热休克基因 mRNA 定量 RT-PCR 检测方法 的建立及其应用

王艳林 沈翊珩*

(中国医学科学院中国协和医科大学基础医学研究所, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005. * 联系人)

摘要 广泛存在于生物细胞中的热休克蛋白(heat shock proteins, HSP)不仅在机体的应激保护、生长发育中起重要作用,而且与疾病的发生密切相关.因此,建立准确检测细胞中 HSP 基因表达水平的 RT-PCR 方法对基础及临床研究均具有重要意义.首先应用 DNA 重组技术及体外转录体系制备了一种能用作测定 *hsp70*, *hsp90 α* 及 *hsp90 β* mRNA 的复合内参照 RNA;然后,通过对反应条件的优化、选择,建立了一种特异检测 3 种主要的人 HSP 基因 mRNA 水平的定量 RT-PCR 体系.应用此体系测定了 *hsp70*, *hsp90 α* 及 *hsp90 β* 在 Jurkat 细胞中的组成性及热诱导表达规律.

关键词 热休克基因 mRNA 定量 RT-PCR

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是生物在进化中表达的一组进化上高度保守的蛋白质家族.按照分子量大小、氨基酸序列的同源性及其功能上的近似程度可将 HSPs 分为 HSP90, HSP70, HSP60, 小分子 HSP 及泛素等亚家族.其中 HSP90 有 α 及 β 两种拷贝.它们作为分子伴侣参与细胞对多种刺激(包括冷、热、缺氧、氨基酸类似物、重金属离子及病毒感染等)的保护

-
- 50 蒋争凡,朱山,翟中和.爪蟾卵非细胞体系诱导小鼠肝细胞核凋亡.科学通报,1998,43(4):409~413
- 51 朱山,蒋争凡,张博,等.诱导凋亡的非洲爪蟾卵提取物中激活的 DNase 特性及其鉴定.科学通报,1998,43(4):413~417
- 52 蒋争凡,朱山,翟中和.爪蟾卵非细胞体系诱导凋亡与 27kD 凋亡相关核酸酶的发现.北京大学学报,1998,34:324~331
- 53 Wang H, Li J, Bostock R M, et al. Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytoxin and invoked during development. Plant Cell, 1996, 8: 375~391
- 54 Ryerson D E, Heath M C. Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or by abiotic treatments. Plant Cell, 1996, 8: 393~402
- 55 Smart C A. Gene expression during leaf senescence. New Phytol, 1994, 126: 419~448
- 56 Lamb C J. Plant disease resistance genes in signal perception and transduction. Cell, 1994, 76: 419~422
- 57 Mittler R, Shulaev V, Lam E. Coordinated activation of programmed cell death and defense mechanisms in transgenic tobacco plants expressing a bacterial proton pump. Plant Cell, 1995, 7: 29~42
- 58 Sun Y L, Zhu H Z, Zhou J, et al. Menadione-induced apoptosis and the degradation of lamir-like protein in tobacco protoplasts. CMLS 1999, 55: 360~367
- 59 孙英丽,赵允,翟中和. Cytochrome c 能诱导植物细胞编程性死亡.植物学报,1999,41:379~387
- 60 Shen Y, Shenk T E. Viruses and apoptosis. Curr Biol, 1995, 5: 105~111
- 61 Zhao Y, Jiang Z F, Sun Y L, et al. Apoptosis of mouse liver nuclei induced in cytosol of carrot cells. FEBS Lett, 1999, 448: 197~200

(1999-04-02 收稿, 1999-05-19 收修改稿)

作用. HSP 主要参与细胞内新生肽链的折叠及转运, 以及识别变性蛋白质; HSP90 作为特异分子伴侣与类固醇激素受体(包括 GR, PR, ER, RAR 及 VDR 等)及信号传导途径中的酪氨酸蛋白激酶及丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶等分子结合, 调节它们的生物活性^[1,2]. HSP 不仅参与应激保护、信号传导、免疫应答、发育分化等重要生理过程, 还与许多疾病, 例如感染、自身免疫病、动脉粥样硬化及肿瘤等^[3,4]的形成有关, 因此, 检测细胞中热休克基因(*hsp*)表达水平, 对基础及临床研究均具有重要意义.

