

用固相膜预饱和和竞争杂交方法 比较大鼠肝和肝癌核 RNA

徐亚男 张玉砚

(中国科学院 上海细胞生物学研究所)

我们曾用 DNA 固相膜法竞争杂交实验观察到, 二乙基亚硝胺(DENA)诱发大鼠肝癌发生过程中, 与 DNA 重复顺序互补的大鼠肝核 RNA 的核苷酸顺序, 在给 DENA 2 周时部分有丢失; 给 DENA 4 周后又恢复与正常肝的相似; 给 DENA 8 周后又复有丢失, 而且不再恢复正常^[1]。竞争抑制实验一般用于比较不同 RNA 间核苷酸顺序的相关性, 是一种定性分析方法。因此, 我们试图采用 Soeiro 的预饱和和杂交竞争抑制实验^[2], 以便了解能否在一定范围内, 对大鼠正常肝和肝癌(BERH-2)核 RNA 的差异作量上的比较。

实验材料和方法

实验材料: 大鼠正常肝和大鼠移植性肝癌(BERH-2)^[3]。

细胞核 DNA 和 RNA 的抽提: 同前文^[1]。

¹²⁵I 体外标记正常肝核 RNA: 同前文^[1]。

核酸分子杂交技术: 杂交方法同前文^[1], 系采用 Gillespie 和 Spiegelman(1965)^[4] 的 DNA-膜方法(将大鼠正常肝核 DNA 固定于滤膜上, 每张小膜上 DNA 含量约 1 微克)及 Soeiro 的预饱和和杂交竞争抑制实验^[2]。用 NE8321 液体闪烁计数器测脉冲数。

结 果

(一) 预饱和和杂交的反应条件及其稳定性

固定于硝基纤维滤膜上的变性 DNA, 以及与膜上变性 DNA 杂交的 RNA 分子, 在一定的反应条件下, 是相对而不是绝对的稳定。

因此, 在进行预饱和和杂交实验之前, 必须选择较适的预饱和和杂交的反应条件, 以便能得到较理想的实验结果。

1. 反应温度 将变性 DNA-膜, 在 $2 \times \text{SSC}(0.3\text{M NaCl}, 0.03\text{M 柠檬酸钠}), 30\%$ 甲酰胺, $0.1\% \text{SDS}(十二烷基磺酸钠)$, 45°C 反应条件下, 或在 $2 \times \text{SSC}, 65^\circ\text{C}$ 反应条件下, 温育反应不同时间后, 再与 ¹²⁵I 标记的肝核 RNA 杂交反应。用 RNase 处理后, 计算标记 RNA 与变性 DNA 杂交百分数。预温育时间愈短, 其杂交百分数愈高。以最短预温育时间的杂交百分数为 100%, 计算其他不同时间杂交反应的相对杂交百分数。结果表明, 在 45°C 一组, 预温育 25 小时后的杂交百分数, 比预温育 5 小时后的杂交百分数低约 10%; 预温育 72 小时后的杂交百分数, 又比预温育 25 小时后的杂交百分数低约 10%。而在 65°C 一组, 预温育 48 小时后的杂交百分数, 比预温育 24 小时后的杂交百分数低约 30%。如图 1 所示,

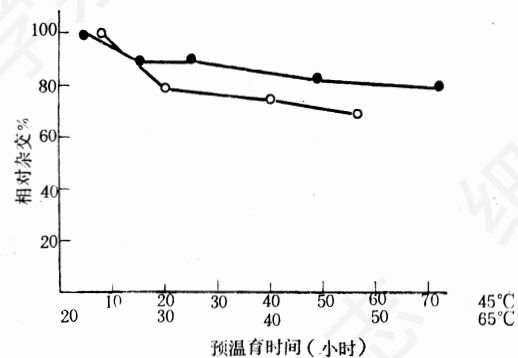


图 1 预温育温度和时间对再杂交反应的影响

●—● 45°C; ○—○ 65°C。

膜上变性 DNA, 在 65°C 反应条件下, 比在 45°C 反应条件下更加不稳定。

2. 预饱和和杂交核酸量 将变性 DNA-膜, 在 2×SSC, 30% 甲酰胺, 0.1% SDS, 45°C 反应条件下, 与不同量的未标记的竞争 RNA 预饱和和杂交反应不同时间后, 再与 ¹²⁵I 标记的肝核 RNA 杂交。用 RNase 处理后, 测定并计算标记 RNA 的杂交百分数, 结果如图 2 所示, 标记 RNA 与 DNA 的杂交百分数, 则随预饱和和杂交反应中非标记竞争 RNA 浓度之增加而下降。

