

“突触引物”实时荧光 PCR 检测端粒酶活性

李庆阁¹,董春升¹,汪世溶¹,梁基选²

(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

2. 厦门大学生命科学学院抗癌研究中心,福建 厦门 361005)

摘要: 为建立一种简便的端粒酶测定方法,首先采用高灵敏的核酸染料 SYBR Gold 染色代替放射自显影,建立了简便可靠的扩增产物显示方法.进而合成了端粒酶扩增产物的模拟产物,考察了突触引物检测的可行性和灵敏度.在此基础上,建立了检测端粒酶活性实时荧光 PCR.由于突触引物可以有效的降低非特异扩增,有效解决了端粒酶活性检测中的非特异产物干扰,为定量检测端粒酶活性打下了基础.

关键词: 端粒酶;突触引物;实时 PCR

中图分类号: Q 52

文献标识码: A

端粒酶(Telomerase)是由蛋白质和 RNA 组成的一种核糖核蛋白,主要功能是合成端粒序列并维持端粒序列的长度,修复断裂的染色体末端.细胞中端粒酶的活化弥补了染色质复制中的 DNA 聚合酶不能从头合成线性 DNA 的缺陷,保证了染色质的稳定复制,使细胞越过细胞周期的死亡危险,获得无限增殖的能力,形成永生化细胞^[1~3].近年来的研究发现,人类 90% 肿瘤中有端粒酶活性的异常表达,绝大部分正常组织细胞中却无端粒酶活性的表达,因此认为端粒酶活性是肿瘤诊断的一个很好标志物^[4],其激活及表达程度与肿瘤的发生和转移密切相关,有可能成为抗肿瘤药物的新靶点.因此建立一种高效、快速、灵敏的检测方法对肿瘤诊断、预后指徵、追踪肿瘤转移、判断手术后癌复发等具有重要意义.

目前广泛采用的端粒酶活性检测方法是“端粒重复扩增程序”(telomeric repeat amplification protocol,简称 TRAP)^[5].TRAP 法是将端粒重复序列延伸与 PCR 技术结合,反应产物为双链 DNA,检测步骤包括端粒酶合成反应和产物检测两步,产物检测有放射自显影法、荧光法、ELISA 法等^[6~9].TRAP 法的主要问题是操作烦琐和引物二聚体非特异扩增产物,由于非特异扩增产物与特异扩增产物序列同

样由相差 6 个碱基的片段序列构成,即使采用特异探针也无法区别特异与非特异扩增.因此只有采用高度特异的扩增技术才能从根本上解决这一问题.对于前一问题,目前最有效的解决途径是采用扩增和检测同时进行的实时荧光 PCR,实时荧光 PCR 是近年来出现的一种新型 PCR 检测技术^[10],不仅避免了 PCR 后操作,而且实现了准确定量.最近 Hou 等^[11]将该技术用于端粒酶检测,使 TRAP 大大简化,检测重现性和定量范围都得以明显提高,但采用荧光染料技术,无法识别非特异扩增.针对以上问题,我们采用突触引物^[12]以期在实现实时荧光检测的同时,防止非特异扩增.

1 材料与方法

1.1 端粒酶的提取

取 BABL/C 小鼠睾丸,用洗涤液(10 mmol/L HEPS-KOH (pH7.5)含 1.5 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L KCl 和 1.0 mmol/L 二硫苏糖醇)洗 2 次,置 1.5 mL 离心管中,加入 200 μ L 裂解液(10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5)含 1.0 mmol/L MgCl₂, 1.0 mmol/L EGTA, 0.1 mmol/L 苯甲基磺酰氟, 5 mmol/L β -巯基乙醇, 0.5% CHAPS 和 10% 甘油),匀浆后移至冰浴中,30 min 后 4 $^{\circ}$ C 离心(12 000 g) 30 min,取上清备用.

1.2 TRAP 的 SYBR Gold 显色测定

按 TRAP 法测定端粒酶活性^[5].在 0.2 mL

收稿日期:2002-05-20

作者简介:李庆阁(1966-),男,副研究员.

