

大肠杆菌 poly (A) 化 mRNA 基因的芯片制备*

胡子有 马文丽** 李 凌 张 宝 吴清华

(第一军医大学分子生物学研究所 广州 510515)

摘要: 利用大肠杆菌 mRNA 中存在的一定程度的 poly (A) 现象, 利用 oligo (dT) 与 poly (A) 特异结合的特性, 纯化并逆转录 mRNA, 并应用 RD-PCR 方法获得了 170 多条大肠杆菌 poly (A) 化 mRNA 的基因片段, 利用这些片段打印成基因芯片, 以供后续大肠杆菌的基因表达研究。

关键词: 大肠杆菌, 基因芯片, RD-PCR

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 02-0028-05

cDNA MICROARRAY PREPARATION OF *E. COLI* mRNA WITH POLY (A) TRACTS

HU Zi-You MA Wen-Li LI Ling¹ ZHANG Bao WU Qing-Hua

(*Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515*)

Abstract: mRNA with poly (A) tracts was enriched from total RNA of *E. coli* with oligo (dT) -cellulose. After reverse transcription was performed using oligo (dT) 18 as primer, double stranded cDNA was synthesized. More than

* 广州市重点科技攻关项目 (No.99-Z-022-01)

** 联系人 Tel: (020) 85148210, Fax: (020) 61647755 E-mail: wenli@fimmu.edu.cn

作者还有: 宋艳斌, 郭秋野, 郑文岭 (广东军区总医院分子肿瘤研究所 广州 510010)

收稿日期: 2002-04-15, 修回日期: 2002-05-20

170 gene fragments were obtained by RD-PCR technique. These gene fragments were dotted onto glass slides substrate to make cDNA microarray. The cDNA microarray will be used to explore the gene expression profiling in *E. coli*.

Key words: *E. coli*, cDNA microarray, RD-PCR

大肠杆菌的 mRNA 3' 端虽然亦存在多聚腺苷酸化现象 (polyadenylation, poly (A)), 但通常比真核生物的 poly (A) 尾短得多, 一般在 15 ~ 60 bp 左右, 且对于某种 mRNA 只有 2% ~ 60% 的分子被 poly (A) 化^[1]。mRNA 加尾在真核细胞与原核细胞中的差异机制, 目前尚未阐明。从进化过程推测, 一般认为, poly (A) 加尾程度越高, mRNA 的功能越成熟、结构越稳定。为进一步探讨其机制, 我们利用 oligo (dT) 与 poly (A) 特异结合的特性, 以 oligo (dT) - cellulose 纯化 mRNA, 并以 oligo (dT) 18 为引物逆转录合成 cDNA, 应用限制性显示 PCR (Restriction-Display PCR, RD-PCR) 方法^[2,3] 共获得 170 多个基因片段。将这些基因片段扩增后, 打印成芯片, 以供下一步对大肠杆菌 poly (A) 化 mRNA 基因的表达特性进行研究。

1 材料与方法

1.1 材料

主要试剂和材料: Tryptone, Yeast Extract 购自英国 Oxoid 公司, 溶菌酶购自上海伯奥生物科技公司, mRNA 纯化试剂盒、小量质粒提取试剂盒购自美国 Omega Biotek 公司, 逆转录酶 superscript II 购自美国 Life Technologies 公司, DNase I、oligo (dT) 18、*E. coli* DNA polymerase I、*E. coli* RNase H、*E. coli* DNA Ligase、RNase inhibitor、限制性内切酶 *Sau*3A I、Premix Taq、pMD18-T vector、T4 DNA Ligase 等购自大连宝生物工程有限公司。菌株 XL-1 为本室保存。接头和 PCR 引物均由上海生物工程公司合成。组成接头的两个寡核苷酸分别为 SIP: 5' pGATC⁺CACACCAGCCAAACCCA, SIR: 5' GGTITGGCT-GGTGTG。通用引物 M: 5' GTTITGGCTGGTGTGGATC。RD-PCR 选择性引物是在通用引物 3' 端分别延伸一个碱基 (G、A、T、C) 而得: MG、MA、MT、MC。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养: 取保存的 XL-1 菌株, 平板划线后于 37℃ 培养 24 h, 挑取单菌落转移至 100 mL 液态 LB 中, 37℃, 200 r/min 培养 8 h, 测 OD_{600} 约为 0.6。

