



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1891836 B

(45) 授权公告日 2010.04.21

(21) 申请号 200610093878.X

(22) 申请日 2000.10.31

(30) 优先权数据

09/469,338 1999.12.20 US

(62) 分案原申请数据

00817474.1 2000.10.31

(73) 专利权人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 凯瑟林·达南伯格 彼得·达南伯格

史蒂文·斯温森

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 张晓威

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

(56) 对比文件

US 5958693 A, 1999.09.28, 全文.

US 5654179 A, 1997.08.05, 全文.

FLINKE J ET AL. AN IMPROVED STRATEGY
AND A USEFUL HOUSEKEEPING GENE FOR RNA
ANALYSIS FROM FORMALIN-FIXED TISSUES BY
PCR. BIOTECHNIQUE 14 2. 1993, 14 (2), 448-453.

HIROKO SHIMIZU ET AL. "COMPARISON OF
METHODS TO DETECT ENTEROVIRAL GENOME IN
FROZEN AND FIXED MYOCARDIUM BY POLYMERASE
CHAIN REACTION. LABORATORY INVESTIGATION 71
4. 1994, 71 (4), 612-616.

审查员 温庭江

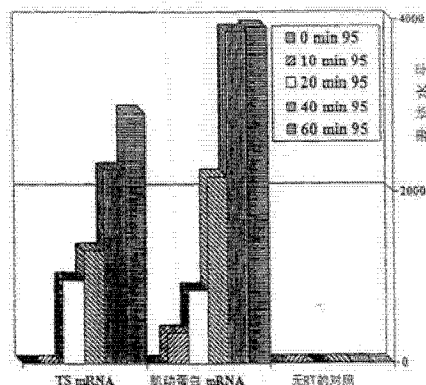
权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 4 页

(54) 发明名称

定量测量固定的石蜡包埋的组织样品中靶基因表达的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于定量测量固定的石蜡包埋的组织样品中靶基因的基因表达的方法。其包括：(a) 将所述样品脱蜡，以获得脱蜡样品；(b) 如下从所述脱蜡样品中分离 mRNA：首先将所述组织样品在包含有效浓度的离液剂的离液溶液中加热至约 50℃～约 100℃ 的温度并持续约 5 分钟～约 120 分钟的时间，并从所述离液溶液中回收所述 mRNA，以产生分离的 mRNA；和 (c) 用能够扩增所述靶基因 mRNA 的区域的一对寡核苷酸引物对所述分离的 mRNA 进行扩增，以获得扩增样品；(d) 测定来自所述分离的 mRNA 的靶基因 mRNA 的量与内控基因 mRNA 的量的比值。



1. 一种用于从福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品回收 DNA 或 RNA 的方法及其用途，其包括：

将所述样品在包含有效浓度的胍鎧化合物的离液溶液中加热至在 50 至 100℃ 范围内的温度，持续 5 至 120 分钟的时间；

从所述离液溶液中回收所述 RNA 或 DNA；和

对所述 RNA 进行反转录、反转录及聚合酶链反应、电泳、层析、或碎裂。

2. 权利要求 1 的方法，其还包括将所述样品脱蜡。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其还包括在加热前将所述样品再水化。

4. 权利要求 3 的方法，其还包括在加热前均化所述样品。

5. 权利要求 1-4 之任一项的方法，其用于从福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品中回收 RNA，其中通过用水不溶性有机溶剂提取而从所述离液溶液中回收所述 RNA。

6. 权利要求 5 的方法，其中所述水不溶性有机溶剂基本上由氯仿组成。

7. 权利要求 6 的方法，其还包括纯化所述 RNA。

8. 权利要求 7 的方法，其中通过乙醇沉淀法纯化所述 RNA。

9. 前述权利要求之任一项的方法，其中所述时间为 20 至 60 分钟。

10. 前述权利要求之任一项的方法，其中所述时间为 30 至 60 分钟。

11. 前述权利要求之任一项的方法，其中所述温度在 75 至 100℃ 的范围内。

12. 前述权利要求之任一项的方法，其中所述温度在 95 至 100℃ 的范围内。

13. 权利要求 1 或 2 的方法，其用于回收 RNA，其中所述胍鎧化合物选自盐酸胍和异硫氰酸胍。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述胍鎧化合物为异硫氰酸胍，其浓度为 2 至 5M。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述异硫氰酸胍的浓度为 4M。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述离液溶液的 pH 为 3 ~ 6。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述离液溶液的 pH 为 4。

18. 前述权利要求之任一项的方法，其中所述离液溶液还包含还原剂。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述还原剂选自 β -巯基乙醇和二硫苏糖醇。

20. 前述权利要求之任一项的方法，其中所述 RNA 用于测定靶基因的表达水平。

21. 前述权利要求之任一项的方法，其中对所述 RNA 进行反转录，并且标记这样产生的 cDNA。

22. 权利要求 21 的方法，其中将该标记 cDNA 用于基因芯片或微阵列分析中。

23. 一种用于定量测量靶基因的基因表达的方法，其包括通过任一前述权利要求所述的方法回收 RNA，还包括：

通过反转录反应将该经纯化的 RNA 转化为 cDNA；

使所述 cDNA 在聚合酶链反应溶液中进行 PCR 反应，所述聚合酶链反应溶液包含适于扩增至少指定序列的寡核苷酸探针、聚合酶及荧光染料；

测量作为所述 PCR 反应结果发生的荧光强度改变；和

基于所述荧光强度改变确定所述样品中存在的具有指定序列的核酸的量。

24. 一种用于测定福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品中靶基因表达水平的方法，其包括：

将所述组织样品脱蜡,以获得脱蜡样品;

如下从所述脱蜡样品中分离 mRNA:首先将所述脱蜡组织样品在包含有效浓度的胍鎓化合物的溶液中加热至在 50 至 100°C 范围内的温度,并从所述溶液中回收所述 mRNA;和测定相对于内控基因 mRNA 的量的靶基因 mRNA 的量。

25. 权利要求 24 的方法,其中所述内控基因为 β -肌动蛋白。

26. 权利要求 24 的方法,其中所述靶基因是胸苷酸合成酶(TS)。

定量测量固定的石蜡包埋的组织样品中靶基因表达的方法

[0001] 本申请是 2000 年 10 月 31 日提交的,题为“用于从福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品中分离 RNA 的方法”的中国专利申请 00817474.1 的分案申请。

[0002] 政府支持

[0003] 依照来自国家健康研究所的国家癌症研究所的资金号 R01CA71716,政府在本发明中享有某些权利。

技术领域

[0004] 本发明涉及从生物组织样品中纯化 RNA、DNA 和蛋白质。

背景技术

[0005] 组织中的基因表达水平的确定对于人疾病的准确诊断非常重要,并且越来越多地用于确定患者的治疗过程。药物遗传学方法能够鉴定对特定药物反应的患者,并且为新的治疗方法指明方向。

[0006] 例如,胸苷酸合成酶 (TS) 是 DNA 生物合成中的整合酶 (integral enzyme),它催化脱氧尿苷一磷酸 (dUMP) 还原甲基化为脱氧胸苷 - 磷酸 (dTTP),并且为细胞内的嘧啶核苷的从头合成提供唯一的途径 (Johnston 等,1995)。胸苷酸合成酶是化疗药,最常见是叶酸拮抗药 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) 的靶。作为最有效的结肠、头颈和乳腺癌治疗的单一药物,5-FU 的主要作用是阻断 TS 活性,导致细胞内胸腺嘧啶水平降低,随后导致细胞死亡。