与 Northern 印迹法、斑点印迹法及原位杂交技术相比, 定量逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术以高度敏感、准确、灵敏及快捷的优点, 越来越多地被用于研究细胞内基因的定量表达^[5]. 选择适当的内参照是定量 RT-PCR 的关键. 我们应用 DNA 重组技术及体外转录体系制备了一种可用作检测细胞内 *hsp70*, *hsp90 α* 及 *hsp90 β* mRNA 水平的特异复合内参照 RNA; 并通过优化反应条件, 建立了测定 3 种热休克基因表达水平的定量 RT-PCR 体系.

1 材料与方法

() 试剂. 限制性内切酶, T4 DNA 连接酶, T4 DNA 聚合酶, Klenow 片段, RNaseA, 无 RNase 的 DNase, M-MLV 逆转录酶, NTP 及 dNTP 均为 Boehringer Mannheim 公司产品; T7 RNA 聚合酶为 Promega 公司产品; Taq DNA 聚合酶为华美公司产品; Sequenase version 2.0 测序试剂盒为 UBS 公司产品; DEPC、SDS、丙烯酰胺、甲叉丙烯酰胺及低熔点琼脂糖凝胶均为 Sigma 公司产品; α -³²P-UTP, α -³²P-dATP, α -³²P-dCTP 为北京亚辉公司产品; Oligo (dT)₁₈ 及 PCR 引物由中国科学院微生物研究所合成.

() 质粒. pBS-SK/HSP90 α (含人 *hsp90 α* cDNA) 及 pBS-SK 为本课题组保存质粒; pHSP70 (含人 *hsp70* cDNA) 由美国加州大学洛杉矶分校汪军博士惠赠; 含人 *hsp90 β* cDNA 的 pHSP90 β 由美国加州大学旧金山分校 Yamamoto 教授惠赠.

() 菌种及细胞株. 大肠杆菌 XL-1blue 及 Jurkat 细胞由本课题组提供.

() 质粒的重组、扩增及酶谱分析. 基本按文献[6]方法进行.

() DNA 的双链测序. 按照 Sequenase version 2.0 测序试剂盒说明书进行.

() 真核细胞总 RNA 提取. 参照 Chomezynski 等人^[7]的方法进行.

() 体外转录反应. 将 5 μ g 线性化的模板 DNA 加 20 μ L 5 $\times$ 体外转录缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, pH=7.9, 30 mmol/L MgCl₂, 10 mmol/L 亚精胺, 50 mmol/L NaCl), 10 μ L 100 mmol/L DTT, 2 μ L 2.5 mmol/L NTP, 40U T7 RNA 聚合酶, 加水至 100 μ L. 于 37 $^{\circ}$ C 保温 2 h 后加入无 RNase 的 DNase 水解模板 DNA, 将纯化后的 RNA 溶于 500 μ L DEPC 处理的水中, 分装后保存于 -70 $^{\circ}$ C 备用. 为检定转录产物的长度, 在反应体系中加入 5 μ Ci α -³²P-UTP.

() 逆转录反应. 在 0.5 mL Eppendorf 管中依次加入 4 μ L 5 $\times$ 反转录缓冲液(250 mmol/L Tris-HCl pH=8.3, 375 mmol/L KCl, 15 mmol/L MgCl₂), 1 μ L 10 mmol/L dNTP, 20U RNasin, 2 μ L 50 pmol/ μ L Oligo(dT)₁₈, 2 μ L 100 mmol/L DTT, 2 μ L 不同稀释度的内参照 RNA, 0.5~10 μ g 细胞总 RNA, 加水至 19 μ L, 混匀后, 65 $^{\circ}$ C 变性 5 s 后骤冷至 4 $^{\circ}$ C, 加 1 μ L 200 U/ μ L M-MLV 逆转录酶, 先在 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h, 再在 94 $^{\circ}$ C 灭活 5 min.