1.2.2 总 RNA 的制备和 mRNA 纯化: 总 RNA 制备按文献 [4] 进行, DU530 紫外分光光度计进行定量, 取 2 μ g 总 RNA 于 1.5% Agarose 电泳。并对提取的总 RNA 用 RNase free 的 DNase I 进行消化, 以防痕量基因组 DNA 污染。DNase 消化后的总 RNA 用 Omega Biotek 的 E.Z.N.A mRNA Enrichment kit 分离纯化出 mRNA, 按说明书操作。

1.2.3 cDNA 合成: cDNA 第一链合成, 以 oligo (dT) 18 为引物, 按 Superscript II 的说明书进行, 第二链的合成按文献 [5] 进行, 各种酶用量有所调整。逆转录设立实验组和两个对照组同步进行。纯化所得的 mRNA 均分为两等份, 一份为实验组 (mRNA 为模板, oligo (dT) 18 为引物) 的逆转录模板, 另一为阴性对照组 (逆转录过程中未加 oligo (dT) 18 引物), 此外实验还设立了空白对照组 (未加 mRNA, 但加了 oligo (dT) 18)。

1.2.4 接头的制备: 取等摩尔浓度的寡核苷酸片段 SIP (500 mg/L) 和 SIR (330 mg/L) 等体积于一个 PCR 管内混匀, 然后在 PCR 仪上加热至 90℃, 然后在 30 min 内逐渐降至

室温,形成的接头经分装后,贮藏于 -20°C ,备用。

1.2.5 RD-PCR:按文献[2,3]进行,具体简述如下:将逆转录所得的cDNA约 $1\mu\text{g}$,用 *Sau*3A I $1.5\mu\text{L}$,于 $20\mu\text{L}$ 总反应体积中, 37°C 酶切3h。取酶切产物 $5\mu\text{L}$ 和制备的接头 $6\mu\text{L}$,用 T4 DNA ligase $1\mu\text{L}$, $30\mu\text{L}$ 总反应体积, 16°C 连接3h,即可用作RD-PCR的模板。取连接产物 $1\mu\text{L}$, $2\times$ Premix Taq $25\mu\text{L}$,配对的选择性引物(如MG和MA,浓度均为 $10\mu\text{mol/L}$)各取 $0.75\mu\text{L}$, $50\mu\text{L}$ 总反应体积进行PCR。PCR反应条件: 94°C 变性5min;然后 94°C 30s、 65°C 30s、 72°C 1min,共35循环;最后 72°C 延伸6min。4种不同的选择性引物(MG、MA、MT、MC)共有10种不同的组合,PCR分成10组进行。对照组按实验组的相应体积进行处理。

1.2.6 RD-PCR产物片段的克隆和测序:PCR产物无须纯化,可直接用于与T载体的连接,具体操作参见pMD18-T vector说明书。JM109菌株感受态制备及转化按文献[6]进行。经快速PCR鉴定后,小量培养阳性菌落后提取质粒,DU530测定浓度,并编号索引。本室310 DNA测序仪测定。

1.2.7 cDNA片段的大量扩增:利用提取的质粒作模板,以通用引物进行PCR反应,进行大量扩增并进行浓缩。PCR反应体积为 $100\mu\text{L}$,加入约200ng质粒作模板,PCR反应条件同前。PCR扩增后,约取 $3\mu\text{L}$ 进行电泳鉴定。将反应液转入 0.5mL 的离心管中,加等体积的异丙醇,室温放置30min后, $12,000\text{ r/min}$ 离心15min,去除上清,用70%乙醇洗涤,真空抽干5min,加 $10\mu\text{L}$ 去离子灭菌水溶解沉淀,用DU530紫外分光光度计进行定量后,加入适量体积DMSO,使DNA浓度为 $0.3\mu\text{g}/\mu\text{L}$,以保证芯片上的靶基因片段的量相对杂交标记样品是过量的,经索引编号,用来作为制备芯片的靶点探针,于 -20°C 保存。少数经1次 $100\mu\text{L}$ 扩增达不到浓度的可再扩增1次,合并两次所得,一般都能达到所需的浓度。