[0007] 已报道,TS 表达在来自原发肿瘤 (Johnston 等,1995 ;Lenz 等,1995) 和转移肿瘤 (Farrugia 等,1997 ;Leichmann 等,1997) 的临床肿瘤样品中都有显著变化。例如在结肠直肠癌中,肿瘤组织中与正常胃肠粘膜组织的 TS 表达比为 2 至 10 (Ardalan 和 Zang,1996)。

[0008] 也已知胸苷酸合成酶在肿瘤耐药性的发展中具有临床重要性,研究证明,在暴露于 5-FU 后,肿瘤细胞中的 TS 蛋白的急性诱导和 TS 酶水平的增加 (Spears 等,1982 ;Swain 等,1989)。肿瘤对诸如 5-FU 的细胞毒性药物反应引起的急性超量表达 TS 的能力可能在氟尿嘧啶耐药性中起作用。以前的一些研究显示,TS 蛋白的水平直接与 5-FU 治疗的有效性相关,蛋白和 RNA 表达之间直接相关 (Jackman 等,1985),并且 TS 表达是结肠直肠癌和乳腺癌中的有效预后标志 (Jackman 等,1985 ;Horikoshi 等,1992)。

[0009] 在晚期转移疾病中,已证明由 RT-PCR 定量的高 TS mRNA,以及高 TS 蛋白质表达都预期对结肠癌 (Johnston 等,1995 ;Farrugia 等,1997 ;Leichman 等,1997)、胃癌 (Lenz 等,1995 ;Alexander 等,1995)、头颈癌 (Johnston 等,1997) 的基于氟嘧啶的治疗的弱反应。在低 TS 人群中经常存在反应者和无反应者之间的显著重叠,但是 TS 水平高于中值的患者主要是无反应者。如果与其他分子特性结合,TS 超量表达的预测价值可以进一步增加,所述分子特性如二氢嘧啶脱氢酶 (DPD) 和胸苷磷酸化酶 (TP) 的表达水平、复制错误阳性 (RER+) 状态 (Kitchens 和 Berger,1997) 和 p53 状态 (Lenz 等,1997)。目前评价 TS 在人类肿瘤中的表达的研究提示基于人中的 TS 表达而预测反应和结果的能力可以在将来提供机会以选择最有可能受益于 TS 指导的治疗的患者。

[0010] 至今,包括 TS 表达研究在内的定量组织基因表达研究限于反转录酶聚合酶链反应(RT-PCR)从冷冻组织中扩增 RNA。然而,大多数病理样品不是制备成冷冻组织,而通常是制备成福尔马林固定的石蜡包埋的(FFPE),以便于进行组织学分析和档案存储。在这种固定的包埋的样品中,通过使用免疫组织化学染色监测蛋白表达水平,可以半定量地、间接地监测基因表达水平。由于石蜡包埋的样品广泛存在,因此需要快速可靠的方法来从这种样品中分离核酸,尤其是 RNA。

[0011] 已存在许多从生物样品中纯化 RNA 的技术,但没有一种可靠地从 FFPE 样品中分离 RNA。例如,Chomczynski(美国专利 5,346,994)描述了一种用于从组织中纯化 RNA 的方法,该方法基于使用苯酚和异硫氰酸胍的液相分离。将生物样品在苯酚和异硫氰酸胍的水溶液中均化,之后将匀浆与氯仿混合。离心后,将匀浆分离为有机相,界面和水相。蛋白质隔离在有机相中,DNA 在界面上,RNA 在水相中。可以将 RNA 从水相中沉淀出来。这种方法不能可靠地从福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品中分离 RNA。

[0012] 其他用于分离 RNA 的已知技术通常使用胍盐或苯酚提取,例如 Sambrook, J. 等,(1989),pp. 7.3-7.24,和 Ausubel, F. M. 等,(1994),pp. 4.0.3-4.4.7 中所描述。然而,在从福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品中分离 RNA 的方面,还没有一种已知方法提供可重复的定量结果。

[0013] 从石蜡包埋的组织中分离 RNA 的技术在肿瘤组织的基因表达研究中是尤其需要的。某种受体或酶的表达水平可以预示特定治疗获得成功的可能性。

[0014] 正确的定量 TS 基因表达研究限于从冷冻组织 RT-PCR,而在固定于载玻片上的档案病理材料中,可以通过免疫组织化学染色进行 TS 蛋白表达的半定量监测。但由于从档案病理材料中分离 RNA 的限制,用于从这种样品测定基因表达水平的定量技术迄今仍没有。

发明内容

[0015] 本发明的一个方面是提供可靠的用于从生物组织样品中分离 RNA、DNA 或蛋白质的方法。本发明还提供用于从包埋于石蜡的组织中分离 RNA、DNA 或蛋白质的简单、有效和可重复的方法。

[0016] 本发明提供从生物组织样品中纯化 RNA 的方法,其通过将样品在有效浓度的离液剂溶液中,在约 50℃ 至约 100℃ 的温度下加热约 5 至约 120 分钟而进行。在一个实施方案中,离液剂是胍鎓化合物。然后从所述溶液中回收 RNA。例如,可以通过氯仿提取实现 RNA 回收。

[0017] 在本发明的方法中, RNA 分离自档案病理样品。在一个实施方案中,石蜡包埋的样品首先脱蜡。示例性的脱蜡方法包括用有机溶剂,优选二甲苯洗涤石蜡样品。脱蜡的样品可以用低级醇的水溶液再水化。合适的低级醇包括甲醇、乙醇、丙醇和丁醇。在一个实施方案中,脱蜡的样品通过用浓度逐渐降低的低级醇溶液连续洗涤而再水化。在另一实施方案中,样品同时脱蜡和再水化。

[0018] 脱蜡的样品可以用机械、声或其他均化方式均化。在一个实施方案中,再水化的样品在包含离液剂,如硫氰酸胍(也以异硫氰酸胍出售)的溶液中均化。

[0019] 将均化的样品在包含有效浓度的离液剂的离液溶液中加热到约 50℃ 至约 100℃ 的温度范围内。在一个实施方案中,离液剂是胍鎓化合物。优选的离液剂是硫氰酸胍。

[0020] 然后通过例如苯酚氯仿提取、离子交换层析或大小排阻层析从溶液中回收 RNA。

[0021] 接着可以采用提取、电泳、层析、沉淀或其他适宜的技术进一步纯化 RNA。

[0022] 由本发明的方法分离的 RNA 适于分子生物学中的许多应用,包括用随机引物反转录以提供 cDNA 文库。

[0023] 通过反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 扩增,纯化的 RNA 可以用于确定福尔马林固定的石蜡包埋的组织样品中的基因表达水平。使用适当的 PCR 引物,可以通过本发明的方法确定任何信使 RNA 的表达水平。定量 RT-PCR 技术允许将石蜡包埋的蛋白表达水平 (通过免疫组织化学方法) 与相同样品中的基因表达水平 (使用 RT-PCR) 进行比较。

[0024] 本发明的方法可用于多种组织和肿瘤类型以及靶基因,因此可以用于治疗评价以及用作多种癌症,包括乳腺癌、头颈癌、食管癌、结肠直肠癌和其他的诊断工具。对于本发明的方法而言,特别优选的基因是胸苷酸合成酶基因。在 FFPE 组织中,本发明的方法实现了 TS 基因表达的可重复的定量,类似于从冷冻组织获得的结果。

附图说明

[0025] 图 1 显示不同加热时间的 β -肌动蛋白和 TS 表达水平。这些数据表明没有加热步骤,从石蜡提取的 RNA 收率最小。

[0026] 图 2 显示在正常 (N) 或来自结肠直肠癌患者的肿瘤 (T) 组织中的 β -肌动蛋白表达水平,数据由在 95°C 提取 0 至 40 分钟的 RNA 的定量 PCR 测得。这些数据提示 30 分钟是最优的加热时间。

