

· 实验研究 ·

荧光定量 RT-PCR 检测神经母细胞瘤细胞 *MYCN* 基因 mRNA 的表达

冯晨,唐锁勤,王建文,刘立真,高晓宁,龙卉

(中国人民解放军总医院小儿内科,北京 100853)

[摘要] 目的 *MYCN* 基因表达对神经母细胞瘤的治疗及预后评估有指导意义,目前国内对于 *MYCN* 基因 mRNA 的定量检测未见报道,该研究拟采用 SYBR 绿色荧光染料 I (SYBR GREEN I) 实时检测的逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法,检测神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 细胞 *MYCN* 基因 mRNA 的表达,并对其可行性及实用性进行研究,力争探索出微量瘤标本的 *MYCN* 基因 mRNA 定量检测的可行方法。方法 提取神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 细胞总 RNA,采用 SYBR GREEN I 实时检测的 RT-PCR 检测其 *MYCN* 基因 mRNA 的表达,并用 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为内参照,将 *MYCN* 基因的 mRNA 拷贝数与 GAPDH 的拷贝数相除,结果为单细胞 *MYCN* 基因 mRNA 的表达水平。结果 反应标准曲线有良好的相关性 ($R^2 > 0.99$), PCR 产物特异,神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 *MYCN* 基因 mRNA 的表达水平为 17.4 ± 1.2 。结论 只要严格控制 PCR 反应条件,SYBR GREEN I 定量 RT-PCR 法可以作为一种良好的定量 PCR 方法对神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 *MYCN* 基因 mRNA 的表达进行检测,此方法为临床微量神经母细胞瘤组织的 *MYCN* 基因 mRNA 的定量检测提供了可能。

[中国当代儿科杂志,2007,9(1):47-50]

[关键词] 神经母细胞瘤;*MYCN*;荧光定量 RT-PCR;绿色荧光染料 I

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)01-0047-04

Detection of *MYCN* mRNA in neuroblastoma cell lines by quantitative RT-PCR

FENG Chen, TANG Suo-Qin, WANG Jian-Wen, LIU Li-Zhen, GAO Xiao-Ning, LONG Hui. Department of Pediatrics, People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China (Tang S-Q, Email: suoqin@yahoo.com)

Abstract: **Objective** To examine the feasibility and practicability of quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) with SYBR GREEN I fluorescence for detecting the *MYCN* mRNA expression in neuroblastoma cell line LA-N-5. **Methods** *MYCN* mRNA expression in LA-N-5 cells was measured using real time RT-PCR with SYBR GREEN I. Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as internal control. The level of the *MYCN* mRNA was calculated as *MYCN* copies/GAPDH copies. **Results** Standard curves were linear and showed high correlations ($R^2 > 0.99$). The ratio of *MYCN* mRNA copies to GAPDH mRNA copies was calculated based on specific PCR products. The *MYCN* mRNA level in LA-N-5 cells was obtained (17.4 ± 1.2). **Conclusions** Quantitative RT-PCR with SYBR GREEN I fluorescence may be a sensitive and reliable method for detecting the *MYCN* mRNA expression. It may also be potential applicable for detecting the *MYCN* mRNA expression in the small amount neuroblastoma tissues.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(1):47-50]

Key words: Neuroblastoma; *MYCN*; Quantitative RT-PCR; SYBR GREEN I

神经母细胞瘤 (neuroblastoma, NB) 是起源于神经嵴细胞的恶性肿瘤,发病率在儿童恶性肿瘤中位居第四位^[1]。该肿瘤恶性程度高,晚期病例虽经强烈化疗、放疗及生物治疗其 4 年无病生存率也仅 29.2%^[2]。对其预后因素的分析会给治疗带来极大的指导作用。大量研究显示在决定预后的因素中

