

· 技术与方法 ·

SYBR 实时荧光定量 PCR 检测人乳腺癌细胞 Annexin II mRNA 方法的建立及应用*

郭变琴, 黄学梅, 吴立翔[△]
(重庆市肿瘤研究所检验科 400032)

摘要:目的 建立检测人 Annexin II mRNA 水平的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法, 并用其测定人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 中 Annexin II mRNA 水平。方法 根据人 Annexin II mRNA 的保守序列设计特异性引物, 提取人乳腺癌细胞总 RNA, 并逆转录为 cDNA, 胶回收纯化 PCR 产物, 并与 pGM-T 载体连接构建质粒标准品, 进一步通过 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测人乳腺癌细胞中 Annexin II mRNA 水平。结果 该方法标准曲线的 r^2 为 0.997, 融解曲线分析显示单个峰, pGM-T Annexin II 质粒标准品高、低拷贝数的批内、批间变异系数分别为 6.2%、7.8% (高拷贝) 和 9.1%、12.3% (低拷贝)。进一步研究表明人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 Annexin II mRNA 水平显著高于 MCF-7 细胞 ($P < 0.01$)。结论 建立的检测人 Annexin II mRNA 水平的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法特异性、重复性好, 可用于人乳腺癌细胞中 Annexin II mRNA 的定量检测。

关键词: 乳腺肿瘤; Annexin II; SYBR Green 实时荧光定量 PCR

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2014.18.021

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)18-2323-03

Establishment and application of SYBR real time fluorescence quantitative PCR for detecting Annexin II mRNA of human breast cancer cells*

Guo Bianqin, Huang Xuemei, Wu Lixiang[△]

(Department of Clinical Laboratory, Chongqing Cancer Institute, Chongqing 400032, China)

Abstract: Objective To establish a SYBR Green based real-time fluorescence quantitative PCR method for detecting human Annexin II mRNA expression, and to detect the level of Annexin II mRNA in human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. Methods The specific primers were designed according to the conserved sequence of human Annexin II gene. Total RNAs were extracted from human breast cancer cells (MCF-7, MDA-MB-231), then RNAs were transcribed reversely into cDNAs. The plasmid standards were constructed. The relative expression levels of human Annexin II mRNA in human breast cancer cells were detected by this method. Results The square (r^2) of correlation coefficient of the standard curve in this method was 0.997, the melting curve analysis showed the single peak. The the intra-batch and inter-batch variable coefficients in the pGM-T Annexin II plasmid standard substance were 6.2%, 7.8% and 9.1%, 12.3% respectively. The further study indicated that Annexin II mRNA in MDA-MB-231 was higher than that in MCF-7 ($P < 0.01$). Conclusion The established SYBR Green real time fluorescence quantitative PCR method for detecting human Annexin II is of good specificity and repeatability and can be used for quantitatively detecting Annexin II mRNA in breast cancer cells.

Key words: breast neoplasms; Annexin II; SYBR Green real time fluorescence quantitative PCR

Annexin II 最早是作为 Rous 肉瘤病毒转化基因的酪氨酸激酶底物于 1982 年被发现的, 属于 Annexins 蛋白家族成员之一, 是一种 Ca^{2+} 依赖的磷脂结合蛋白^[1]。目前研究表明, Annexin II 在多种恶性肿瘤中呈高表达^[2-4]。本课题拟建立一种检测人 Annexin II mRNA 的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法, 进一步检测人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 及 MCF-7 中 Annexin II mRNA 水平, 为深入研究 Annexin II 在乳腺癌中的功能作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 乳腺癌细胞系 MDA-MB-231 细胞株、MCF-7 细胞株 (中科院上海细胞研究所); RNA rose 提取试剂盒、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒 (上海华舜生物制品公司); 逆转录 PCR (RT-PCR), SYBR 实时荧光定量 PCR 试剂盒 (Takara 公司); Annexin II、 β -actin 引物 (Invitrogen 公司); PGM-T (TIAGEN 公司); AMP (上海闪晶公司); RPMI-1640 和小牛血清 (Gibco 公司)。