[0027] 图 3 显示温度和时间对 β -肌动蛋白 RNA 的收率和 DNA 的分离的影响。这些数据表明,在加热时间较长时 (在 60 至 120 分钟之间),RNA 发生降解,而能够生成 DNA PCR 信号的污染 DNA 增加。条形代表在所示的各种时间和温度下进行的三重试验的值。

[0028] 图 4 显示各种加热溶液对分离的 RNA 收率的影响。这些数据表明,溶液中的离液剂,在该例中是异硫氰酸胍 (GITC),是 RNA 提取溶液的必需成分,如果没有离液剂,提取的 RNA 的收率至少低 10 倍。

[0029] 图 5 显示来自六种细胞系的石蜡包埋的 (白色条形) 和冷冻的细胞沉淀 (黑色条形) 的 TS 基因表达的比较。这些数据表明,对石蜡提取的 RNA 的分析可靠地反映新鲜冷冻组织中的基因表达值。

[0030] 图 6 显示正常或有肿瘤的结肠和有肿瘤的食管组织中的 TS 基因表达水平的比较,所述组织是福尔马林固定的石蜡包埋的或是冷冻的。

[0031] 图 7 显示在来自对 5-FU/LV 的反应以前已经与 TS 基因表达相连的患者的石蜡切片中测得的 TS/ β -肌动蛋白比。

[0032] 图 8 显示四种恶性标记基因 (TS ;胸苷磷酸酶 (TP) ;环加氧酶 -2 (COX-2) ;和血管内皮生长因子 (VEGF)) 在原发结肠癌和同一患者一年后复发的肝转移癌的 FFPE 样品中的表达水平。这些数据表明,如可以预期的,四种恶性标记中的三种在转移肿瘤组织中提高。

具体实施方式

[0033] 本发明的方法涉及从生物样品中纯化 RNA。在一个实施方案中,样品是石蜡包埋的组织样品,且该方法包括包埋样品的脱蜡,脱蜡组织的均化,以及在约 50°C 至约 100°C 的温

度范围内,加热处于包含有效量的胍鎓化合物的离液溶液中的组织,加热约 5 分钟至约 120 分钟。加热步骤增加从样品扩增的 cDNA 的量,比不经加热的样品高 1000 倍。

[0034] 尽管冷冻组织不是普遍地可以获得,但手术后,通常从每种类型的肿瘤制备石蜡块,从而允许大规模追溯研究 TS 表达和化疗反应。

[0035] 此外,该技术可以应用于多种肿瘤类型的任何一种,不限于一定范围的靶基因。这暗示将来可以制备各肿瘤“基因表达分布图”,从而可以确定各患者样品中已知影响临床结果和对各种化疗药反应的一系列基因的表达水平。FFPE 样品的自动实时 PCR 允许各肿瘤的靶向治疗。

[0036] 组织样品

[0037] 使用本发明的方法,可以从任何生物样品中分离 RNA。生物样品经常用固定剂固定。通常使用醛类固定剂,如福尔马林(甲醛)和戊二醛。用其他固定技术如醇浸(Battifora 和 Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986) 34 :1095) 固定的组织样品也是适宜的。所使用的样品还包埋在石蜡中。通过本发明的方法,可以从任何石蜡包埋的生物组织样品中分离 RNA。在一个实施方案中,样品是福尔马林固定的和石蜡包埋的。

[0038] 样品脱蜡

[0039] 脱蜡将石蜡的大部分从石蜡包埋的样品中除去。已知许多用于脱蜡的技术,且任何适当的技术都可以用于本发明。本发明的优选的方法是用有机溶剂洗涤来溶解石蜡。这种溶剂能够有效地从组织样品中除去石蜡,而不对 RNA 分离造成不利影响。适合的溶剂可以选自溶剂如苯、甲苯、乙基苯、二甲苯以及它们的混合物。二甲苯是用于本发明的方法的优选溶剂。本发明的方法中单独或组合使用的溶剂优选是高纯度的,通常纯度大于 99%。

[0040] 通常通过用有机溶剂洗涤,剧烈混合接着离心来除去石蜡。样品的离心速度足以导致组织在试管内沉淀,通常为约 10000 至约 20000xg。在离心后,弃去有机溶剂上清液。组织学领域的技术人员将认识到,所用的有机溶剂的体积以及所需的洗涤次数取决于样品的大小以及要除去的石蜡的量。需要除去的石蜡越多,所需的洗涤次数越多。通常,样品洗涤 1 至约 10 次,优选约 2 至约 4 次。对于 10 μ m 组织样品,通常的有机溶剂体积为约 500 μ l。

[0041] 本领域技术人员已知的其他用于脱蜡的方法也可以用于本发明的方法。这些方法包括直接熔化(Banerjee 等,1995)。

[0042] 样品在脱蜡以后优选再水化。优选的再水化方法是用浓度逐渐降低的低级醇水溶液分步洗涤。乙醇是优选的用于再水化的低级醇。其他醇也可以适用于本发明,包括甲醇、异丙醇和其他在 C1-C5 范围内的类似的醇。样品交替与醇溶液剧烈混合和离心。在一个优选的实施方案中,醇的浓度范围逐步降低,在约 3 至 5 个步骤中从约 100%降至约 70%,其中每一步溶液浓度的改变通常小于约 10% (即依次为 :100%,95%,90%,80%,70%)。在另一实施方案中,使用诸如 EZ-DEWAX (BioGenex, San Ramon, CA) 的试剂,脱蜡和再水化同时进行。

[0043] 均化

[0044] 脱蜡再水化的样品可以用任何标准机械、声或其他适宜的技术均化。优选使用机械组织匀浆器,根据标准步骤进行组织均化。许多商品化的匀浆器适用于本发明,包括 : Ultra-Turrax 匀浆器 (IKA-Works, Inc., Wilmington, NC) ; Tisumizer (Tekmar-Dohrmann, Cincinnati, OH) ; 和 Polytron (Brinkmann, Westbury, NY)。

[0045] 在一个实施方案中,样品在离液剂的存在下均化。选择离液剂,使从石蜡包埋的样品中纯化的有效浓度的 RNA 比离液剂不存在的情况下高约 10 倍。离液剂包括:胍鎓化合物、尿素、甲酰胺、碘化 (iodide) 钾、硫氰酸钾以及类似的化合物。对本发明的方法而言,优选的离液剂是胍鎓化合物,如异硫氰酸胍(也以硫氰酸胍出售)和盐酸胍。许多阴离子抗衡离子是有用的,本领域技术人员可以制备许多具有这种适当阴离子的胍鎓盐。本发明使用的胍鎓溶液的浓度通常在约 1 至约 5M 的范围内,优选值约为 4M。如果 RNA 已经存在于溶液中,胍鎓溶液可以是更高的浓度,使其在样品中的终浓度在约 1 至约 5M 的范围内。胍鎓溶液优选合适的生化缓冲液如 Tris-Cl 缓冲至 pH 为约 3 至约 6,更优选为约 4。离液溶液也可以含有还原剂,如二硫苏糖醇 (DTT) 和 β -巯基乙醇 (BME)。离液溶液也可以含有 RNase 抑制剂。

[0046] 加热

[0047] 样品在离液溶液中加热,加热温度为约 60°C 至约 100°C,加热时间为约 5 分钟至约 2 小时。或者,样品在离液溶液中在约 50°C 至约 100°C 的温度下加热,加热时间为约 5 分钟至约 2 小时。通常选择加热时间,使所纯化的 RNA 的量比不加热的样品的高至少 100 倍,更优选高约 1000 倍。在一个优选的实施方案中,样品在约 75°C 至约 100°C 之间加热约 20 分钟。更优选地,样品在约 95°C 加热 30 至 60 分钟。