PCR 反应管中加入 0.1 μg 下游 CX 引物:d(CCCT-TACCCTTACCCTTACCCTAA), 然后加入石蜡小丸, 于 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min, 石蜡熔化后使自然冷却. 在石蜡上面加入 50 μL PCR 反应液(含 0.1 μg 上游 TS 引物: d(AATCCGTCGAGCAAGTT), 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 2.0 U Taq 聚合酶, 5 μL 10 \times PCR 缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 15 mmol/L MgCl_2 , 0.05% Tween-20, 630 mmol/L KCl 及 10 mmol/L EGTA) 和 5 μL 端粒酶提取物), 置 30 $^{\circ}\text{C}$ 30 min. 移至 iCycler (BIO-RAD) 实时荧光 PCR 仪器, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 按 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min. 按每孔 20 μL 扩增产物经 12% PAGE 电泳(电泳功率 75 W, 2 h), 最后用 1:10 000 的 SYBR Gold (Molecular Probe 公司) 染色 20 min, 用 Fluor-S 凝胶成像系统 (BIO-RAD) 观察结果.

1.3 突触引物检测端粒酶模型实验

按 1.2 步骤, 在反应管中预先加入下游突触引物为 RP: FAM-d(TAGAGCACAGCCTGTCCGTG)/d(ACGACAGGCTGTGCTCTA)-dabcyl, 50 μL PCR 反应液中上游引物 MTS^[13]为:d(AGCATCCGTCGAGCAAGTT), 另加 0.5 pmol RPC3: d(TAGAGCACAGCCTGTCCGTG(CTAACC)₃)和 5 μL MTSR6: d(AGCATCCGTCGAGCAAGTTAG(GGTTAG)₆)代替端粒酶提取物, 余同 1.2. 反应管置于 iCycler (BIO-RAD) 实时荧光 PCR 仪器, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 按 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 循环 35 次, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, 退火时收集荧光信号.

1.4 突触引物实时荧光 PCR 检测端粒酶

按 1.2, 下游引物换作 CX 突触引物: FAM-d(CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA)/d(TTAGGGTAA GGGTAA GGGTAA GGG)-dabcyl, 反应管置于 iCycler (BIO-RAD) 实时荧光 PCR 仪器, 退火时收集荧光信号.

2 结果

2.1 端粒酶的 TRAP-SYBR Gold 显色测定

由于细胞中端粒酶含量很低, 常规的 TRAP 多采用放射自显影进行检测, 该法目前仍是确认端粒酶活性的可靠方法, 但操作不便. 我们这里采用了一种新型的高灵敏的荧光染料 SYBR Gold 对 TRAP 反应产物进行染色, 然后在紫外灯下直接观察, 结果

如图 1 所示, 阳性标本显示出清晰的端粒酶产物带, 可取代常规的放射自显影. 荧光染色省时方便, 为以后鉴定结果提供了便利.

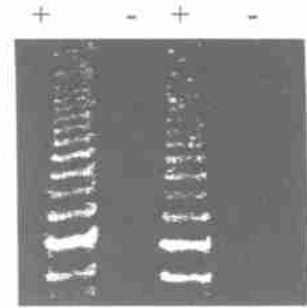


图 1 用 TS 和 CX 检测端粒酶活性的 SYBR Gold 电泳染色结果.

阳性标本 (+) 含 0.6 μg 提取蛋白, 阴性标本 (-) 为水.

Fig. 1 Detection of telomerase using TS and CX primers and stained with SYBR Gold

2.2 突触引物检测端粒酶模型实验

我们采用 MTSR6 模板来模拟端粒酶基因转录产物考察突触引物的可行性, MTS 和 RP 引物扩增该模板, 可得到和端粒酶扩增产物一样的相差 6 bp 的片段^[13]. 实验中, 我们将下游引物 RP 设计成突触引物, 对不同浓度的 MTSR6 进行了扩增, 实时荧光 PCR 测定结果如图 2 所示, 可以看出, 四个浓度样品的荧光值均先后升起, 模板浓度越大, 荧光升起越早, 相差一个梯度的模板浓度, 荧光升起相差 3~4 个循环, 符合 PCR 理论扩增效率(理论相差 3.3 个循环), 空白没有升起, 说明没有非特异扩增.

