \times 10^6$  个/瓶时, 分离 RNA 或 DNA。

正常人胚肺成纤维细胞 (HLE) 冷冻保存于液氮中, 用作样品制备时, 复苏细胞, 传一代后, 如上接种。

分析高温培养下 EGFR 基因表达时, 如上培养鼻咽癌细胞 (CNE<sub>1</sub>), 待细胞长到  $0.5-1 \times 10^6$  个细胞/瓶时, 浸入 41°C 水浴, 分别培养 0、1、2、6 小时, 分离 RNA, 以分析基因表达的改变。

简化的微量 RNA 抽提:

每个小北京瓶的细胞 ( $0.5-1 \times 10^6$  个细胞) 倒去培养液, 用生理盐水洗三次, 吸尽盐水后立即加入盐酸胍溶液 1 ml (7.6 mol/L 盐酸胍的 0.1 mol/L KAC pH 5.2 缓冲液), 粘稠的细胞裂解液转入 eppendorf 管中, 用带 21 号注射针的 2 ml 注射器吸取细胞裂解液后推出, 重复 10 次, 以切断 DNA, 然后加 0.5 ml 95% 乙

姚曾序教授和朱德厚同志对本工作的支持和帮助、钟逸新同志为本工作摄影, 特此致谢。

醇,混合后置 $-30^{\circ}\text{C}$ 冰箱过夜,在 eppendorf 离心机上 10 000 rpm 离心 15 分钟,70%乙醇、95%乙醇洗后,干燥,溶于 50—100  $\mu\text{l}$  蒸馏水中。

#### 简化的微量 DNA 抽提:

每个小北京瓶细胞( $5 \times 10^5$  个细胞),生理盐水洗后,加 0.8 ml 蛋白酶 K 溶液(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  蛋白酶 k 0.1 mol/L Tris·HCl pH 7.9, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA, 0.5% SDS),细胞裂解后的粘稠液转移到一个 eppendorf 管中,  $37^{\circ}\text{C}$  保温 2 小时,加 0.5 ml 酚-氯仿-异戊醇(25:24:1, V/V), 摇荡 10 分钟,在 eppendorf 离心机上 10 000 rpm 离心 15 分钟,吸出水相,转移到另一 eppendorf 管中加 4  $\mu\text{l}$  RNase (10 mg/ml)使最终浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  1 小时,加 1/2 体积氯仿-异戊醇(24:1)V/V, 摇 10 分钟, 10 000 rpm 离心 15 分钟,水相加乙醚抽提一次后,置  $70^{\circ}\text{C}$  水浴 15 分钟,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存。

#### RNA 和 DNA 常规分离:

培养  $5 \times 10^7$  个细胞,用异硫氰酸胍-氯化铯超速离心法,分离细胞总 RNA<sup>[4]</sup>。培养  $1 \times 10^7$  细胞,用 proteinase k-RNase A 消化法分离高分子量 DNA<sup>[5]</sup>。经苯酚-氯仿-异戊醇抽提后,对 TE(10 mmol/L Tris·HCl-1 mmol/L EDTA, pH 7.5)透析 36 小时,中间换透析液 4 次,或乙醇沉淀,洗涤后溶于 TE 缓冲液。

#### 探针制备和标记:

从 EGF 受体 cDNA 克隆 pE<sub>7</sub><sup>[6]</sup> 载体菌分离质粒 DNA 用限制性内切酶 ClaI 完全消化, 0.8% agarose 凝胶电泳分离制备 2.4 kb EGF 受体 cDNA 片段,用切口翻译法,以 [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP(比度 3000 ci/mmol/L) 标记制备 EGF 受体 cDNA 探针。