[0048] RNA 回收

[0049] 在通过导致 RNA 与离液溶液的至少一种成分分离的适当的技术加热后,可以从离液溶液中回收 RNA。将 RNA 从离液溶液中回收的方法可以是:用有机溶剂提取,氯仿提取、苯酚-氯仿提取,用乙醇、异丙醇或其他低级醇沉淀,层析法,包括离子交换层析、大小排阻层析、硅胶层析和反相层析,或者电泳方法,包括聚丙烯酰胺凝胶电泳和琼脂糖凝胶电泳,对于本领域技术人员来说这些方法将是明显的。优选使用苯酚-氯仿提取从离液溶液中回收 RNA。

[0050] 在 RNA 回收后,RNA 可以任选地进一步纯化。进一步纯化得到基本上没有污染 DNA 或蛋白质的 RNA。进一步纯化可以通过前述用于 RNA 回收的任何技术进行。优选通过用低级醇,尤其是乙醇或异丙醇沉淀而纯化 RNA。沉淀优选在促进沉淀的载体如糖原的存在下进行。

[0051] DNA 和蛋白质回收

[0052] 本发明的方法也可以用于从组织样品中纯化 DNA 或蛋白质。在样品与有机溶剂如氯仿混合后,接着离心,溶液具有三个相,下层有机相、界面和上层水相。使用适当的离液剂,特别是胍鎓化合物,样品的生物成分将分别进入三相。上层水相将含有 RNA,界面将含有 DNA,而有机相含有蛋白。本领域技术人员将认识到,本发明的方法适于回收 DNA 和蛋白质相,以及含有 RNA 的相。通过本发明的方法,DNA 回收得以增加。

[0053] 纯化的 RNA

[0054] 通过本发明的方法纯化的 RNA 适于多种目的和分子生物学方法,包括但不限于:反转录为 cDNA;生产放射性的、荧光的或其它标记的 cDNA 来进行基因芯片、寡核苷酸微阵列等的分析;聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳;层析(例如离子交换、硅胶、反相或大小排阻层析)纯化;用核酸探针杂交;通过机械、声或其它方式破碎。

实施例

[0055] 材料和方法

[0056] 这些材料和方法是下面的实施例所共同使用的。

[0057] 样品制备

[0058] 人细胞系 SK1、H157、A431、HT29、HCC298 和 HH30 的特征以前已有描述。细胞通过胰蛋白酶消化从它们的单层移开,通过在 3000rpm 下离心 5 分钟沉淀细胞。细胞沉淀可以在 -70℃ 冷冻或者用福尔马林固定 24 小时,然后用石蜡包埋。

[0059] 肿瘤组织代表性切片在外科手术时获得,通过临床病理学实验室的常规方法将其固定于福尔马林中,并且包埋在石蜡中。用切片机切下组织横切片 (5 μ m)。

[0060] RNA 分离

[0061] 从石蜡包埋的组织中如下分离 RNA。将单个 5 μ m 石蜡包埋的组织切片置于 Eppendorf 管中,用二甲苯洗涤两次,每次 15 分钟,进行脱蜡。用级配的乙醇 (100%、95%、80% 和 70%) 连续洗涤 15 分钟进行再水化。将产生的沉淀悬浮在含有 0.5% 肌氨酸和 20mM 二硫苏糖醇 (DTT) 的 4M 异硫氰酸胍中。均化悬浮液,然后在约 50℃ 至约 95℃ 下加热 0 至 60 分钟;每一样品都有零加热时间点作为对照。加入醋酸钠 (pH 4.0) 至 0.2M,溶液用苯酚/氯仿提取,并用异丙醇和 10mg 糖原沉淀。在离心 (13000rpm, 4℃, 15 分钟) 后, RNA 沉淀用 1ml 75% 的乙醇洗涤两次,然后重新悬浮在无 RNase 的水中。

[0062] 反转录 (RT)

[0063] 在加热后,使用随机六聚体将全部 RNA 转化为 cDNA。RT 条件与以前描述的用于冷冻组织的条件 (Horikoshi 等, 1992) 相同。每一样品都有不加反转录酶 (No-RT) 的对照。

[0064] TS 和 β -肌动蛋白基因表达的实时 PCR 定量使用 Perkin Elmer Cetus 7700PCR 仪 (Taqman)。mRNA 水平的定量使用基于以前描述的荧光检测方法 (Heid 等, 1996; Eads 等, 1999) 的实时 PCR 进行。cDNA 如上述制备。将感兴趣的 cDNA 和参考 cDNA 分别扩增,扩增使用具有 5' - 荧光报道染料 (6FAM) 和 3' - 淬灭染料 (TAMRA) 的探针。TAQ 聚合酶的 5' - 核酸外切酶活性使探针断裂,释放出报道分子,其荧光用 ABI Prism 测序系统 (Taqman) 检测。在越过荧光检测临界值后,PCR 扩增产生的荧光信号与产生的 PCR 产物量成比例。起始模板浓度由荧光信号越过临界值进入 PCR 反应指数期的循环数确定。相对基因表达基于所感兴趣的基因和参考基因的临界循环数而确定。参考基因的使用避免了直接定量 RNA 的需要,而 RNA 直接定量是误差的主要来源。

[0065] 引物和探针的序列如下:

[0066] TS :SEQ ID NO :1 :GGC CTC GGT GTG CCT TT ;

[0067] SEQ ID :2 :AAC ATC GCC AGC TAC GCC CTG ;

[0068] SEO ID NO :3 :GAT GTG CGC AAT CAT GTA CGT。

[0069] β -肌动蛋白 :SEQ ID NO :4 :TGA GCG CGG CTA CAG CTT ;

[0070] SEQ ID NO :5 :ACC ACC ACG GCC GAG CGG ;

[0071] SEQ ID NO :6 :TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T。

[0072] 如上所讨论,对于实时 PCR 试验,报道寡核苷酸 (SEQ ID NOS :2 和 5) 5' 端用 6FAM 标记, 3' 端用 TAMRA 标记。

[0073] 每一 PCR 还包括“无反转录酶”(NRT 或 No-RT) 对照。这样做的目的是矫正来源于

残余基因组 DNA 污染的任何背景扩增。因此,每一 TS 和 β -肌动蛋白的总值是 RT 值减去 NRT 值 (RT-NRT)。

[0074] 统计学分析

[0075] 进行均值非参数对照检验来确定同一肿瘤的冷冻组织和 FFPE 样品间 TS 水平的差异是显著性的或非显著性的。

[0076] 实施例 1 常规 RNA 分离步骤

[0077] 通过下述步骤从石蜡包埋的组织中提取 RNA:

[0078] A. 切片的脱蜡和再水化:

[0079] (1) 将约 10 μ M 的切片部分置于 1.5ml 塑料离心管中;