1.2.8 cDNA芯片的制备与质量检测:(1)cDNA芯片的制备:芯片制备所用的靶基因片段包括用上述方法制备的171个大肠杆菌poly(A)化mRNA的cDNA基因片段;同时还用2条HIV基因片段(实验室李凌博士提供)作为阴性对照,大肠杆菌*crp*(cyclic AMP receptor protein基因,为已知存在poly(A)化的大肠杆菌的基因[1])基因片端(设计引物,PCR扩增获得)作为阳性对照,同时还使用50%DMSO打印18个位点,作为阴性背景对照。用Pixsys5500(Cartesian公司)点样仪及Corning公司的氨基硅烷化玻片进行点样,每个样品重复3个点。然后经GS Gene Linker UV Chamber紫外交联仪 $100\text{mJ}/\text{cm}^2$ 交联(购自BIO-RAD公司), 80°C 干烤2h处理将DNA变性固定在玻片上,室温避光干燥保存,备用。(2)cDNA芯片的质量检测:为了验证基因芯片上的点阵的每个位点的基因片段是否都已打印固定在玻片上,以cDNA酶切片段加接头的连接产物为模板,用cy3标记的通用引物进行PCR标记,PCR反应条件同前,PCR反应后产物用博彩公司的PCR产物纯化试剂盒进行纯化,用适量的无菌水溶解使其终浓度为 $30\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。将该荧光标记探针用于与所制的基因芯片进行杂交(杂交和杂交后洗脱操作按Corning公司氨基化玻片说明书进行),然后用ScanArray lite激光共聚焦荧光扫描仪(GSI lumonics公司)对杂交结果进行扫描,用QuantArray软件分析扫描信息。

2 结果

2.1 细菌的总 RNA 质量鉴定

总 RNA 电泳图 (图 1) 可见明显的 23S, 16S, 5S 条带, 23S 约是 16S 的两倍, 总 RNA 质量非常好, 未见明显的基因组 DNA 污染。用 RNase free 的 DNase I 进行消化后, 在电泳图上未见 DNA 污染。

2.2 10 组不同引物组合的 PCR 反应结果

组 aa、at、ac、ag、tt、tc、cc 有 10 多条带, 组 cg 有 8 条左右, 组 tg 带少, 且亮度明显弱于其它组。片段连接克隆后, 快速 PCR 鉴定结果初步表明实际每组所含片段多于图示或紫外透射仪下所见条数。图 2 示条带主要分布于 250~750 bp。两个对照组的 PCR 产物电泳鉴定未见任何条带 (未附图)。

2.3 菌落克隆的快速 PCR 鉴定

随机挑取 α 互补阴性克隆, 进行 PCR 快速鉴定, 每组选取将近 20 个大小不同的克隆经小量培养并提取其质粒, 质粒提取使用 Omega Biotek 小量质粒提取试剂盒进行, 并进行测序鉴定。

2.4 芯片质量验证

见图 3。芯片上大部分的靶点的杂交都呈现出一定的杂交信号, 而 HIV 基因片段位点 (最右下角 6 个位点) 和阴性背景对照 (箭头所指示) 的位点均为阴性, 阳性对照位点 (位于 HIV 阴性对照位点前的 3 个位点) 呈现较强信号, 表明探针的打印效果良好, 靶位点上固定的探针是可靠的。至于位点之间杂交信号存在较大差异 (信号强弱依次为: 白色 > 红色 > 绿色 > 蓝色) 可能主要是由于作为标记 PCR 模板的酶切加接头连接产物中不同的基因片段在原始数量上不同, 同时 PCR 扩增效果也存在一定的差异引起。

3 讨论

大肠杆菌的基因芯片已有初级产品 (Sigma-Gensys Biotechnologies), 利用大肠杆菌的基因组测序结果, 针对其已知基因和用 GeneMark 软件推测的 ORF 设计特异引物, 进行 PCR 扩增出特异基因片段, 然后将这些基因打印成芯片, 使用这种芯片可以对大肠杆菌的基因表达进行检测^[7-9]。我们应用 RD-PCR 技术获得 170 多个大肠杆菌 ploy (A) 化 mRNA 的基

