

使用可透过紫外的塑料比色皿 Uvette 对脂肪与肌肉组织上的瘦素受体 (OB-R_L) RNA 表达水平进行定量比色分析

前言

日益增多的肥胖症 (多因素的脂肪生成过量, BMI>30) 患者及与肥胖症密切相关的心血管疾病、脂质代谢障碍、高血压、II 型糖尿病的增加, 已经成为当今社会的一大问题。

1994 年, 一个主要在脂肪组织上表达, 专司能量的摄取与消耗的基因被发现。该基因被命名为 **ob** (肥胖) 基因, 其表达蛋白被命名为瘦素 (希腊文 **leptin**)。那些 **ob** 基因缺失的患者往往因为瘦素表达过低而容易罹患严重的肥胖症。对于这种患者可以有针对性的补充瘦素, 往往可以明显改善症状。

然而临床上发现, 大多数肥胖症并非由于 **ob** (肥胖) 基因缺陷, 因为这类患者的血浆瘦素水平不降反升。因而, 科学家大胆的推测: 瘦素抵抗而非瘦素减低是导致大多数肥胖症的根源。

虽然该种推测的机制还有许多无法解释的地方, 但不容置疑的是, 随着这一方向研究的不断深入将极大地推动新的肥胖症治疗药物的研发。

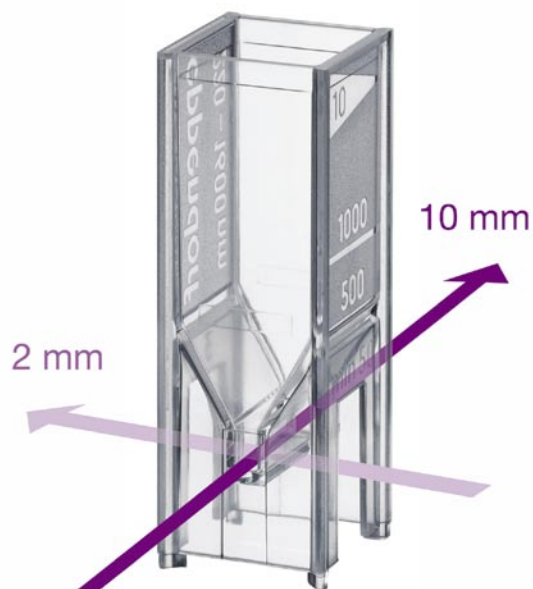
瘦素的生物学功能主要是通过效应在组织上的瘦素受体 (OB-R) 来实现的, 现在已经发现了许多瘦素受体的拼接变异体。本文的主要目的就是为了对最重要的一种瘦素受体的长拼接变异体在脂肪与肌肉组织上的 mRNA 表达水平进行分光比色分析。

作为实验中必不可少的耗材, 我们选择了 Eppendorf 特殊的可透过紫外、不含 RNase 的塑料比色皿 Uvette, 并见证了其优异表现。

材料与amp;方法

● 材料

在手术中, 分别从正常体重者、肥胖症患者与 II 型糖尿病患者身上取得脂肪与肌肉组织, 并立即放入液氮或 -80℃ 环境中储藏备用。



● 抽提 RNA 样品与分光测定

根据文献方法, 从约 200 mg 组织中抽提总 RNA。并将抽提的 RNA 溶入 30-50 μ l DEPC 水中制成原液。

将 1 μ l RNA 原液用 DEPC 水按 1:75 比例稀释加入塑料比色皿 Uvette (Eppendorf), 并在 Eppendorf Biophotometer 分光光度计 (测试体积: 75 μ l) 上检测 260 nm 吸光值。

Uvette 比色皿独立包装, 无 DNA、RNase 和蛋白污染, 可直接从包装中取出使用。RNA 样品的纯度也可通过测定 A_{260}/A_{280} 来分析。

为了判断 RNA 的质量, 用 1.5% 琼脂糖胶分离 28S 与 18S 核糖体 RNA 并用 EB 染色。

● cDNA 合成

用 oligo (dT) 引物将 2 μ g 总 RNA 反转录得到 cDNA。

● 定量 PCR 分析

使用罗氏公司的 LightCycler® 定量 PCR 仪，分析瘦素受体在脂肪与肌肉组织上的 mRNA 表达水平。

用以扩增瘦素受体基因的引物序列如下：

正向：5' GCG GAAAGC ACT TTG GCA 3'

反向：5' GAC ACA TGT TGG AGA 3'