[0080] (2) 加入 600 μ l 二甲苯,在室温下(约 20-25 $^{\circ}$ C)将混合物剧烈震荡约 10 分钟。

[0081] (3) 在室温下将样品离心约 7 分钟,离心速度为台式离心机的最大速度(约 10-20000 $\times$ g)。

[0082] (4) 重复步骤 2 和 3,直到大多数石蜡溶解。通常需要两次或更多次,取决于原始样品部分中包含的石蜡量。

[0083] (5) 通过与低级醇,优选是 100%乙醇(约 600 μ l)一起剧烈震荡约 3 分钟,将二甲苯溶液移去。

[0084] (6) 将试管步骤(3)中一样离心 7 分钟。将上清液轻轻移出并弃去。沉淀变成白色。

[0085] (7) 用连续稀释的乙醇溶液重复步骤 5 和 6:先用约 95%的乙醇,接着用约 80%的,最后用约 70%的。

[0086] (8) 样品如在步骤(3)中一样在室温下离心 7 分钟。弃去上清,使沉淀在室温下干燥约 5 分钟。

[0087] B. 用苯酚-氯仿分离 RNA

[0088] (1) 加入包含 0.5%肌氨酸和 8 μ l 1M 二硫苏糖醇的 400 μ l 异硫氰酸胍。

[0089] (2) 然后用组织匀浆器(Ultre-Turrax, IKA-Works, Inc., Wilmington, NC)将样品均化约 2 至 3 分钟,同时从低速(速度 1)到高速(速度 5)逐渐提速。

[0090] (3) 然后样品在约 95 $^{\circ}$ C下加热约 5 至 20 分钟。优选在加热前用细针刺穿含有样品的管的盖子。或者,管盖也可以用塑料夹子或实验膜(laboratory film)固定。

[0091] (4) 然后用 50 μ l 2M 醋酸钠在 pH4.0,以及 600 μ l 苯酚/氯仿/异戊醇(10 : 1.93 : 0.036)提取样品,所述苯酚/氯仿/异戊醇是通过混合 18ml 苯酚和 3.6ml 1 : 49 的异戊醇:氯仿溶液而新鲜配制的。溶液剧烈震荡约 10 秒钟,在冰上冷却约 15 分钟。

[0092] (5) 溶液在最高速度下离心约 7 分钟。将上层(水)相转移到新的试管中。

[0093] (6) 在 -20 $^{\circ}$ C下,用约 10 μ l 糖原和 400 μ l 异丙醇沉淀 RNA 30 分钟。

[0094] (7) 在台式离心机中以最高速度离心约 7 分钟,将 RNA 沉淀;将上清液轻轻移走并弃去;沉淀物用约 500 μ l 约 70%至 75%的乙醇洗涤。

[0095] (8) 再次以最高速度离心样品 7 分钟。将上清液轻轻移走,风干沉淀。然后将沉淀溶解在适当的缓冲液(例如 50 μ l 5mM Tris-Cl, pH8.0)中,用于进一步试验。

[0096] 实施例 2 加热时间

[0097] 本实施例说明加热时间对 RNA 收率的影响。

[0098] 如图 1 中所示,在沉淀和反转录之前,在 95℃ 下加热离液溶液显著提高 TS 和 β -肌动蛋白靶的检测效率。当不包括加热步骤时,TS 和 β -肌动蛋白都未能检测到(0 分钟时间点)。20 分钟后在 95℃,两种转录物都可检测;继续加热到 60 分钟,TS 的检测灵敏度增加 3 倍, β -肌动蛋白的检测灵敏度增加 4.5 倍。(NRT = 无反转录酶对照;RT-NRT = 总相对基因表达水平,即反转录酶减去无反转录酶)。

[0099] 图 2 显示 β -肌动蛋白基因在正常(N)和肿瘤(T)组织中的 RNA 表达量。样品在 95℃ 下加热 0 至 40 分钟。从大多数样品观察到,优选的加热时间为约 30 分钟。

[0100] 图 3 显示加热时间大于约 60 分钟,提取的 RNA 的量开始下降,提示 RNA 的热降解,而提取的 DNA 的量开始增加。这是不希望的,因为 DNA 的存在在一些情况下可能给出假 PCR 信号。

[0101] 实施例 3 加热溶液

[0102] 本实施例说明在离液剂的存在下加热 RNA 溶液对于获得 RNA 高收率是重要的。这是 RT-PCR 试验,将 β -肌动蛋白基因表达检测用作从各种溶液中分离的 RNA 的相对量的量度。

[0103] 根据前述方法处理食管癌 FFPE 组织样品的临床样品,但是脱蜡后获得的初始沉淀溶解或悬浮在 4M 异硫氰酸胍(GITC),4M 异硫氰酸胍+100 μ M β -巯基乙醇(GITC+BME),4M 异硫氰酸胍+20 μ M 二硫苏糖醇(GITC+DTT)或 Tris-Cl 缓冲液(10mM, pH 7.5)或 Tris-Cl 缓冲液+20 μ M DTT(Tris/Cl+DTT)。接着将样品在 95℃ 加热 30 分钟或不加热(0 分钟,95℃)。然后 Tris/Cl 样品用 4M 异硫氰酸胍处理。通过 RT-PCR 和实时 PCR 检测 β -肌动蛋白确定 RNA 水平。如图 4 所示,在加热时,离液剂异硫氰酸胍的存在对于 RNA 的高收率回收是重要的。还原剂如 DTT 或 BME 的存在不是 RNA 高收率回收所必需的。4M 异硫氰酸胍溶液含有 50mM Tris-HCl(pH 7.5)、25mM EDTA 和 0.5%肌氨酸。

[0104] 实施例 4 在相同来源的 FFPE 和冷冻组织中测定的基因表达值的比较

[0105] 本实施例表明,本发明的方法提供的来自福尔马林固定的石蜡包埋的样品的基因表达值与从冷冻组织获得的相当。

[0106] 来自六种细胞系的样品采用本发明的方法进行 FFPE 处理和 TS 定量(包括在 95℃ 加热 30 分钟)。获得的相对 TS 值(图 5)与用已知方法从冷冻细胞沉淀获得的值比较。冷冻细胞中的相对 TS 表达水平是 3.0-19.5(平均=8.5),而 FFPE 样品为 3.0-25.0(平均=9.0)。对两个均值之间的差异的统计学分析显示 p 值为 0.726,表明从使用原先的 RT-PCR 方法的冷冻细胞沉淀获得的 TS 值与从使用本发明的方法的 FFPE 细胞沉淀获得的 TS 值没有显著性差异。

[0107] 无论样品是福尔马林固定的石蜡包埋的,还是冷冻的,肿瘤组织样品中的 RNA 表达水平和正常(无肿瘤的)组织样品也是相当的。对 5 个正常结肠组织、6 个肿瘤结肠组织和 4 个食管肿瘤组织进行对比的石蜡包埋的和冷冻组织(FT)的 TS 基因表达的比较。结果显示在图 6 中。没有发现同一组织的冷冻组织样品和 FFPE 样品的 TS 水平有显著性差异。这在结肠和食管组织类型中都是真的(结肠 FT 样品平均=3.46,结肠 FFPE 样品平均=3.06, $p = 0.395$;食管 FT 样品平均=13.9,食管 FFPE 样品平均=15.93, $p = 0.21$)。

[0108] 实施例 5 反应和无反应肿瘤组织中的 TS 水平比较

[0109] 冷冻组织和对比的 FFPE 样品中的 TS 水平与 IV 期结肠癌中的对 5-FU/ 甲酰四氢叶酸的相关性。先前的基于来自冷冻组织的 RT-PCR 数据的报导发现,肿瘤中的高 TS 水平(相对基因表达 ≥ 4.0)指示对 TS 治疗的弱反应。有反应的肿瘤以 TS 低水平表达为特征。确定了来自 17 个患者的石蜡切片的 TS/ β -肌动蛋白比,之前这 17 个患者对 5FU/LV 的反应已经通过分析冷冻组织样品与 TS 基因表达有关(图 7)。在这 17 个患者中,已知有 6 个对 TS 有反应,11 个对 TS 治疗反应不佳。发现对比的石蜡组织的 TS 结果也预示对这种治疗的反应(平均反应者 FT = 2.87,平均反应者 FFPE = 2.37, $P = 0.641$;平均无反应者 FT = 7.66,平均无反应者 FFPE = 7.84, $P = 0.537$)。来自冷冻组织的 TS 水平和来自对比的 FFPE 的 TS 水平间没有显著性差异。