MYCN 基因占据重要地位,*MYCN* 基因超量表达时,预后不良;反之 *MYCN* 基因一般表达时预后较好^[3]。研究证实在神经母细胞瘤患者中 *MYCN* 基因 DNA 水平的拷贝与 mRNA 水平没有绝对的相关性^[4],多数 *MYCN* 基因无 DNA 水平超量表达而 mRNA 水平超量表达的晚期 NB 患者预后依然较差^[5]。

[收稿日期] 2006-06-30; [修回日期] 2006-11-10

[基金项目] 国家自然科学基金 (编号 30471802)

[作者简介] 冯晨,男,硕士,主治医师。主攻方向:儿童血液、肿瘤疾病。

[通讯作者] 唐锁勤,教授,解放军总医院小儿内科,邮编:100853。

故对 *MYCN* 基因 mRNA 表达进行定量研究是非常重要的。目前国内文献对于 *MYCN* 基因 mRNA 的定量检测还未见报道,近来 SYBR 绿色荧光染料 I (SYBR GREEN I) 技术作为一种新的定量 PCR 技术,可以对任何基因 PCR 过程进行实时的监测,对微量组织进行准确的定量 PCR 分析^[6],我们对 *MYCN* 基因 mRNA 的检测提供了可能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞培养 神经母细胞瘤细胞系 LAN-5 由美国洛杉矶儿童医院 Stuart Elliott Siegel 教授惠赠。采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养、传代。实验用对数生长期细胞,台盼蓝拒染率在 95% 以上。

1.1.2 主要试剂和仪器 TRIZOL REAGENT (Life Technology 公司,美国)、M-MLV 逆转录酶 (Life Technology 公司,美国)、PCR 试剂 (TaKaRa 公司,日本)、PCR 产物纯化柱 (Q-Bio gene 公司,美国)、SYBR GREEN I 染料 (Molecular Probes 公司,美国)、iCycler 荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 神经母细胞瘤细胞总 RNA 的提取和 cDNA 的合成 收集 10⁶ 细胞于 EP 管中,使用 TRIZOL 试剂,按照说明书进行总 RNA 的提取。紫外分光光度计定量。取 5 μg 的总 RNA,用 M-MLV 逆转录酶,按照其说明书进行 cDNA 的合成, - 20℃ 保存。

1.2.2 PCR 标准品的制备 将扩增完毕的 PCR 产物进行 2% 琼脂糖电泳。将特异的片段切下,采用 PCR 产物纯化柱纯化 PCR 产物。紫外分光光度计定量后,根据公式: $\text{Copies/mL} = 6.02 \times 10^{23} \times C \times \text{OD}_{260} / \text{MWt}$, 其中 $C = 5 \times 10^{-5} / \text{mL}$ 、MWt = PCR 产物的分子量 (碱基数 $\times 6.58 \times 10^2$)、OD₂₆₀ 是在 260 nm 的吸光度值,将标准品稀释到 10⁸ 拷贝/μL, 4℃ 保存。

1.2.3 引物 *MYCN* 基因上游引物 5'-CTCAG-TACCTCCGGAGAG-3', 下游引物 5'-GGCATCGTTT-GAGGATC-3', 靶片段 177 bp; *GAPDH* 基因上游引物 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3', 下游引物 5'-GGCATGGAC TGTGCTCATGAG-3', 靶片段 87 bp。引物由北京赛百盛公司合成。

1.2.4 实时定量 PCR SYBR GREEN I 原液存储在二甲基硫氧化物 (DMSO) 中,初始浓度为 10 000 倍,将其稀释为 50 倍作为工作液,分装后,

- 20℃ 避光保存。

MYCN、*GAPDH* 反应体系 (总体积 25 μL): 逆转录反应产物 1.0 μL; SYBR GREEN I 0.25 μL; 10 × PCR Buffer (含 MgCl₂ 25 mM) 2.5 μL; dNTP mixture (each 2.5 μmol/L) 1.5 μL; 上、下游引物各 0.5 μL; TaKaRa Taq (5 U/μL) 0.25 μL; 灭菌蒸馏水 18.5 μL。*MYCN* 反应条件: 95℃ 45 s, 退火: 64℃ 45 s, 延伸: 72℃ 45 s, 检测荧光: 78℃ 5 s; 共 40 个循环, 循环结束后继续于 72℃ 延伸 10 min; *GAPDH* 反应条件: 变性: 95℃ 25 s, 退火: 58.5℃ 25 s, 延伸: 72℃ 20 s, 检测荧光: 78℃ 5 s; 共 40 个循环, 循环结束后继续于 72℃ 延伸 10 min。