1.1.2 引物设计 根据 Annexin II (gi: 15426612, gi: 50845387, gi: 5084538, gi: 50845389), β -actin (gi: 28251) 序列, 在其高保守区应用 Primer5.0 软件设计各自的引物, Annexin II 引物序列, 正向引物: 5'-ACT TTG ATG CTG AGC GGG ATG-3', 反向引物: 5'-CGA AGG CAA TAT CCT GTC TCT GTG-3', 扩增长度为 126 bp; β -actin 引物序列: 正向引物: 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TGG ACA TC-3'; 反向引物: 5'-CAG GAG GAG CAA TGA TCT TGA TC-3', 扩增长度为 156 bp。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞 MDA-MB-231、MCF-7 接种于含 10% 小牛血清, pH 为 7.4 的 RPMI1640 培养基中, 置 37 °C, 5% CO_2 培养箱中培养, 取对数生长期进行实验。

1.2.2 总 RNA 的提取和 RT-PCR 反应 取对数生长期的细胞, 其融合达到 90%, 每瓶 (25 cm^2) 加入 RNA rose 1 mL 充分吹打, 冰上裂解 30 min 转移至 1.5 mL EP 管中, 按 RNA rose 提取试剂盒说明进行, 核酸紫外分析仪检测 RNA 纯度和浓度。逆转录得到 cDNA 第一链, 分装置于 -20 °C 冰箱备用。

* 基金项目: 重庆市自然科学基金资助项目 (2006BB5427)。 作者简介: 郭变琴 (1979-), 硕士, 主管检验师, 主要从事乳腺癌方面的研究。

[△] 通讯作者, Tel: (023)65330078, E-mail: WLX124610@yahoo.com.cn。

50 μL PCR 反应的体系为:10 \times PCR 缓冲液 5 μL ,dNTP Mixture:2 μL ,正向引物:0.5 μL ,反向引物:0.5 μL ,反转录液:5 μL ,Taq 酶:0.5 μL ,双蒸水:36.5 μL ,Annexin II, β -actin 的反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 17 s,30 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。

1.2.3 目的片段的纯化及 T-A 克隆

1.2.3.1 目的片段的纯化 将 50 μL 的 PCR 产物全部上样电泳,在紫外灯下将目的条带切下并按说明书进行胶回收。回收的纯化产物再电泳鉴定其纯化效果,另取 5 μL 用核酸分析仪测浓度。

1.2.3.2 T-A 克隆 10 \times 连接缓冲液 1 μL ,pGM-T 载体 1 μL ,T4 DNA 连接酶 1 μL ,目的片段的纯化产物 0.25 μL H₂O;6.75 μL 用移液器吹打连接反应液,混匀,置 16 $^{\circ}\text{C}$ 7 h。

1.2.4 感受态细胞的制备及转化 采用 CaCl₂ 法制得感受态细胞 DH5 α ,取 1 管感受态细胞(200 μL),加入 10 μL T-A 克隆产物进行转化,在转化后的 200 μL 大肠埃希菌混合液中加入 1 mL LB 液体培养基(不含氨苄西林),混匀后,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 1 h,将此菌液摇匀后取 100 μL 涂布于含氨苄西林(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 固体培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱培养过夜。

1.2.5 阳性克隆的鉴定

1.2.5.1 菌落 PCR 挑数个单菌落分别溶于 10 μL 无菌水中,在 PCR 仪内 99 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min 裂解细菌,12 000 r/min 离心 1 min,分别取上清 2 μL 做模板,用 Annexin II 引物进行 PCR 扩增,电泳检测是否有目的片段。

1.2.5.2 测序 挑产生目的片段的单菌落接种于 2 mL LB(含氨苄西林)液体培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,取 1 mL 放入 EP 管内送上海生工测序。

1.2.6 质粒定量及稀释

1.2.6.1 质粒的定量 测序结果证实为 Annexin II 片段成功克隆至 PGM-T 载体后,按照上海华顺质粒抽提试剂盒说明大量制备质粒,以质粒为模板,用 Annexin II 引物进行验证。用核酸分析仪检测 3 次抽提质粒的浓度,并取平均值,采用公式:质粒浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$) $\times 6.02 \times 10^{23} \times 10^{-9} / [\text{载体碱基}(3012) + \text{目的片段碱基}(252) \times 324.5]$,得出 PGM-7-Annexin II 的浓度(拷贝/ μL)。