[0110] 实施例 6 原发结肠癌和肝转移中的 TS 基因表达水平

[0111] 本实施例显示来自同一患者的原发结肠癌和复发的肝转移中的 TS 和其他基因表达的分析。

[0112] 图 8 显示来自同一患者的原发结肠癌和一年后复发的肝转移(met)的 FPEP 样品中 4 种基因的表达水平:TS;TP;环加氧酶-2(COX-2);以及血管内皮生长因子(VEGF)。结果表明,虽然原发肿瘤对 5-FU 治疗敏感(TS = 2.32),但转移肿瘤将是难治的(TS_{met} = 11.58)。COX-2 和 VEGF 表达水平与已经公布的结果相关,即它们在攻击性疾病中表达增加,并且是相互调控的(coregulate)。(COX-2 原发 = 1.35;COX-2_{met} = 5.4;VEGF 原发 = 5.02;VEGF_{met} = 14.4)。如上所述将 RNA 从原发结肠癌的 5 μ M FFPE 切片和肝转移的 FFPE 切片中分离出来。在有反应的原发肿瘤中相对 TS 基因表达是 2.32,而在转移疾病中是 11.58(图 8)。通过这里所报导的 RT-PCR 方法确定的 TS 表达的 5 倍增加表明继发疾病对 5-FU 无反应,提示其他治疗如 CPT-11 可能是合适的。

[0113] 本文引用的所有参考文献均引入本文作参考。

[0114] 参考文献

[0115] Ardalan, B. 和 Dang, Z. (1996)Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Cancer Res. 37 : A1376.

[0116] Ausubel, F.M. 等,《分子生物学中的现有策略》,John Wiley&Sons, Inc.,第 1 卷,第 2.2.1-2.4.5 页(1994).

[0117] Bannene, S.K., Makdisi, W.F., Weston, A.P., Mitchell, S.M., 和 Campbell, D.R. (1995) 生物技术,18 :768-773.

[0118] Chomczynski 等,"通过酸性硫氰酸胍-苯酚-氯仿提取的单步 RNA 分离,分析生物化学,162 :156-159(1987).

[0119] Eads, C.A., Danenberg, K.D., Kawakami, K., Saltz, L.B., Danenberg, P.V. 和 Laird, P.W. (1999) 人结肠直肠肿瘤中的 CpG 岛的过甲基化(hypermethylation)与 DNA 甲基转移酶超量表达无关,癌症研究,59 :2302-2306.

[0120] Farrugia, D. Cunningham D. Danenberg P. Danenberg K. Metzger R. Mitchell F. MacVicar D. McCarthy K. Aherne G.W. Norman A. Jackrnan A.L. (1997)Proc. Annu. Meet Am. Assoc. Cancer Res. 38 :A4132.

[0121] Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. 和 Williams, P.M. (1996) 实时定量 PCR. 基因组研究,6 :986-994.

- [0122] Horikoshi, T., Danenberg, K. D., Stadlbauer, T. H. W., Volkenandt, M., Shea, L. L. C., Aigner, K., Gustavsson, B., Leichman, L., Frosing, R., Ray, M., Gibson, N. W., Spears, C. P. 和 Danenberg, P. V. 用聚合酶链反应定量人肿瘤中的胸苷酸合成酶、二氢叶酸还原酶和 DT- 心肌黄酶基因表达, 癌症研究, 52 :108-116, 1992.
- [0123] Jackman, A. L., Jones, T. R., Calvert, A. H. 癌症化疗中的实验和临床进展 (F. M. Muggia ED.) Martinus Nijhoff, 波士顿 (1985).
- [0124] Johnston, P. G., Lenz, H. J., Leichman, C. G., Danenberg, K. D., Allegra, C. J., Danenberg, P. V., Leichman, L. (1995) 癌症研究, 55 :1407-1412.
- [0125] Leichman, C. G., Lenz, H. J., Leichman, L., Danenberg, K., Baranda, J., Groshen, S., Boswell, W., Metzger, R., Tan, M., Danenberg, P. V. (1997) 临床肿瘤学杂志, 15(10) : 3223-9.
- [0126] Lenz, H. J., Danenberg, K. D., Leichman, C. G., Florentine, B., Johnston, P. G., Groshen, S., Zhou, L., Xiong, Y. P., Danenberg, P. V. 和 Leichman, L. P. (1998) 临床癌症研究, 4(5) :1227-34.
- [0127] Sambrook, J. 等, " 分子克隆 ", Cold Spring Harbor Press, 第2版, 第9.14-9.23 页 (1989).
- [0128] Spears, C. P., Shahinian, A. H., Moran, R. G., Heidelberger, C., 和 Corbett, T. H. (1982) 癌症研究, 42, 450-456 ;Keyomarsi, K. 和 Moran, R. G. (1988) 生物化学杂志, 263, 14402-14409.
- [0129] Swain, S. M., Lippman, M. E., Egan, E. F., Drake, J. C., Steinberg, S. M., 和 Allegra, C. J. (1989) 临床肿瘤学杂志, 7, 890-899