1.2.5 建立标准曲线 选取纯化好的标准品,从 10⁸ 倍比稀释至 10⁴, 每个标准品做 3 管 PCR 反应体系。

1.2.6 数据的收集及统计学的处理 数据的收集主要由 iCycler 自带软件完成。通过软件可以计算出所有标准品和样本的起始循环数 (CT), 并且根据标准品 CT 值绘制出标准曲线, 由标准曲线计算出样本的初始拷贝数。单细胞 *MYCN* 基因 mRNA 表达水平为 *MYCN* 总拷贝 / *GAPDH* 总拷贝。重复 5 次独立实验, 采用 SPSS10.0 统计软件统计 5 次结果的均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 此为神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5 *MYCN* 基因 mRNA 的表达水平。

2 结果

2.1 PCR 产物电泳结果

图 1 示 *MYCN* 1~3 分别为 3 次扩增的结果, 在 177 bp 附近有特异性条带, 未见明显引物二聚体, 阴性对照无表达。图 2 示 *GAPDH* 1~3 分别为 3 次扩增的结果, 在 87 bp 附近有特异性条带, 未见明显引物二聚体, 阴性对照无表达。

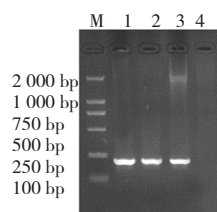


图 1 *MYCN* PCR 产物电泳

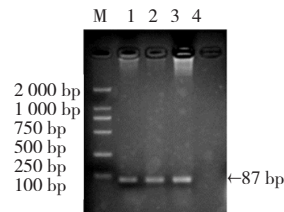


图 2 *GAPDH* PCR 产物电泳

M: DL-2000 DNA 分子量 Marker; 1~3: 不同样品的 PCR 产物, 4: 阴性对照。

2.2 SYBR, GREEN I, 敏感度的检测及各样本的检测

SYBR、GREEN I 可以检测 5×10^3 以上拷贝数的基因,并可以保证良好的线性关系,阴性对照在 38 个循环以上才可以检测到荧光。结果见表 1。

表 1 SYBR、GREEN I 灵敏度的检测

检测项目	敏感性	阴性对照 (Ct)	拷贝数		
			10^4	10^6	10^8
GAPDH	$\leq 5\,000$ 拷贝数	> 38	31 ± 1.2	24 ± 0.8	16 ± 0.5
MYCN	$\leq 5\,000$ 拷贝数	> 38	31 ± 0.9	24 ± 0.5	16 ± 0.3

2.3 反应曲线

见图 3,4。

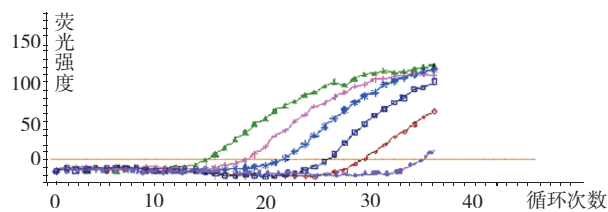


图 3 MYCN Q RT-PCR 扩增曲线(由上至下依次为 10^8 - 10^4 拷贝和空白对照),空白对照 38 个循环后才可以检测到荧光。

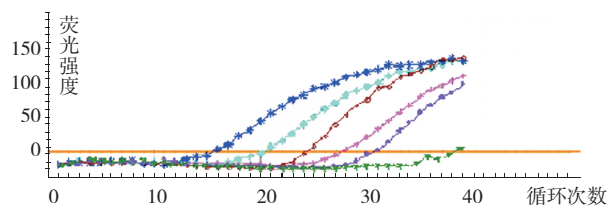


图 4 GAPDH Q RT-PCR 扩增曲线(由上至下依次为 10^8 - 10^4 拷贝和空白对照)空白对照 38 个循环后才可以检测到荧光。

2.4 实时检测曲线

MYCN Q RT-PCR 检测曲线:标准曲线有良好的相关性,相关系数为 0.994,回归方程为: $Y = -3.766X + 45.703$ (Y 为 Ct 值,X 为拷贝数对数值)。见图 5。