#### 点印迹杂交:

微量简化法分离的 RNA 溶液,加甲醛和  $20 \times \text{ssc}$ , 到最终浓度为 6% 甲醛- $10 \times \text{ssc}$ , 样品于  $60^{\circ}\text{C}$  加热 5 分钟,冷却后用点吸附器(Glison)将 RNA 溶液吸印在硝酸纤维素膜(SDSBA 85)上。微量简化制备的 DNA, 加等体积 0.2 mol/L NaOH 变性 10 分钟后,加 2 倍体积 1 mol/L Tris·HCl pH 7, 再用  $10 \times \text{ssc}$  稀释,作点吸印。吸附有 RNA、DNA 样品的膜,  $80^{\circ}\text{C}$  烘干 2 小时。预杂交溶液含 50% 甲酰胺,  $6 \times \text{ssc}$ ,  $5 \times \text{Denhardt}$  溶液,  $2 \times \text{SSPE}$  (3.6 mol/L NaCl, 200 mmol/L  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (pH 7.4), 20 mmol/L EDTA (pH 7.4)), 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  变性鲑鱼 DNA/ml,  $42^{\circ}\text{C}$  预杂交 4 小时, 杂交溶液含上述预杂交溶液和加热变性的 <sup>32</sup>P-EGFRcDNA(pE<sub>7</sub>),  $1-2 \times 10^6$  cpm/ml 的最终浓度,

$42^{\circ}\text{C}$  杂交 24 小时。洗涤条件为: 室温、 $2 \times \text{ssc}/0.1\%$  SDS、10 分钟, 重复三次;  $45^{\circ}\text{C}$ 、 $0.1 \times \text{ssc}/0.1\%$  SDS、10 分钟, 重复三次, 膜在空气中干燥后作放射自显影。

## 结果和讨论

### 一、细胞 RNA 和 DNA 的简化分离

对于分析多种细胞样品的研究,大量的细胞培养和 RNA、DNA 分离纯化步骤给工作带来很多不便,我们采用简化微量的分离法,每种细胞只需接种  $1-1.5 \times 10^5$  个细胞到一个面积为  $4 \times 3 \text{cm}^2$  的小北京瓶中,常规培养 3—5 天,细胞生长到约  $5-10 \times 10^5$  个时,就可用于进行 RNA、DNA 分离。根据实验需要,可以同时分析十种以上细胞样品。

细胞 RNA 分离采用盐酸胍方法。盐酸胍是一种有效的 RNase 抑制剂,直接用高浓度盐酸胍裂解细胞,可以显著减少细胞 RNA 在分离过程中的降解。在高浓度盐酸胍中加入 1/2 体积 95% 乙醇可有效地选择沉淀细胞 RNA 而很少沉淀细胞 DNA 与蛋白质。增加乙醇体积并不提高 RNA 产量反而会增加 DNA 和蛋白质的污染<sup>[11]</sup>。用简化方法分离的 RNA 之  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  的值可以达到  $\geq 1.95$ , RNA 样品经甲醛变性后在含 6% 甲醛-10% 琼脂糖电泳上鉴定,可见清晰的 28 S、18 S RNA 和均匀的一片不同分子量 RNA,适用于作点吸印或 Northern 印迹杂交分析。

简化的细胞 DNA 制备方法,避免 DNA 对 TE 缓冲液的长时间透析或乙醇沉淀后的溶解过程,简化步骤所制备的 DNA 样品经琼脂糖电泳鉴定,呈高分子量状态,无 RNA 污染,适合于点吸印杂交分析的要求。

### 二、几种人肿瘤细胞中 EGFR 基因表达分析

在用微量、简化步骤分离细胞 RNA、DNA 时,先用 0.2% 胰酶消化分离细胞,细胞计数后,离心回收用于分离 RNA 或 DNA。在作点吸印杂交时,以细胞数为定量标准进行定量稀

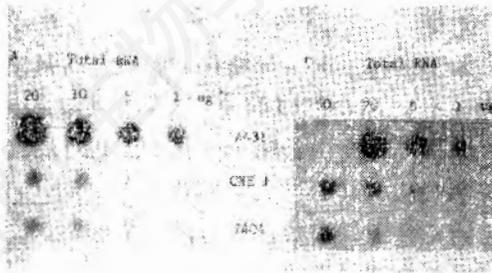


图1 不同方法制备 RNA 样品的杂交

- A. 简化方法  
B. GTC-CsCl 超离心法

释和点吸印,也可用微量紫外分光光度测定浓度后作定量印迹吸附。

用简化方法从 A<sub>431</sub>, 7404, CNE<sub>1</sub> 细胞分离的总 RNA 以梯度稀释吸印后与 <sup>32</sup>P-pE<sub>7</sub> 探针杂交。