() PCR 扩增反应. 在 0.5 mL Eppendorf 管中建立如下反应体系: 2 μ L 10 $\times$ PCR 缓冲液(500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl pH=8.3, 15 mmol/L MgCl₂), 5' 和 3' 引物(10 pmol/ μ L)

各 2 μ L, 2 μ L 2.5 mmol/L dNTP, 2 μ L 反转录产物, 9 μ L H₂O, 94 $^{\circ}$ C加热 5 s 后加 1 μ L 1 U/ μ L Taq DNA 聚合酶, 再加 30 μ L 石蜡油后, 按以下程序扩增: 94 $^{\circ}$ C变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C延伸 2.5 min, 循环 8~30 次. 优化 PCR 条件时, 在上述体系中加 5 μ Ci α -³²P-dCTP 或 α -³²P-dATP.

() 扩增产物的电泳分析. 琼脂糖凝胶电泳: 12 μ L PCR 反应液在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳分离, 经溴化乙锭染色后照相, Gelscan XL 扫描仪扫描. 以目的 mRNA 扩增带的黑度对内参照 RNA 扩增带黑度的比值作为细胞中目的 mRNA 相对值; PAGE 电泳: 在同位素标记的扩增样品中加 100 μ L H₂O, 经氯仿/异戊醇抽提液体石蜡油层后, 进行 6% 尿素-PAGE 电泳, 凝胶经 80 $^{\circ}$ C真空抽干后, 在 -70 $^{\circ}$ C放射自显影.

() PCR 引物设计. 根据 *hsp70*, *hsp90 α* 及 *hsp90 β* 基因 cDNA 序列, 并经计算机检索, 设计了既可扩增细胞内又可扩增内参照中上述 3 种基因片段的 PCR 引物:

引物 1: *hsp70*-5' 5'-CGCGACCTGAACAAGAGCAT-3',
引物 2: *hsp70*-3' 5'-TCGAAGGTCACCTCGATCTG-3',
引物 3: *hsp90 α* -5' 5'-TGGTTGTGTCAAACCGATTG-3',
引物 4: *hsp90 α* -3' 5'-GTAGTTGTCATGCCATACAG-3',
引物 5: *hsp90 β* -5' 5'-ACTCCAACCGCATCTATCGC-3',
引物 6: *hsp90 β* -3' 5'-GTCAAGAGTAGAGAGGGAAT-3'.

2 结果

2.1 模板 DNA 质粒 pYL-HS 的构建

应用 DNA 重组技术, 分别从 pHSP70, pBS-SK/HSP90 α 及 pHSP90 β 中各切出 2 个 cDNA 片段, 然后按 5'-70⁵-90⁵-90³-70³-90⁵-90³-3' 排列顺序经 13 个过度质粒, 最后重组在载体 pBS-SK 中. 每个过度质粒均经测序及内切酶酶谱分析鉴定. 该重组质粒命名为 pYL-HS. pYL-HS 的插入片段长 1 644 bp. 该片段 5' 及 3' 侧分别为可用于体外转录的 T7 启动子及与逆转录引物结合的 poly(A)₃₀元件(图 1).

2.2 复合内参照 RNA 的体外转录合成

质粒 pYL-HS 经 *EcoR* Ⅰ酶切线性化后, 在含有 α -³²P-UTP 的体系中进行体外转录. 转录产物经尿素-PAGE 电泳分析. 结果表明合成的 RNA 为 1 632 bp 的全长转录物(结果未显示).

2.3 PCR 引物特异性

用上述 3 对引物分别扩增细胞总 RNA 中的 *hsp70*, *hsp90 α* 及 *hsp90 β* mRNA 及各基因相应的内参照 RNA (cRNA). 结果获得 3 组与预期长度一致的目的 mRNA 和内参照 RNA 片段(图 2, 表 1). 此结果表明设计的 3 对引物对各自的目的 mRNA 和内参照 RNA 具有扩增特异性, 相互间无非特异性交叉扩增现象.

表 1 3 种热休克基因 mRNA 及相应内参照 RNA 经 RT-PCR 后各自扩增片段的长度

基因	mRNA/ bp	内参照 RNA/ bp
<i>hsp70</i>	368	720
<i>hsp90α</i>	563	841
<i>hsp90β</i>	337	625

2.4 RT-PCR 反应条件的优化

(1) PCR 循环数. 以 3 μ g 细胞总 RNA 及 2 μ L 1:2 000 稀释后的内参照 RNA 的逆转录产物

图1 复合内参照RNA的模板质粒 pYL-HS 示意图

图2 *hsp70*, *hsp90α* 及 *hsp90β* 和相应内参照RNA的RT-PCR产物的琼脂糖凝胶电泳图

1 — *hsp70*, 2 — *hsp90β*; 3 — *hsp90α*;
4 — pBR 322/ *BstNiv*

为模板,并在PCR体系中加入 α - ^{32}P -dATP,分别进行不同循环次数扩增.在12~24次循环之间目的mRNA和内参照RNA的扩增带的黑度均呈线性化增加(图3).