2.3 突触引物实时荧光 PCR 检测端粒酶

我们采用经典的 TRAP 扩增引物, 设计成突触引物. TS 作为延伸引物, 依靠端粒酶的逆转录酶活性, 以端粒 RNA 为模板逆转录反应生成 cDNA; 以 cDNA 为模板, TS 引物和 CX 突触引物扩增生成双链 DNA 产物, 并进行实时荧光检测. 实验结果如图 3 所示, 可以看出, 实时 PCR 检测结果和电泳结果一致.

3 讨论

目前, 测定端粒酶活性广泛使用的 TRAP 方

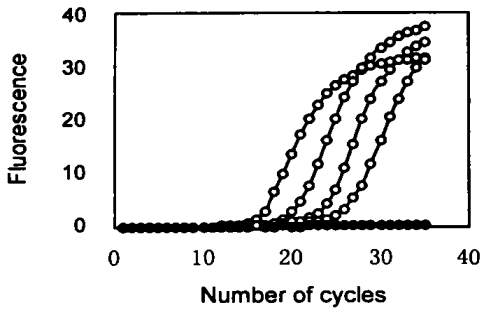


图2 以 MTSR6 为模板的突触引物实时荧光 PCR 检测曲线.

图中曲线自左至右使用模板分别含 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 和 10^{-5} pmol. MTST6, 水作为空白样本

Fig. 2 Real-time detection of MTSR6 using antenna primer

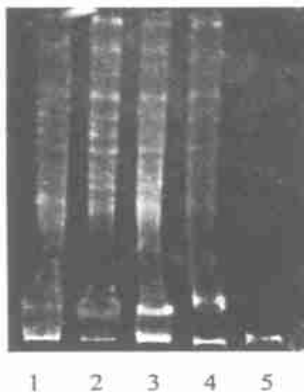
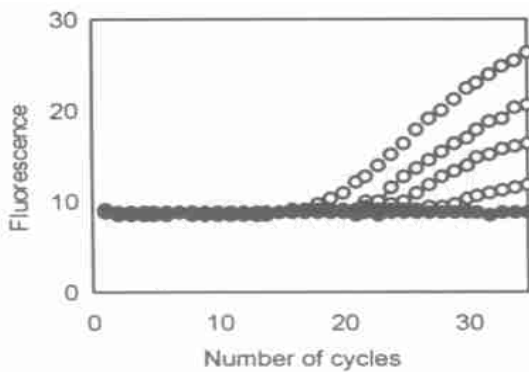


图3 突触引物检测端粒酶活性. 上图为实时荧光 PCR 结果, 下图为 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果.

样品 1, 2, 3, 4 样品(上图自左至右)为含提取蛋白分别为 6, 0.6, 0.06, 0.006 μg , 5 为空白对照

Fig. 3 Telomerase detection with antenna primer. The upper panel is real - time PCR detection profile , and the lower panel is electrophoresis diagram of the corresponding PCR products

法,均采用凝胶电泳或 PCR-ELISA 等“终点”检测方式,难以获得精确的定量结果,定量范围有限.实时荧光 PCR 技术则可以有效地解决定量问题.实时荧光 PCR 一般采用特异探针来避免非特异扩增的干扰,但对于端粒酶转录产物来说,这一方法并不奏效.因此 Hou 等^[11]只能使用荧光染料实现实时荧光 PCR,但如所预料,无法避免引物二聚体的干扰.我们采用的突触引物的最大优点在于在实时荧光 PCR 检测的同时具备预防非特异扩增能力.为建立突触引物扩增技术,我们首先考察了一种简便的扩增产物染色技术以代替复杂的有防护要求的放射自显影方法,结果表明,新型高灵敏的荧光染料 SYBR Gold 可以满足这一要求,使用步骤与溴化乙锭一样简单,大大方便了实验操作.

接着验证了突触引物的可行性,用 MSTR6 作为模拟模板,证明突触引物可以实现特异的实时荧光 PCR 测定.在随后设计端粒酶测定的突触引物时,我们采用经典的 CX 引物,这是因为多数改进型引物都是基于消除引物二聚体的发生,突触引物本身已经具备这种能力,从而免去了不必要的 CX 修饰.