图 1, A 示放射自显影结果, A<sub>431</sub> 细胞有很高的 EGFR 基因表达, 7404 和 CNE<sub>1</sub> 细胞也有 EGFR 基因转录产物, 从杂交信号强度比较, 相当于 A<sub>431</sub> 细胞的二十分之一到五十分之一。

图 1, B 是用异硫氰酸胍-氯化铯梯度离心法分离纯化的细胞总 RNA 点吸印杂交放射自显影结果, 从杂交信号强度比较, CNE<sub>1</sub> 细胞中 EGFR 基因转录产物约为 A<sub>431</sub> 细胞的 1/20 到 1/50, 7404 细胞中约为 A<sub>431</sub> 细胞的 1/50。因此说明用微量、简化方法分离得到的 RNA 作点吸印杂交分析, 可以获得用纯化 RNA 分析的相似结果。文献报告 A<sub>431</sub> 细胞表面约有 3—5 × 10<sup>6</sup> 个 EGFR 分子<sup>[7]</sup>, 是正常成纤维细胞的一百倍左右, 我们用简化法分离 RNA 的点吸印杂交证实了 A<sub>431</sub> 细胞中 EGFR 基因的高度表达, 结果颇相符合, 目前尚未见到人肝癌细胞、鼻咽癌细胞中 EGFR 基因表达的报告。我们的实验结果表明 7404 和 CNE<sub>1</sub> 细胞都有 EGFR 基因的表达, 目前没有正常人肝细胞株和正常人鼻咽上皮细胞株可被用作对照, 但是从 <sup>125</sup>I-EGF 结合和外源 EGF 对 7404、CNE<sub>1</sub> 细胞生长的影响资料分析(本实验室工作, 另文发表)说明 7404 和 CNE<sub>1</sub> 细胞中 EGFR 基因的表达对癌细胞生长的控制是

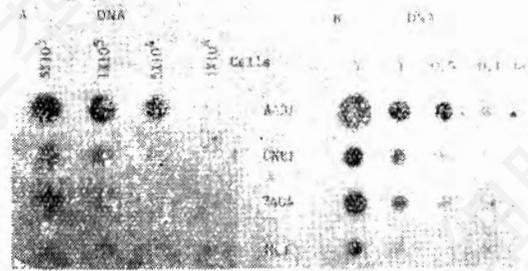


图2 不同方法制备 DNA 样品的杂交

- A. 简化方法  
B. 常规高分子量 DNA 抽提法

有重要意义的。

### 三、几种人肿瘤细胞中 EGFR 基因拷贝数分析

图 2, A 是简化方法制备的 A<sub>431</sub>, 7404, CNE<sub>1</sub> 细胞和人胚肺成纤维细胞 HIF DNA 样品与 <sup>32</sup>P-E<sub>7</sub> 探针杂交。已知正常人成纤维细胞中 EGFR 基因是单拷贝的, 对杂交信号作比较分析, 可以测出 A<sub>431</sub> 细胞中, EEG 受体基因板放大了约 50 倍, Southern 报告的杂交结果相符<sup>[8]</sup>。至今, 我们没有看到关于人肝癌、鼻咽癌细胞中 EGFR 基因分析的报告, 我们的实验结果表明, CNE<sub>1</sub> 和 7404 细胞中分别约有 5 个或 5 个以上拷贝的 EGF 受体基因, 这一结果和用纯化的 DNA 所作的点杂交结果(图 2 B)也相似。King 等<sup>[9]</sup>分析了 5 种人肿瘤细胞株, 认为不同肿瘤细胞中 EGF 受体基因在分子水平上有多种不同的变化, 与具有单拷贝 EGF 受体基因的人胎盘 DNA 相比较, 某些肿瘤有 EGF 受体基因的放大。正常细胞的恶性转化和癌细胞表型的改变常常与某些癌基因的放大、基因结构与表达的改变有关。癌基因 erbB 与 EGF 受体胞内结构域的基因顺序具有高度同源性<sup>[6]</sup>, 提示我们, 肝癌细胞和鼻咽细胞中 EGF 受体基因拷贝数异常, 可能与癌的发生和癌细胞的特性有密切关系。