每管的反应体系为 12.5 µl，其中引物浓度为 0.3 µM，镁离子浓度为 3 mM。标准的扩增热循环参数包括：最初 30 秒的热变性，之后 45 个循环，每个循环由 15 秒的 95℃ 热变性、5 秒的 60℃ 退火与 72℃ 延伸，延伸时间按产物的长度依每秒 25 bp 计算。荧光检测安排在每次循环的延伸完成之后。

为了判断扩增产物的特异性，可直接在定量 PCR 仪上进行熔解曲线分析，并在之后的 1.5% 琼脂糖胶 EB 染色电泳中得到验证。

● 数据分析

用罗氏公司的 RelQuant 分析软件对扩增效率及相关数据进行分析评价。

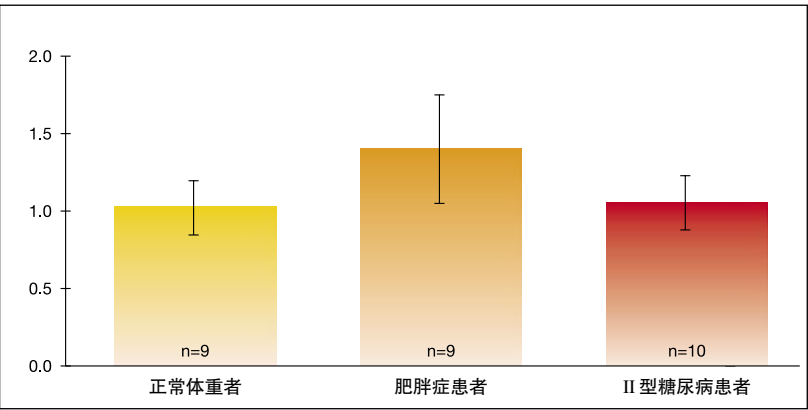


图 1：三组不同来源的肌肉组织中瘦素受体的表达水平（每组数据取标准均数与对照组比对）

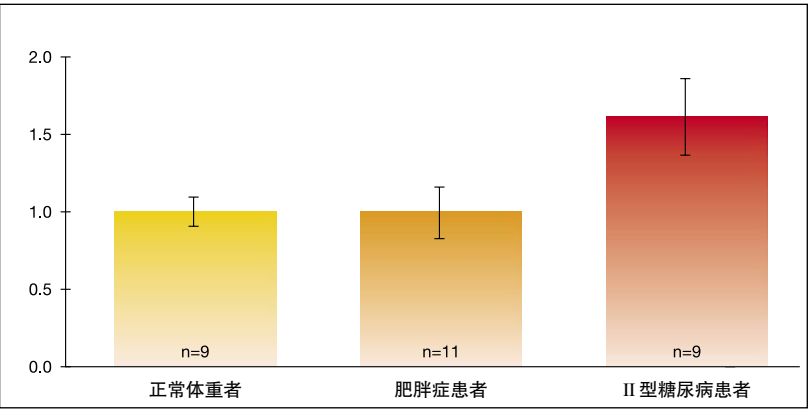


图 2：三组不同来源的脂肪组织中瘦素受体的表达水平（每组数据取标准均数与对照组比对）

结果

通过将 Eppendorf Biophotometer 分光光度计与无 RNase 的塑料比色皿 Uvette 配合使用可以精确测定 RNA 浓度。

一般来说，大约从肌肉组织中提取 60 µg 的总 RNA，而从脂肪组织中提取 20 µg 的总 RNA。经过定量 PCR 分析，三组不同来源的肌肉组织中瘦素受体的表达水平未发现明显差异（图 1）。同样的，脂肪组织中瘦素受体的表达水平也未发现明显差异（图 2）。此外，也未发现与 BMI、年龄或其他实验室参数如血中甘油三酯浓度之间的相关性。

讨论

综上所述，在正常体重者、肥胖症患者与 II 型糖尿病患者的外周组织如肌肉组织与脂肪组织中，瘦素受体的表达水平未发现明显差异。

依据以上结果，今后可以着眼于诸如下丘脑或其他信号传导的机制等方向进行研究。

由于 Uvette 无 RNase 污染的特性及微量的检测体积，证明 Uvette 有助于对 RNA 进行定量测定。其单个独立包装开袋，可直接从包装中取出进行 RNA 测定，无需预处理烦琐的步骤，充分保障了实验的精确性与结果的可信度。

作者 Britta Schwarzloh,
Antje Böttcher & Petra Algenstaedt;
Department of Internal Medicine,
University Clinic Hamburg-Eppendorf,
Germany