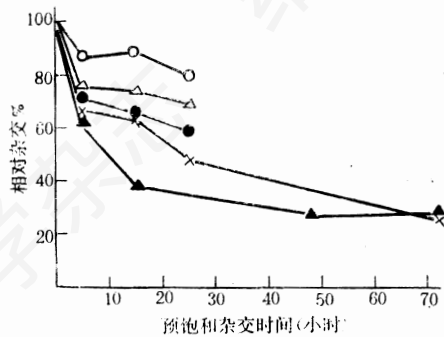


图 2 预饱和和杂交核酸量和时间对再杂交反应的影响

预饱和和杂交核酸量:
 ○—○ 25 微克, ×—× 100 微克,
 △—△ 50 微克, ▲—▲ 200 微克。
 ●—● 75 微克,

又如图 3 所示, 滤膜上 DNA 含量为 1 微克, 预饱和和杂交反应条件同图 2, 在同样的反

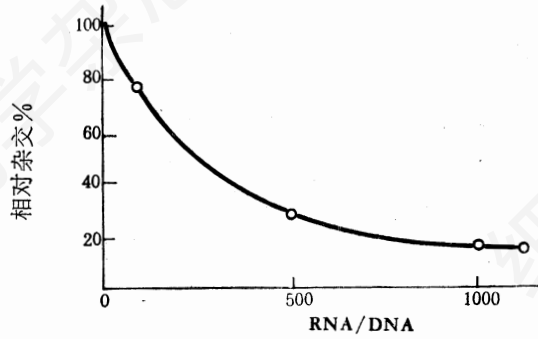


图 3 RNA/DNA 的比值对再杂交的饱和和竞争抑制曲线

应时间内, RNA/DNA 的比值为 1,000 时, 才达到一定程度的预饱和和竞争抑制。至于同源 RNA 没有达到 100% 的预饱和和竞争抑制, 可能由于再温育时, 预饱和和杂交上的 RNA 又部分脱落的结果。

3. 预饱和和杂交分子的稳定性 将变性 DNA-膜先与 ¹²⁵I 标记的肝核 RNA 杂交反应, 再浸于不同的反应液内温育, 间隔一定时间后, 取出膜, RNase 处理后测脉冲数。由未经再温育的对照组脉冲数与经再温育后的脉冲数之差, 计算预饱和和杂交分子丢失的百分数 (见表 1)。预饱和和杂交反应和再温育反应的条件均为低温反应时, 预饱和和杂交分子丢失的百分数最少。

表 1 预饱和和杂交分子的稳定性实验*

预饱和和杂交条件	再温育条件	预饱和和杂交分子丢失%
2×SSC 标记 RNA 60°C 16小时	2×SSC, 60°C, 8小时	24.4
	5×SSC, 60°C, 8小时	25.2
	5×SSC, 50%甲酰胺, 0.1%SDS, 37°C, 8小时	32.5
	2×SSC, 30%甲酰胺, 0.1%SDS, 45°C, 8小时	50.3
2×SSC 30%甲酰胺 0.1%SDS 标记 RNA 45°C 16小时	2×SSC, 60°C, 8小时	24.0
	5×SSC, 60°C, 8小时	22.8
	5×SSC, 50%甲酰胺, 0.1%SDS, 37°C, 8小时	16.4
	2×SSC, 30%甲酰胺, 0.1%SDS, 45°C, 8小时	18.9

* 两次实验平均值。

(二) 大鼠肝和肝癌核 RNA 的比较

用预饱和和杂交实验比较大鼠肝和肝癌核 RNA, 并与竞争抑制实验相对比。

第一组预饱和和竞争抑制组, 将变性 DNA-膜在含有 $2 \times \text{SSC}$, 30% 甲酰胺, 0.1% SDS, 未标记的大鼠正常肝核 RNA 或大鼠 BERH-2 肝癌核 RNA 的温育液内, 45°C 预饱和和杂交 16—24 小时, 使未标记的核 RNA 与 DNA 的杂交达饱和, 然后将膜移入只含有 4—5 微克 ^{125}I -正常肝核 RNA 的温育液内, 45°C 杂交反应 8—24 小时; 第二组, 将变性 DNA-膜 (~ 1 微克) 在含有 $2 \times \text{SSC}$, 30% 甲酰胺, 0.1% SDS, 未标记的大鼠正常核肝 RNA 或大鼠 BERH-2 肝癌核 RNA 的温育液内, 45°C 预饱

和杂交 16—24 小时, 使未标记的核 RNA 与 DNA 的杂交达饱和, 然后在有竞争 RNA 存在条件下, 加入 4—5 微克 ^{125}I -肝核 RNA, 使继续竞争杂交 8—24 小时; 第三组, 作为第二组对照组, 将变性 DNA-膜 (~ 1 微克) 在不含有未标记竞争 RNA 的温育液内温育 16—24 小时, 将膜移入含有竞争 RNA 和标记肝核 RNA 的温育液内竞争杂交 8—24 小时; 第四组则为竞争抑制组, 将 DNA-膜在含有标记 RNA 和竞争 RNA 的温育液内, 45°C 反应 24 小时。各组杂交反应后, 用 RNase 处理膜, 测放射性, 计算相对杂交百分数和竞争抑制百分数, 结果见表 2。

表 2 大鼠肝和肝癌核 RNA 的比较 (I)
(反应条件: 45°C , 30% 甲酰胺)