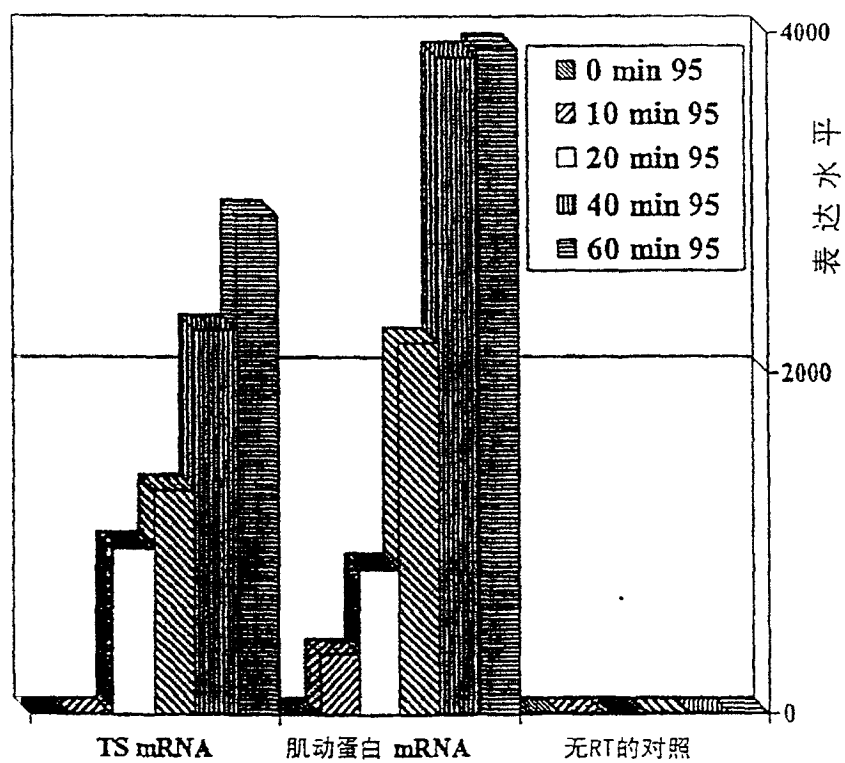


图 1

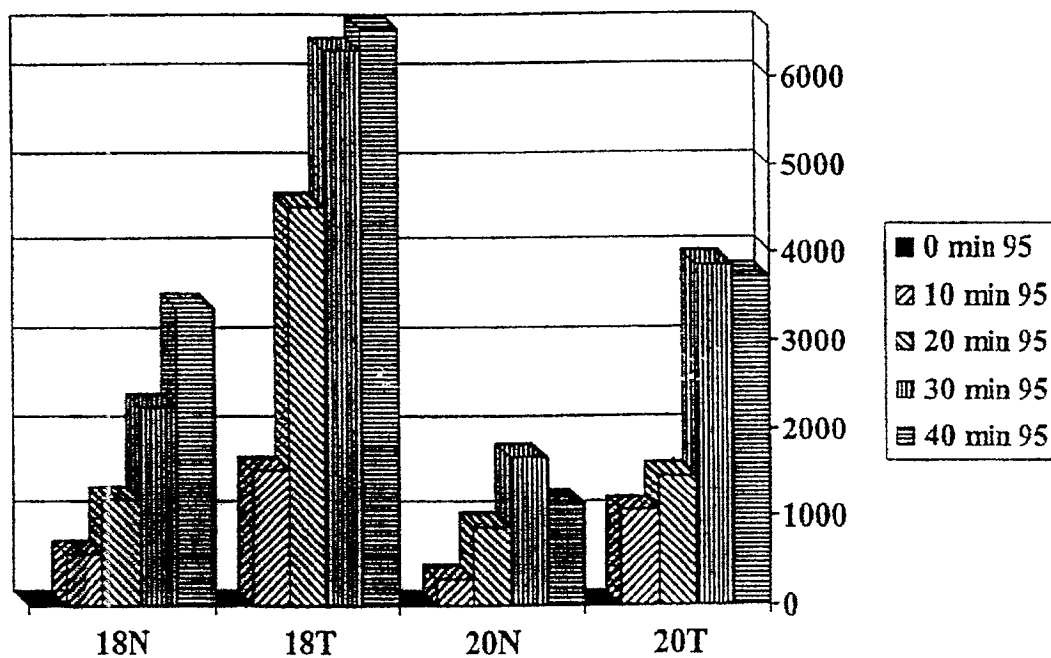


图 2

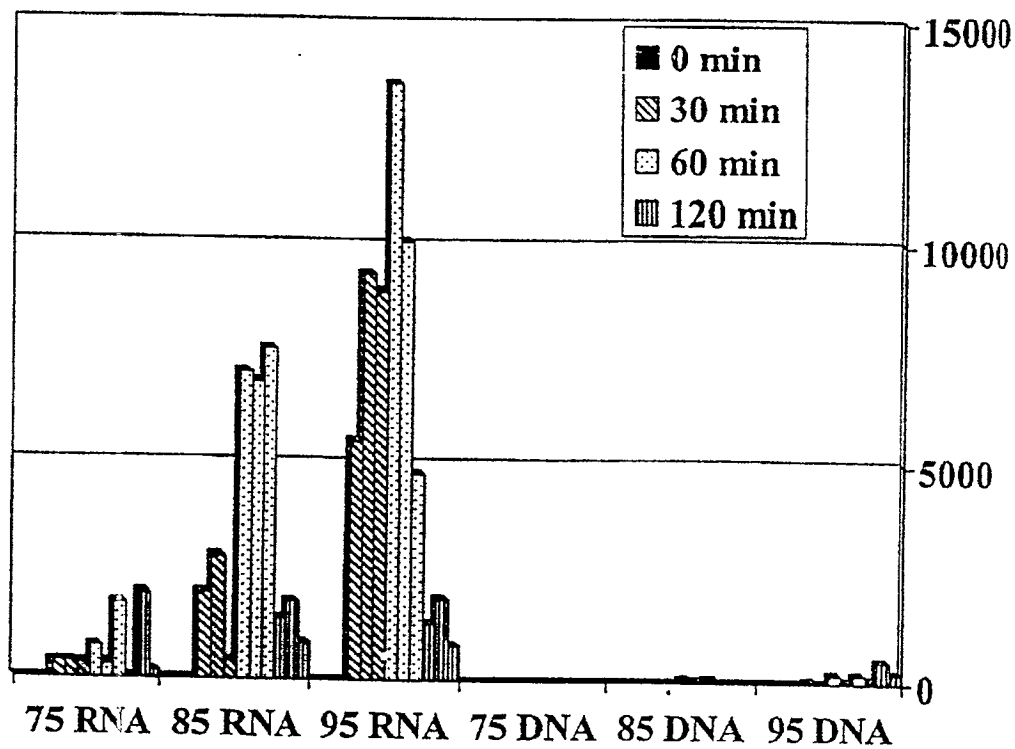


图 3

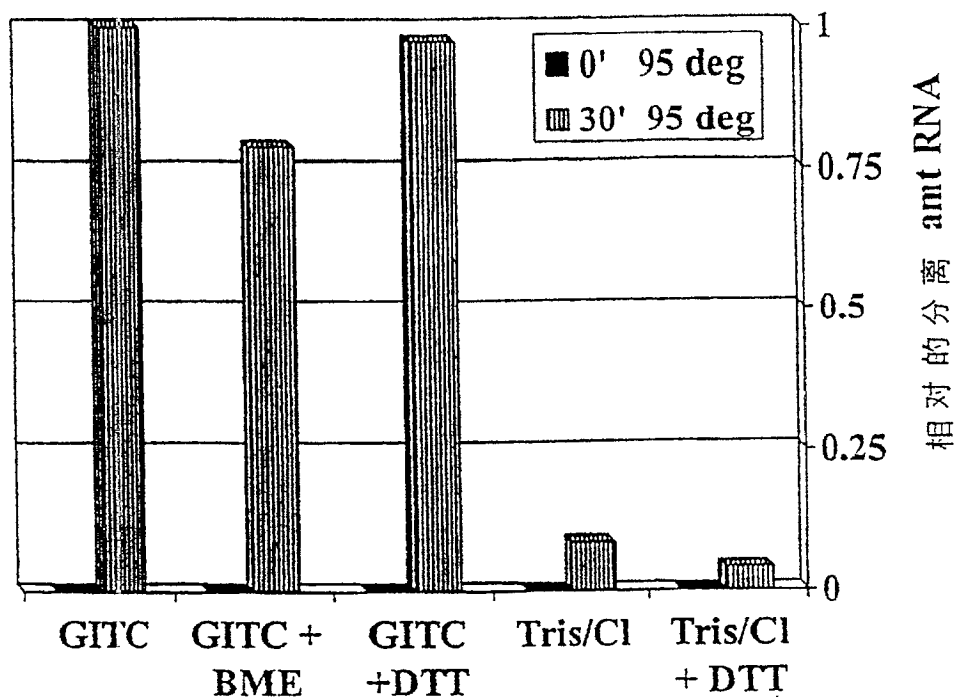


图 4