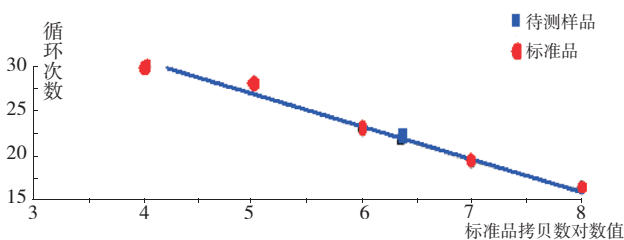


图 5 MYCN Q RT-PCR 检测曲线

GAPDH Q RT-PCR 检测曲线标准曲线有良好的

相关性,相关系数为 0.995,回归方程为: $Y = -3.721X + 45.354$ (Y 为 Ct 值,X 为拷贝数对数值)。见图 6。

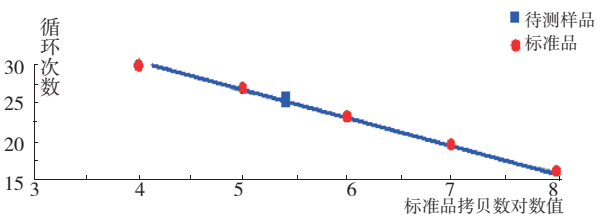


图 6 GAPDH Q RT-PCR 检测曲线

2.5 MYCN 基因 mRNA 表达水平计算

分别提取 5 次 LA-N-5 细胞的总 RNA,并进行定量 RT-PCR 检测 MYCN、GAPDH 基因 mRNA 拷贝数,单细胞 MYCN mRNA 表达水平为 MYCN 总拷贝 / GAPDH 总拷贝,统计 5 次结果,神经母细胞瘤细胞系 LA-N-5MYCN mRNA 表达水平为 17.4 ± 1.2 。见表 2。

表 2 荧光定量 RT-PCR 检测神经母细胞瘤 MYCN mRNA 表达

分类	1	2	3	4	5
MYCN	6.69×10^6	4.35×10^6	1.18×10^6	3.68×10^6	4.36×10^6
GAPDH	4.13×10^5	2.62×10^5	6.89×10^4	1.98×10^5	2.33×10^5
MYCN / GAPDH	16.2	16.6	16.9	18.6	18.7

3 讨论

由于技术的限制,既往只能对 mRNA 进行粗略的半定量的 RT-PCR 分析,而 Northern blot 杂交,又有样本需要量大、操作复杂的缺点。一般情况下,Northern blot 需要 RNA 量至少 $5\,\mu\text{g}$ [7]。随着科学技术的发展,定量 PCR 技术实现了对微量组织进行基因表达的定量分析。SYBR GREEN I 的定量 PCR 技术每次反应仅需 10~50 pg 的总 RNA 或更少,这就为一些 RNA 量很少的样本的定量分析提供了可行的方法。

PCR 反应体系是决定检测成功的关键。首先,引物设计的长度最好在 300 bp 以内,以增加扩增效率,减少非特异性产物,为结果的可靠性提供基础。其次,引物和 Mg^{2+} 浓度也对结果有很大影响,合适的引物浓度可以减少引物二聚体的生成;同时 Mg^{2+} 浓度是决定产物特异性的关键。再次,Taq 酶的质量对 PCR 扩增效率也有影响,对一些低拷贝的基因,优质的 Taq 酶更易于提高扩增效率,优化反应条件。