(2) 内参照RNA用量.将内参照RNA储存液,分别以100,500,1000,5000倍稀释后,用扩增 *hsp90β* 的引物对5/6进行RT-PCR,证明DNA扩增带随cRNA浓度的增加而加深(结果未显示).

(3) 细胞RNA用量.在内参照RNA浓度相同(1:2000)条件下,反应体系中分别加入2,4,6,8,10 μg 细胞总RNA,用扩增 *hsp90β* 的引物对5/6进行RT-PCR,从图4可见,目的mRNA扩增带的黑度对相应内参照RNA扩增带的黑度的比值呈线性增加.

2.5 Jurkat 细胞中 *hsp* mRNA 水平的检测

综合以上的结果,我们将 *hsp* mRNA 定量RT-PCR反应的关键条件定为:3 μg 细胞总RNA、2000倍稀释内参照RNA储备液、PCR循环20次.应用该体系,测定了在37℃及热休克(42℃ 40 min)条件下,Jurkat细胞内3种 *hsp* 基因的mRNA水平.结果显示,在37℃的细胞中,*hsp70* 的表达极低,*hsp90α* 及 *hsp90β* 呈较高水平的组成性表达;当Jurkat细胞经热休克处理后,3种 *hsp* 基因均呈快速诱导表达,其中以 *hsp70* mRNA 升高最明显.在37℃恢复3 h后,*hsp70* mRNA 增加100多倍,而两种 *hsp90* 的表达仅升高2~3倍(图5).

3 讨论

由于RT-PCR技术的高度敏感、特异及快速的优点,已被广泛应用于测定细胞中靶基因的

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-18-1928>

图3 用不同PCR循环数扩增 *hsp90β* mRNA 及相应内参照RNA后的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

1~4 — 12, 16, 20, 24次循环.

a 为内参照RNA, b 为细胞总RNA

图4 细胞总 RNA 的用量与 *hsp90β* mRNA 扩增的关系

(a) 聚丙烯酰胺凝胶电泳图. A 为内参照, B 为细胞内 RNA, 1~5 —2, 4, 6, 8, 10 μg 细胞总 RNA; (b) *hsp90β* mRNA 及相应内参照 RNA 扩增带密度的比值与细胞 RNA 用量之间的线性关系图

mRNA 水平. 但是, 如何选择合适的内参照是该方法能否准确反映目的基因 mRNA 含量的关键. Chelly 等人^[8] 利用细胞中表达较恒定的 β -actin mRNA 作为内参照标准, 其不足之处在于人 PCR 过程中, 目的基因和内参照基因使用完全不同的引物对, 由于扩增效率的差异会影响定量的准确性. 理想的条件是用同一对引物扩增目的基因和内参照 RNA^[9], 但由于扩增片段长度相等必须分开进行反应, 否则, 无法应用凝胶电泳区分扩增产物. 为应用定量 RT-PCR 方法检测细胞中 *hsp* 基因表达水平, 我们首先构建了含有 3 种热休克基因片段的质粒 pYL-HS; 以其为模板, 体外转录产生复合内参照 RNA, 其中 *hsp70*, *hsp90α* 及 *hsp90β* 各自 2 个引物之间的长度与细胞内相应基因 mRNA 中相同的 2 个引物间的长度不同, 因此, 能在同一反应管内、用同一对引物同时扩增目的 mRNA 及相应内参照 RNA, 得到不同长度的扩增产物, 从而能被电泳分离, 达到准确定量的目的. 用本研究合成的复合内参照 RNA 可分别定量检测细胞中 3 种 *hsp* 基因的表达水平.