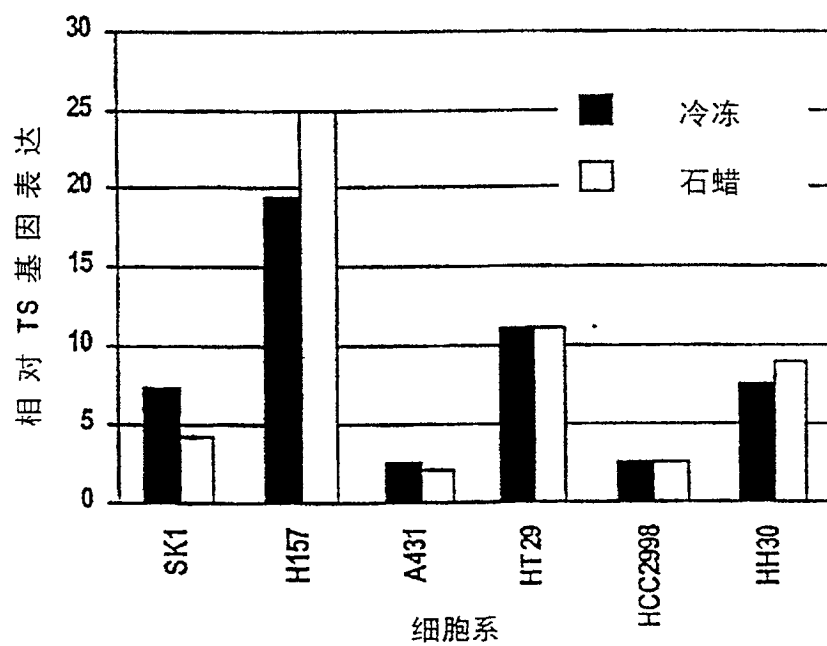


图 5

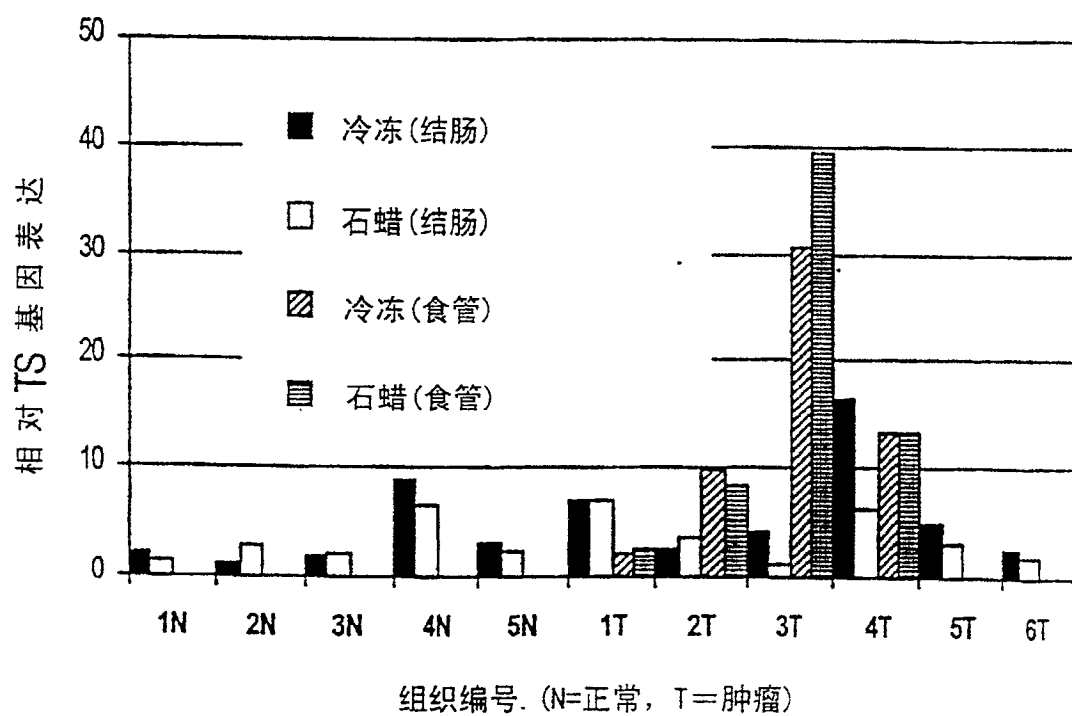


图 6

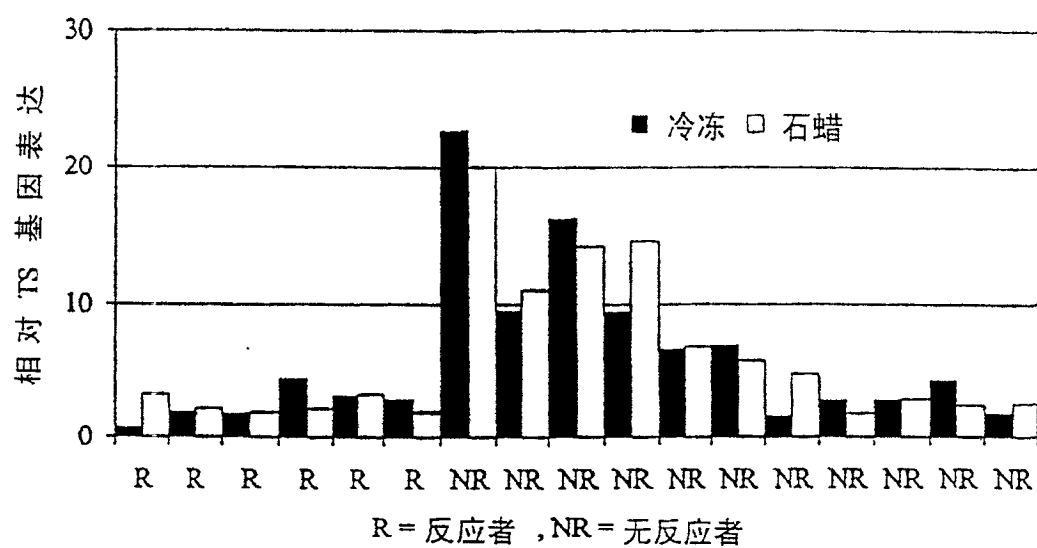


图 7

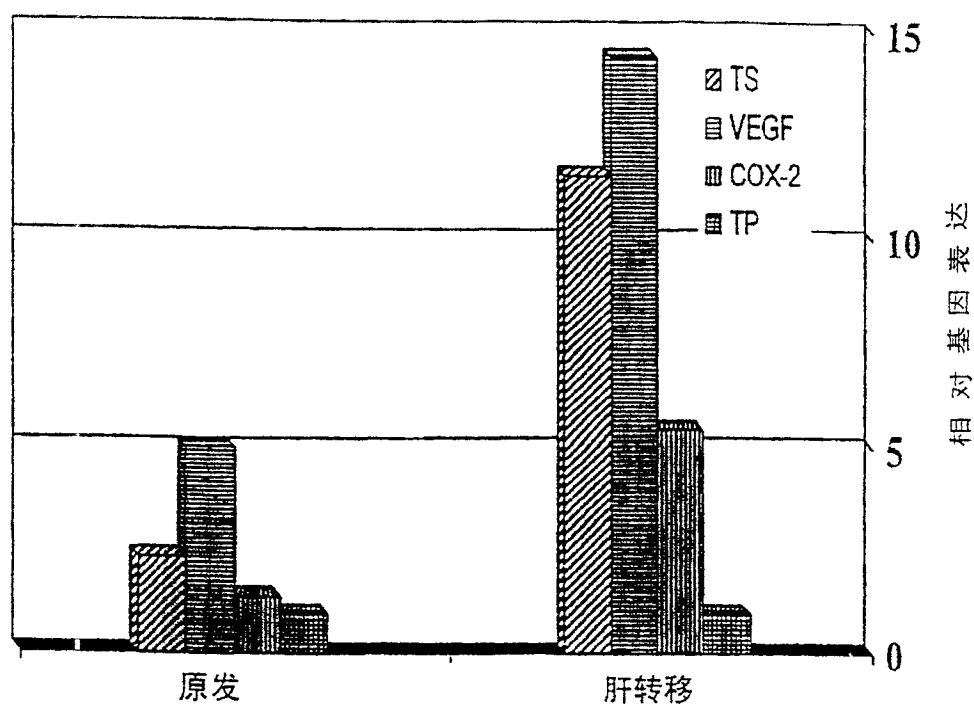


图 8