TRAP 包括转录和 PCR 两个过程,转录过程使用的 TS 引物也是 PCR 的上游引物,为保证转录的顺利进行,仅将下游引物 CX 设计为突触引物.我们注意到端粒酶提取物具有很强的 DNA 酶活性,如果将突触引物与提取物直接接触,突触引物会立即发生酶切,导致荧光背景升高,突触引物浓度降低,生成的随机寡核苷酸小片段还会引起难以预料的非特异延伸.因此,我们将突触引物密封在石蜡下面,使与提取物在低温阶段隔离.实验证明,这样做可以有效地避免非特异荧光信号的产生.

端粒酶突触引物实时荧光 PCR 检测技术的建立,不仅使端粒酶的检测步骤大为简便,也提高了检测的特异性,为端粒酶准确定量的检测打下了基础.本文设计突触引物的方式,同样适用于其它 CX 的改进型引物,如最近一种引物能够等效扩增端粒酶不同长度的转录片段^[13],可以预期将这种引物设计成突触引物,也将获得同样的结果.

抗癌研究中心王天叫老师在实验中给予诸多帮助,特此致谢!

参考文献:

- [1] 郑晓飞,王升启,孙志贤. 端粒与端粒酶研究进展[J]. 癌症,1997,16(6):464-465.
- [2] 倪祖梅. 端粒酶介绍[J]. 细胞生物学杂志,1998,20(4):145-156.
- [3] 邹学森,吴时耕. 端粒酶作为肿瘤标志物的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册,1999;20(1):22-24.
- [4] Blackburn E H. Structure and function of telomere[J]. Nature, 1991, 350:569-573.
- [5] Kim N W, Piatyszek M A, Prowse K R, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. Science, 1994, 266:2011-2015.
- [6] Kim N W, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)[J]. Nucleic Acids Res., 1997, 25(13):2595-2597.
- [7] Krupp G, Kuhne K, Tamm S, et al. Molecular basis of artifacts in the detection of telomerase activity and a modified primer for a more robust 'TRAP' assay[J]. Nucl. Acids. Res., 1997, 25:919-921.
- [8] Hirose M, Abe-Hashimoto J, Tahara H, et al. New method to measure telomerase activity by transcription-mediated amplification and hybridization protection assay[J]. Clin Chem., 1998, 44(12):2446-2452.
- [9] Nakamura Y, Hirose M, Matsuo H, et al. Simple, rapid, quantitative, and sensitive detection of telomere repeats in cell lysate by a hybridization protection assay[J]. Clin Chem., 1999, 45(10):1718-1724.
- [10] Lee L G, Connell C R, Bloch W. Allelic discrimination by nick/translation PCR with fluorogenic probes[J]. Nucleic Acids Res., 1993, 21:3761-3766.
- [11] Hou M, Xu D, Björkholm M, et al. Real-time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity[J]. Clin Chem., 2001, 47:519-524.
- [12] 郭秋平,李庆阁,栾国彦,等. 用荧光双链引物特异扩增并定量核酸[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2002,41(1):108-111.
- [13] Szatmari I, Tokes S, Dunn C B, et al. Modified telomeric repeat amplification protocol: a quantitative radioactive assay for telomerase without using electrophoresis[J]. Anal Biochem., 2000, 282(1):80-88.

Real-time Fluorescence PCR Detection of Telomerase Activity Using Antenna Primer

LI Qing-ge¹, DONG Chun-sheng¹, WANG Shi-rong¹, LIANG Ji-xuan²

(1. Education Ministry Key Lab. for Cell Biology and Tumor Cell Engineering in Xiamen Univ. ;
2. Cancer Research Center, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: In order to establish a simple detection method for telomerase, a sensitive fluorescence staining dye SYBR Gold was first used to substitute radioactive imaging for polyacrylamide electrophoresis, and then, a mimic template of telomerase transcript was used to assess the antenna primers used for real-time PCR detection regarding its feasibility and sensitivity, and finally, real-time fluorescence detection for telomerase was established using antenna primers. Since antenna primers can greatly reduce non-specific amplification, real-time PCR for telomerase based on antenna primers actually obviates the non-specific amplification in TRAP, and sets the base for reproducible quantification of telomerase.

Key words: telomerase; antenna primer; real-time PCR