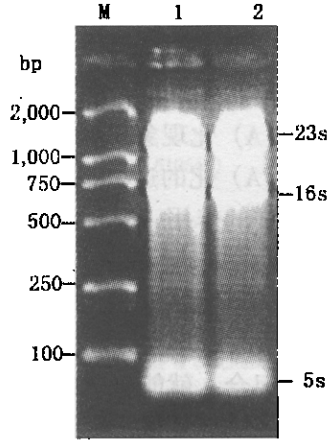


图 1 大肠杆菌总 RNA 电泳图

- 1 DNase 酶消化前的总 RNA,
- 2 DNase 酶消化后的总 RNA,
- M DNA marker DL 2000

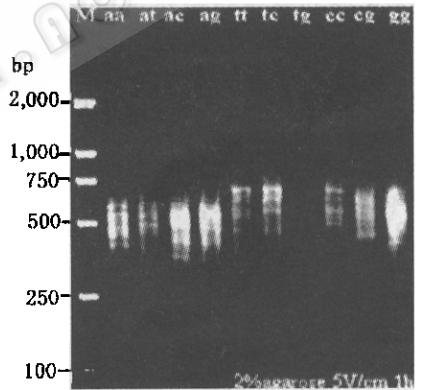


图 2 RD-PCR 产物电泳图

aa、at、ac 等指 4 个选择性引物的不同组合

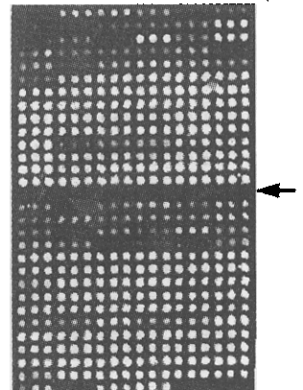


图 3 芯片杂交图

因片段(实验组和对照组的 RD-PCR 实验结果表明用于制备芯片的基因片段的是来源于大肠杆菌 poly(A) 化 mRNA 的基因), 并将其打印成芯片, 这种芯片有其独特的一面, 即所有基因片段对应为 poly(A) 化或 poly(A) 现象较为明显的 mRNA。细菌的 poly(A) 化现象不同于真核生物, 只有部分基因存在 poly(A) 化现象, 细菌中存在 poly(A) 化的这些基因其生物学功能是否有其特殊的一面, poly(A) 在细菌代谢中起了怎样的作用, 目前都缺乏研究。我们制成的芯片将为以后的大肠杆菌 poly(A) 化 mRNA 的表达检测, 为观察在各种营养状况和环境因素下这些基因表达的变化和了解 poly(A) 化在细菌中的作用提供了一定物质基础。

另外, 本文采用的 RD-PCR 方法获取的基因片段, 只需四条选择性引物, 共 10 对引物组合, 就能有效的克隆 170 余个基因片段, 应用这种方法获取制作基因芯片所需的大量靶基因片段的价值值得进一步的探索研究。

参考文献

- [1] Sarkar N. *Annu Rev Biochem*, 1997, **66**: 173 ~ 197.
- [2] Kamik P, Gopalakrishna Y, Sarkar N. *Gene*, 1986, **49** (1): 161 ~ 165.
- [3] 郑文岭, 马文丽, Cater V W. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶 (PAP) 的差异表达技术. 见: 叶鑫生, 沈培奋主编, 细胞调控探索. 北京: 北京军事医学科学出版社, 1998.73 ~ 79.
- [4] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* *Short Protocols in Molecular Biology*. 3rd ed, New York: John Wiley & Sons Inc, 1995, **44**: 4 ~ 11.
- [5] 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术 (第二版). 长沙: 湖南科学技术出版社. 1997.201 ~ 206.
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.49 ~ 55.
- [7] Arfin S M, Long A D, Ito E T, *et al.* *J Biol Chem*, 2000, **275** (38): 29672 ~ 29684.
- [8] Barbosa T M, Levy S B. *J Bacteriol*, 2000, **182** (12): 3467 ~ 3474.
- [9] Wei Y, Lee J M, Richmond C, *et al.* *J Bacteriol*, 2001, **183** (2): 545 ~ 556.