组 别	竞争 RNA		大鼠肝核 RNA	大鼠 BERH-2 肝癌核 RNA	差 异 (t 值)
	竞争抑制%	RNA/DNA			
1. 预饱和和杂交		90	48.8 ± 5.0	17.7 ± 3.3	$31.1 < 0.005$
		1000	87.7	38.1	49.6
2. 预饱和和杂交 + 竞争抑制		90	78.6 ± 5.7	35.2 ± 13.6	$43.4 < 0.005$
3. 预温育 + 竞争抑制		90	70.2 ± 4.3	20.4 ± 9.7	$49.8 < 0.005$
		1000	99.2	59.5	39.7
4. 竞争抑制		100	82.7	33.8	48.9
		1000	96.9	63.5	33.4

当 RNA/DNA 为 90 时, 竞争 RNA 在第 2 组的竞争抑制百分数高于第 1 组, 当 RNA/DNA 为 1000 时, 第 3、4 组的竞争抑制百分数大于第 1 组。但是四组结果均表明, 大鼠肝

核 RNA 对标记大鼠肝核 RNA 的竞争抑制率大于大鼠 BERH-2 肝癌核 RNA, 介于大鼠肝核 RNA 和大鼠肝癌核 RNA 对标记肝核 RNA 的竞争抑制百分数的差值, 具有统计学意义。

表 3 大鼠肝和肝癌核 RNA 的比较 (I)
(反应条件: 60°C , $2 \times \text{SSC}$)

组 别	竞争 RNA		大鼠肝核 RNA	大鼠 BERH-2 肝癌核 RNA	差 异
	竞争抑制%	RNA/DNA			
1. 预饱和和杂交		100	60.0	27.0	33.0
2. 预饱和和杂交 + 竞争抑制		100	77.1	31.6	45.5
3. 预温育 + 竞争抑制		100	78.7	36.6	42.1

以 60°C 反应条件替代 45°C 反应条件, 比较大鼠正常肝核 RNA 和大鼠肝癌核 RNA, 结果见表 3。第 2、3 组的竞争抑制百分数大于第 1 组预饱和杂交组。介于大鼠肝核 RNA 和大鼠肝癌核 RNA 对标记肝核 RNA 的竞争抑制百分数的差值, 与表 2 结果相一致。

这些结果似乎表明, 大鼠肝癌核 RNA 的碱基顺序和大鼠肝核 RNA 的碱基顺序的同源性减少, 表 2 竞争抑制组, 与 DNA 重复顺序互补的大鼠肝核 RNA 和大鼠肝癌核 RNA 的竞争抑制率, 平均相差约 41.2%; 预饱和和杂交组, 其竞争抑制率平均也相差约 40.2%。表 3 虽然反应条件与表 2 有不同, 但其平均竞争抑制率之差也为 40.2%。

小结和讨论

本文采用固相膜核酸分子杂交技术, 以及预饱和和杂交和竞争抑制实验, 比较了大鼠正常肝核和大鼠肝癌(BERH-2)核 RNA。结果指出, 与 DNA 重复顺序互补的大鼠肝癌核 RNA 的核苷酸顺序, 比大鼠正常肝核 RNA 有缺失。这结果与大鼠正常肝核 RNA 和大鼠肝癌核 RNA, 分别与标记的大鼠中度重复顺序 DNA 饱和杂交值之差的结果相近似。从双倒数坐标曲线求得的大鼠肝癌核 RNA 与大鼠中度重复顺序 DNA 的饱和杂交值, 比大鼠正常肝核 RNA 的饱和杂交值约少 40% (未发表资料)。这结果是否反映大鼠 BERH-2 肝癌细胞重复顺序 DNA 的转录活性可能有近 40% 受抑制。

另外, 本实验结果提示我们, 竞争抑制实验, 或者预饱和和杂交竞争抑制实验, 在一定条件下和一定限度内, 能对不同 RNA 样品之间的碱基顺序差异性大小给予量的概念, 尽管各样品的相对杂交百分数, 随着实验条件的改变而有不同。

从方法原理出发, 预饱和和杂交竞争抑制百分数应高于竞争抑制杂交的结果。但是本实验结果并非如此。推测主要原因可能与膜上 DNA 和预饱和杂交分子的稳定性有关。尽管我们曾试用多种反应条件, 也未能克服这个问题。这可能一方面由于我们实验用的细胞核 RNA 非常复杂, 另一方面与核 RNA 碱基互补配对的 DNA 又是重复顺序。核 RNA 与重复顺序 DNA 互补配对形成的杂交分子是相当复杂的, 其中有的 T_m 值比较高, 所以稳定性比较大, 有的 T_m 值比较低, 稳定性就比较差。由于少量不稳定杂交分子的溶解, 使预饱和状态变成预而不饱和状态, 必然使预饱和和杂交后的标记 RNA 的杂交百分数提高。

参 考 文 献

- [1] 张玉砚、徐永华、徐亚男、彭素芬、林惠文 1978. 实验生物学报, 11:97—104.
- [2] Soeiro, Ruy and J. E. Darnell, 1969. *J. Mol. Biol.*, 44: 551—562
- [3] 强家模、季闻行、孙兰英、徐永华, 1978. 实验生物学报, 11:87—93.
- [4] Gillespie, D. and Spiegelman, S, 1965. *J. Mol. Biol.* 12: 829—842