1.2.6.2 质粒的稀释 用双蒸馏水将重组 Annexin II 质粒标准品原液作梯度稀释,用于后续 Annexin II mRNA 定量。

1.2.7 特异性的评价 将标准品及乳腺癌细胞 cDNA 的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,并分析实时荧光定量 PCR 的溶解曲线,验证该方法的特异性。

1.2.8 重复性的分析 以 PGM-T Annexin II 质粒标准品相对低拷贝数(10^4 拷贝/ μL)和相对高拷贝数(10^7 拷贝/ μL)在批内和批间均重复检测 10 次作为重复性实验,获取各自的变异系数。

1.2.9 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测人乳腺癌细胞中 Annexin II mRNA 水平 20 μL 的 PCR 反应体系:SYBR premix ExTaqTM(2 \times)10.0 μL ,正向引物:0.3 μL ,反向引物:0.3 μL ,RoxDye(50 \times)0.4 μL ,cDNA:2.0 μL ,dH₂O:7.0 μL 。95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,1 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,62 $^{\circ}\text{C}$ 31 s,40 个循环,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,1 个循环,ABI7000PCR 仪检测标准品 Annexin II 的线性范围及人乳腺癌细胞中 Annexin II mRNA 水平。

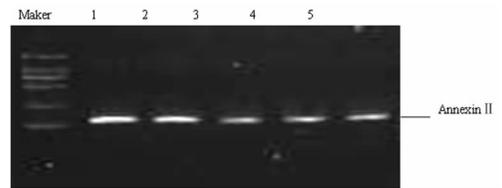
1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件行相关数据分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数的比较采用 t 检验,以 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RNA 质量 核酸分析仪测抽提总 RNA 吸光度比值

(A260/A280)在 1.8~2.0 之间,提示总 RNA 纯度较好,总 RNA 浓度为 1 000~2 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.2 RT-PCR 扩增乳腺癌细胞中 Annexin II mRNA RT-PCR 检测人乳腺癌细胞中 MCF-7 及 MDA-MB-231 中 Annexin II mRNA,产物电泳显示清晰的目的条带。所有产物均上样电泳,纯化、回收,Annexin II 浓度为 56.4 $\text{ng}/\mu\text{L}$,见图 1。