### 四、CNE<sub>1</sub> 细胞在 41℃ 培养下 EGFR 基因表达的改变

图 3 是 CNE<sub>1</sub> 细胞在 37℃ 正常生长 2—4

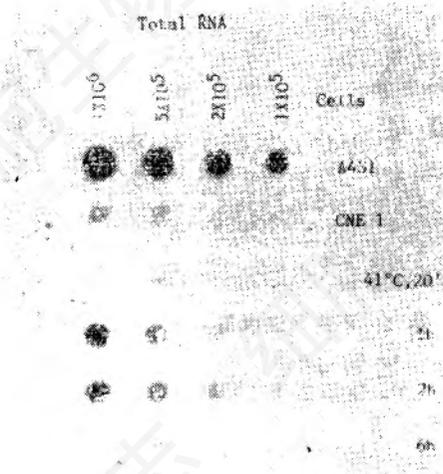


图3 高温培养对CNE<sub>1</sub>细胞EGFR基因表达的影响

天后转入41℃培养20分钟、1小时、2小时、6小时后用简化法分离RNA，与EGF受体cDNA探针杂交的结果。细胞RNA以不同细胞数的稀释度打点吸印，第一、第二行是从37℃培养的A<sub>431</sub>和CNE<sub>1</sub>细胞分离的RNA作为对照，结果表明CNE<sub>1</sub>细胞在41℃培养的诱导EGF受体基因表达短暂的升高，培养1—2小时，EGF受体基因表达可能增加2—5倍，6小时后又降为接近正常水平。姚曾序等<sup>[10]</sup>曾建立了CNE细胞的耐高温株，该高温株细胞，与亲本株细胞比较，在血清依赖性，软琼脂上集落生成能力和细胞凝集特性某方面均提示恶性强度有降低的趋势。CNE<sub>1</sub>细胞有EGF受体基因的表达，高温处理诱导该基因表达发生一些改变，提示高温细胞株在细胞生物学特点方面的改变，可能与细胞生长因子及其受体基因活性或细胞对生长因子的反应性的改变有联系。

## 小 结

本文报告了用一种简化的微量方法从培养细胞分离总RNA和DNA，结合点吸印杂交技术，分析人表皮生长因子受体(EGFR)基因在人肝癌细胞(7404)、人鼻咽癌细胞(CNE<sub>1</sub>)中的表达和基因拷贝数，该方法需要细胞少，每个样品(~10<sup>6</sup>个细胞)，操作简便、快速，适合于同时对多种细胞样品的初步分析。本文实验结果表明人表皮癌细胞株A<sub>431</sub>有过度的EGFR基因表达，7404和CNE<sub>1</sub>细胞也有EGFR基因表达，EGFR基因在A<sub>431</sub>、7404和CNE<sub>1</sub>细胞中分别有50倍和5倍左右的放大，CNE<sub>1</sub>细胞在41℃高温培养下能诱导EGFR基因表达的短暂升高。

## 参 考 文 献

- [1] Southern E. M., 1975, *J. Mol. Biol.*, 98, 503.
- [2] Thomas P. S., 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5201.
- [3] White B. and Bancroft F. C., 1982, *J. B. C.*, 257(15), 8569.
- [4] Chirgwin J. M. et al., 1979, *Biochemistry*, 18, 5394.
- [5] Maniatis T. et al., 1982, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [6] Xu Y. H. et al., 1984, *Nature*, 309, 806.
- [7] Xu Y. H. et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 7308.
- [8] Merlino G. T. et al., 1984, *Science*, 224, 417.
- [9] King C. R. et al., 1985, *Nucleic Acid Res.*, 13, 8477.
- [10] 姚曾序等, 1985, *实验生物学报*, 18(1), 25.
- [11] Steve C. et al., 1984, *Analytical Biochemistry*, 137, 15—19.