图5 热休克对 Jurkat 细胞中 *hsp* 基因表达的影响
C 示 37℃, HS 示 42℃ 30 min, H-3 示 HS 后 37℃ 3h

虽然 *hsp90α* 与 *hsp90β* 两种基因的编码区具有很高的同源性^[10], 但是, 它们之间的 5' 及 3' 非翻译区的序列明显不同; 同时, 考虑到如果扩增 5' 非翻译区中的 DNA 序列, 则可能发生由于逆转录不完全, 而影响对该片段扩增的结果, 以致不能正确反应这种基因的 mRNA 表达水平. 因而在构建复合内参照 RNA 的模板 DNA (pYL-HS) 时, 选用了 *hsp90α* 与 *hsp90β* 基因的 3' 非翻译区及其邻近的编码序列.

应用本研究建立的定量 RT-PCR 体系测定了热休克对 Jurkat 细胞中 3 种 *hsp* 基因表达的诱导作用. 检测发现, 在生理温度下 2 种 *hsp90* 基因有较高水平的组成性表达, *hsp70* 的组成性表达极低; 但是, 热休克对 *hsp70* 基因表达的诱导作用明显强于 *hsp90* 基因, 提示不同热休克蛋白的功能及基因表达的调控机制不同.

我们应用此体系研究了 *hsp90β* 基因对热休克基因的表达调控作用^[11]. 该体系也已用于

一类奇异型扩散控制的折扣模型

刘坤会 秦明达^④ 陆传赉^{④*}

(北方交通大学理学院, 北京 100044; ④北京科学技术大学数学力学系, 北京 100083;

④北京邮电大学信息工程系, 北京 100876. * 联系人)

摘要 研究了一类状态为扩散过程的奇异型折扣费用随机控制模型, 其扩散过程的漂移系数和扩散系数都是非线性的. 这类模型实质性地推广了以往 Karatzas 等人所建立的对应模型. 文中采用了一些与以往不同的分析手法, 给出了该模型最佳控制存在的充要条件. 当最佳控制存在时, 它是状态过程对两条直线的瞬时反射.

关键词 随机控制 变分方程 奇异型随机控制

本文通过变分方程及随机分析的手段, 讨论了一类奇异型随机控制问题, 得出了最佳控制存在的充要条件.

研究热休克基因与支气管哮喘发病的关系^[12]. 因此, 本文报道的定量 RT-PCR 体系对热休克基因的基础及临床研究均具有广阔的应用前景.

致谢 本工作作为国家自然科学基金(批准号: 39570779)及国家“攀登”计划资助项目.

参 考 文 献

- 1 Lindquist S, Craig E A. The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet*, 1988, 22: 631~ 677
- 2 Nathan D F, Lindquist S. Mutational analysis of Hsp90 function: Interactions with a steroid receptor and protein kinase. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 3917~ 3925
- 3 Minowada G, Welch W J. Clinical implications of the stress response. *J Clin Invest*, 1995, 95: 3~ 12
- 4 Gress T M, Muller-Pillasch F, Weber C, et al. Differential expression of heat shock proteins in pancreatic carcinoma. *Cancer Res*, 1994, 54: 547~ 551
- 5 Bloch W. A biochemical perspective of the polymerase reaction. *Biochemistry*, 1991, 30: 2735~ 2747
- 6 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning —A Laboratory Manual*, 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 7 Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 1987, 162: 156~ 159
- 8 Chelly J, Kaplan J C, Maire P, et al. Transcription of dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissues. *Nature*, 1988, 333: 858~ 860
- 9 Hengen P N. Quantitative PCR: an accurate measure of mRNA? *TIBS*, 1995, 20: 476~ 477
- 10 Hickley E, Brandon S E, Smale G, et al. Sequence and regulation of a gene encoding a human 89 kilodalton heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 2615~ 2626
- 11 王艳林, 沈珥珩, 梅树恩, 等. 热休克蛋白 90 β 参与热休克基因的表达调控. *科学通报*, 1996, 41(18): 1699~ 1702
- 12 姚 彬, 佟万成, 朱元珏, 等. 热休克蛋白 70, 90 基因在糖皮质激素抵抗型哮喘患者血单个核细胞中的表达. *中华结核和呼吸杂志*, 1998, 21: 289~ 292

(1999-02-05 收稿, 1999-05-10 收修改稿)

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/csb1999-44-18-1928>