SYBR GREEN I 的定量 PCR 技术检测的敏感性与基因表达量相关,一般可检测 10^3 拷贝的基因。本实验中可以达到 10^3 拷贝水平的检测。这为细针穿刺活检病人提供了术前检测的可能。对于更低拷贝的基因,在 PCR 反应效率高的情况下,也可以检测到 10 拷贝的基因。但是在这种情况下,由于拷贝数低,引物二聚体也会增加,因此,须选择比 PCR 产物低 $1 \sim 2^\circ\text{C}$ 的温度作为检测荧光的温度,在此温度下引物二聚体为单链,不与 SYBR GREEN I 结合,不会发出荧光,而 PCR 产物的荧光可被检测,从而排除引物二聚体的影响^[8]。

用荧光定量 RT-PCR 方法为制定和统一 *MYCN* mRNA 超量表达的阈值标准,提供了一个新的思路。用绝对的总 *MYCN* 拷贝数与管家基因 *GAPDH* 的绝对数值比来表示,这种定量显然更准确,容易统一标准,这一指标不会因不同的实验室而改变。目前国内对于 *MYCN* 基因 mRNA 超量表达的检测尚属空白,开展 *MYCN* 基因 mRNA 超量表达的检测对于评价 NB 的预后,尤其在 *MYCN* 基因无 DNA 水平超量表达的晚期 NB 患者指导化疗强度、预后评价等均有重要意义。

本实验采用的细胞系 LA-N-5 是从人神经母细胞瘤骨髓转移之细胞中分离得到的细胞株,恶性度高,*MYCN* 基因 DNA 拷贝水平表达很高^[9],建立的 SYBR 绿色荧光染料 I 实时定量 RT-PCR 检测体系可以准确定量该细胞系中 *MYCN* 基因 mRNA 的表达,但采用荧光定量 RT-PCR 方法判定 *MYCN* mRNA 超量表达的阈值标准,尚需结合临床进行大量标本的检测后才能得出。

[参 考 文 献]

- [1] Kravetska JM, Li L, Bielawski J, Obeid LM, Ogretmen B. Involvement of endogenous ceramide in the inhibition of telomerase activity and induction of morphologic differentiation in response to all-trans-retinoic acid in human neuroblastoma cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2003, 419(2): 110-119.
- [2] 唐锁勤,黄东生,王建文,冯晨,杨光. 大剂量化疗造血干细胞移植治疗Ⅵ期神经母细胞瘤的长期疗效研究[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(2):93-96.
- [3] Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, et al. Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas[J]. N Engl J Med, 1985, 313(18):1111-1116.
- [4] Alaminos M, Mora J, Cheung NK, Smith A, Qin J, Chen L, Gerald WL. Genome-wide analysis of gene expression associated with *MYCN* in human neuroblastoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(8): 4538-4546.
- [5] Cohn SL, London WB, Huang D, Katzenstein HM, Salwen HR, Reinhardt T, et al. *MYCN* expression is not prognostic of adverse outcome in advanced-stage neuroblastoma with nonamplified *MYCN* [J]. J Clin Oncol, 2000, 21(18): 3604-3613.
- [6] Simpson DA, Feeney S, Boyle C, Stitt AW. Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR[J]. Mol Vis, 2000, 6(10):178-183.
- [7] Rajeevan MS, Vernon SD, Taysavang N, Unger ER. Validation of arraybased gene expression profiles by real-time (Kinetic) RT-PCR[J]. J Mol Diagn, 2001, 3(1):26-31.
- [8] Morrison CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification[J]. Biotechniques, 1997, 22(1):130-138.
- [9] Reynolds CP, Wang Y, Melton LJ, Einhorn PA, Slamon DJ, Maurer BJ. Retinoic-acid-resistant neuroblastoma cell lines show altered MYC regulation and high sensitivity to fenretinide[J]. Med Pediatr Oncol, 2000, 35(6):597-602.

(本文编辑:吉耕中)