marker: 标记物;1,2;MDA-MB-231;3,4,5;MCF-7。

图 1 RT-PCR 检测 MCF-7、MDA-MB-231 中 Annexin II mRNA 水平

2.3 阳性克隆的鉴定

2.3.1 菌落 PCR 细菌经高温裂解后,用 Annexin II 引物进行 PCR,产物电泳显示清晰的目的条带,见图 2。

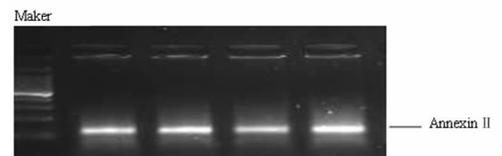


图 2 PCR 检测菌落 Annexin II mRNA

2.3.2 菌落测序结果 产生目的片段的单菌落测序结果显示:所测 Annexin II 序列与目的片段序列完全相同,见图 3。

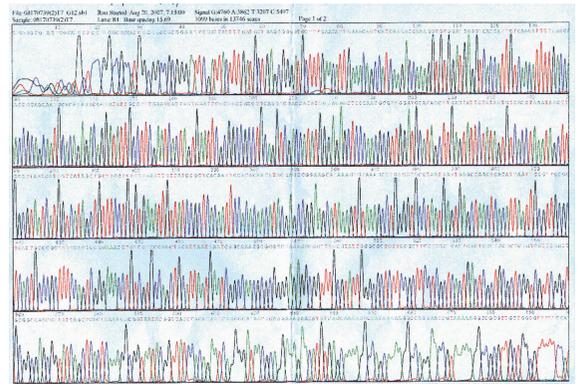


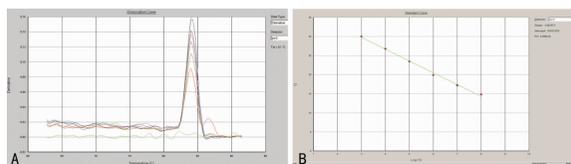
图 3 Annexin II 阳性克隆菌落测序结果

2.4 质粒的定量及稀释 以含 Annexin II 质粒为模板,使用 Annexin II 的引物进行 PCR 扩增,产物电泳显示清晰的目的条带,表明 Annexin II 片段成功克隆至 PGM-T 载体上,可用于标准品的制备。PGM-T-Annexin II 质粒浓度:136 $\text{ng}/\mu\text{L}$,通过公式计算得出,PGM-T-Annexin II 质粒原液浓度为 7.72×10^{10} 拷贝/ μL ,用双蒸馏水将 PGM-T-Annexin II 标准品原液作梯度稀释,稀释后为 7.72×10^9 、 7.72×10^8 、 7.72×10^7 、 7.72×10^6 、 7.72×10^5 、 7.72×10^4 、 7.72×10^3 、 7.72×10^2 拷贝/ μL 。

2.5 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测 Annexin II 溶解曲线和标准曲线

2.5.1 溶解曲线 主要呈单个溶解曲线峰,表明定量 PCR 产物 Annexin II 具有特异性,见图 4A。

2.5.2 标准曲线 成功地建立了人 Annexin II mRNA 的标准曲线,其线性范围可达 6 个数量级,重组质粒 Annexin II 在 $7.72 \times 10^3 \sim 7.72 \times 10^8$ 拷贝/ μL ,Ct 值与起始浓度的 lg 值具有很好的线性(slope = -3.09, $r^2 = 0.997$)。见图 4B。



A: PGM-T Annexin II 溶解曲线; B: PGM-T Annexin II 标准曲线。

图 4 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测 Annexin II mRNA 的标准曲线和溶解曲线

2.6 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测 Annexin II mRNA 标准品的重复性 PGM-T Annexin II 质粒标准品相对低拷贝数 (10^4 拷贝/ μL) 批内和批间变异系数分别为 9.1%、12.3%; PGM-T Annexin II 质粒标准品相对高拷贝数 (10^7 拷贝/ μL) 批内和批间变异系数分别为 6.2%、7.8%。

2.7 Annexin II mRNA 在人乳腺癌细胞中的水平 高转移人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 Annexin II mRNA 水平显著高于低转移人乳腺癌细胞 MCF-7 ($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 Annexin II mRNA 在人乳腺癌细胞中的水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

细胞株	Annexin II	β -actin	Annexin II/ β -actin
MCF-7	$(19.23 \pm 0.60) \times 10^3$	$(4.74 \pm 0.71) \times 10^8$	$(4.06 \pm 0.81) \times 10^{-5}$
MDA-MB-231	$(2.75 \pm 0.02) \times 10^7$	$(2.42 \pm 0.07) \times 10^8$	0.11 ± 0.03^a

^a: $P < 0.01$, 与 MCF-7 比较。

3 讨论

Annexin II 又名 P36、ANX2, 其基因位于 15q21~q22, 编码的蛋白有 339 个氨基酸, 相对分子质量 36×10^3 , 在人体内皮细胞、单核/巨噬细胞、骨髓细胞和某些肿瘤细胞中表达丰富^[1]。并参与多种重要的生物学功能, 如细胞分泌、增殖、有丝分裂和纤溶等^[5-7], 但其确切的作用机制尚不十分清楚; 此外, Annexin II 还是一种新颖的 RNA 结合蛋白, 能直接结合到 C-myc mRNA 上, 并上调 C-myc 蛋白^[8]。研究表明, Annexin II 在多种肿瘤中高表达: 在结肠癌中, Annexin II 过表达与肿瘤的大小、组织学类型、浸润程度及 TNM 分期相关, 与转移性无关, 但和 TenascinC 的共同表达却与结肠癌的进展和转移相关, 并提示预后不良^[2]; 此外, 有研究发现 Annexin II 蛋白的表达水平与星形细胞瘤恶性程度的分级相关, 恶性程度越高, 表达水平越高, 可以作为胶质瘤分级的指标, 提示预后^[9]。但 Annexin II 并非在所有肿瘤中均呈现高表达状态, 相反, Annexin II 在某些肿瘤中表达下调, 如: 前列腺癌^[10]、食管癌^[11], 转染 Annexin II 基因的前列腺癌细胞恢复表达, 对肿瘤细胞的增殖和凋亡无影响, 但迁移能力被抑制; Annexin II mRNA 和蛋白在人食管鳞状细胞癌组织中低表达, 在中分化和低分化肿瘤中, 蛋白表达明显低于高分化肿瘤。

Sharma 等^[12] 研究报道 Annexin II 在正常和增生的乳腺导管上皮细胞 Annexin II 无表达, 而乳腺浸润性导管癌和原位癌中有表达。据此, 推测 Annexin II 在乳腺癌的发生中可能起着重要作用。本课题拟建立一种检测人 Annexin II mRNA 的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法, 为进一步深入探讨 Annexin II 在乳腺癌发生中的作用奠定基础。PGM-T Annexin II 质粒标准品在 $10^3 \sim 10^8$ 拷贝/ μL , 标准曲线的 $r^2 = 0.997$, 说明该方法的线性较好; 此外, 溶解曲线呈单个峰, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 只有目的基因而无引物二聚体等非特异性扩增产物, 说明该方法的特异性较好; 另外, 重复性分析显示: 批内和批间的变异系数均在可接受的范围内。因此, 本研究建立的检测人

Annexin II mRNA 的 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 方法特异重复性好, 能够准确检测 Annexin II mRNA 的含量。本研究应用成功构建的 Annexin II 质粒标准品, 通过 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测人乳腺癌细胞高转移株 MDA-MB-231 与低转移株 MCF-7 中 Annexin II mRNA 水平, 结果显示: MDA-MB-231 中 Annexin II mRNA 显著高于 MCF-7, 由此作者推测 Annexin II 可能在乳腺癌的转移中起一定作用, 这将在进一步的研究中加以证实。

参考文献:

- [1] 萧笑, 王元, 张思河. 钙依赖性磷脂结合蛋白 Annexin II 的研究进展[J]. 第四军医大学学报, 2007, 23(6): 570-573.
- [2] Emoto K, Yamada Y, Sawada H, et al. Annexin II overexpression correlates with stromal tenascin-C overexpression; a prognostic marker in colorectal carcinoma [J]. Cancer, 2001, 92(6): 1419-1426.
- [3] Frohlich M, Motté P, Galvin K, et al. Enhanced expression of the protein kinase substrate p36 in human hepatocellular carcinoma [J]. Mol Cell Biol, 1990, 10(6): 3216-3223.
- [4] Emoto K, Sawada H, Yamada Y, et al. Annexin II overexpression is correlated with poor prognosis in human gastric carcinoma [J]. Anticancer Res, 2001, 21(2B): 1339-1345.
- [5] Vellucci VF, Germino FJ, Reiss M. Cloning of putative growth regulatory genes from primary human keratinocytes by subtractive hybridization [J]. Gene, 1995, 166(2): 213-220.
- [6] Tomas A, Futter C, Moss SE. Annexin II is required for midbody formation and completion of the terminal phase of cytokinesis [J]. J Cell Biol, 2004, 165(6): 813-822.
- [7] Díaz VM, Hurtado M, Thomson TM, et al. Specific interaction of tissue-type plasminogen activator (t-PA) with annexin II on the membrane of pancreatic Cancer cells activates plasminogen and promotes invasion in vitro [J]. Gut, 2004, 53(7): 993-1000.
- [8] Filipenko NR, Macleod TJ, Ycon CS, et al. Annexin a2 is a novel RNA-binding protein [J]. Biol Chem J, 2004, 279(10): 8723-8731.
- [9] Roseman BJ, Bolen A, Hsu J, et al. Annexin II marks astrocytic brain tumors of high histologic grade [J]. Oncol Res, 1994, 12(6): 561-567.
- [10] Lehnigk U, Zimmermann U, Woenckhaus C, et al. Localization of annexins I, II, IV and VII in whole prostate sections from radical prostatectomy patients [J]. Histol Histopathol, 2005, 20(3): 673-680.
- [11] 张洵, 支会英, 张健, 等. 钙磷脂结合蛋白 II 在人食管鳞状细胞癌中的表达 [J]. 中华肿瘤杂志, 2003, 25(4): 353-355.
- [12] Sharma MR, Koltowski L, Ownbey RT, et al. Angiogenesis-associated protein annexin II in breast Cancer; selective expression in invasive breast Cancer and contribution to tumor invasion and progression [J]. Exp Mol Pathol, 2006, 81(2): 146-156.

(收稿日期: 2014-01-12 修回日期: 2014-03-12)