

基于荧光染料 Cy5.5 标记的引物延伸法鉴定细菌 RNA 剪切加工位点

王娜, 李苹, 邱子立, 许成钢*

山西大学生物技术研究所, 山西 太原 030006

王娜, 李苹, 邱子立, 许成钢. 基于荧光染料 Cy5.5 标记的引物延伸法鉴定细菌 RNA 剪切加工位点[J]. 微生物学通报, 2023, 50(6): 2666-2676.

WANG Na, LI Ping, QIU Zili, XU Chenggang. Fluorescence dye Cy5.5-based primer extension technique determines RNA cleavage sites of bacteria[J]. Microbiology China, 2023, 50(6): 2666-2676.

摘 要:【背景】传统引物延伸法常与放射性标记结合使用,但由于放射性元素半衰期短、危害人体健康及严格的操作要求等限制了其在一般实验室的广泛使用。因此,开发新型非放射性引物延伸法成为当前研究的热点。【目的】建立非放射性的引物延伸法,并利用该方法实现对细菌 RNA 剪切加工位点的鉴定。【方法】将包含 RNA 剪切位点的序列克隆至双荧光报告系统,然后利用荧光染料 Cy5.5 标记的特异性靶向 *mcherry* 寡核苷酸引物进行延伸,并辅以 Northern blotting、RT-qPCR 等技术,确定 RNA 剪切加工的精确位点。【结果】鉴定了来自解纤维梭菌 *cip-cel* mRNA 中的 2 个剪切加工位点均位于颈环结构下游的单链区域,且在剪切位点附近未发现保守序列。【结论】基于 Cy5.5 标记的引物延伸法能够精确鉴定 RNA 剪切加工位点,且与传统的放射性引物延伸法相比,该方法具有更高的安全性和更快的检测速度,能够满足一般实验室的实验要求。
关键词: 近红外荧光染料; Cy5.5 标记的探针; 非放射性; 引物延伸法; 细菌 RNA 剪切位点

资助项目: 国家自然科学基金(31871252, 31571282, 32170053); 山西省自然科学基金(201901D211195); 山西省高等学校中青年拔尖创新人才支持计划

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31871252, 31571282, 32170053), the Natural Science Foundation of Shanxi Province (201901D211195), and the Program for the Innovative Talents of Higher Education Institutions of Shanxi Province.

*Corresponding author. E-mail: xucg@sxu.edu.cn

Received: 2022-08-17; Accepted: 2022-11-13; Published online: 2022-12-28

Fluorescence dye Cy5.5-based primer extension technique determines RNA cleavage sites of bacteria

WANG Na, LI Ping, QIU Zili, XU Chenggang*

Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

Abstract: [Background] Traditional primer extension assay usually uses radioactive probes to identify the start sites of transcription and processing sites of transcripts. However, the application of this method in general laboratories is limited because of the short half-life, health hazards, and waste disposal issue of radioisotope-labeled primers. [Objective] To develop a non-radioactive method of primer extension by employing near-infrared fluorescent cyanine dye Cy5.5 and then employ this method to identify the RNA cleavage sites of bacteria. [Methods] The sequence harboring RNA cleavage sites was inserted into the dual-luciferase reporter assay system, and then the Cy5.5-labeled oligonucleotides primer specific to *mcherry* was used for primer extension. The RNA cleavage sites were precisely identified by Northern blotting and Cy5.5-based primer extension technique. [Results] Two processing sites of *cip-cel* mRNA were identified, which located in the downstream region of the stem-loop. However, no conserved sequence was identified near the processing sites. [Conclusion] Compared with radioactive isotope-based primer extension methods, the Cy5.5-based primer extension technique not only efficiently determines processing sites of RNA molecules but also avoids the use of hazardous radioactive isotope reagents for labeling and shortens the processing time, which suggests that the Cy5.5-labeled probe is suitable for primer extension assay.

Keywords: near-infrared fluorescent dye; Cy5.5-labeled probe; non-radioactive; primer extension; RNA cleavage sites of bacteria

引物延伸作为一种用来鉴定转录起始位点或 RNA 剪切加工位点的分子生物学方法, 主要用于确定 RNA 分子的 5' 末端, 其分辨率最高可达到单碱基^[1-4]。该方法的工作原理是利用尿素变性聚丙烯酰胺凝胶同时分离 cDNA 片段与双脱氧链终止反应产物, 通过比较分析 cDNA 片段及与其对应的测序 ladder 确定 RNA 分子的 5' 末端, 成功鉴定转录起始位点或 RNA 剪切加工位点(图 1)^[5]。传统的引物延伸反应主要与放射性同位素结合使用(常见的为 ³²P 标记), 通过放射自显影定位 cDNA 的 5' 末端^[6], 虽然灵敏度较高, 但由于放射性引物半衰期短、危

害人体健康、废物处理问题和复杂的操作程序等一系列缺点, 限制了其在一般实验室中的使用。值得注意的是, 尽管安全性较高的非放射性标记(如地高辛、生物素等)逐渐发展并取代传统放射性标记, 但其探针主要由配体修饰, 通过配体特异性蛋白与试剂盒中的酶偶联杂交后进行检测, 制备和检测程序比较复杂^[7-11]。

近年来, 近红外荧光生物成像技术由于良好的水溶性、较小的生物样本光损伤和较低的生物毒性等引起了人们越来越多的关注^[12-14]。与可见光波段相比, 花菁染料(如 Cy5.5)等近红外荧光(infrared fluorescent, NIRF)染料除了具有较

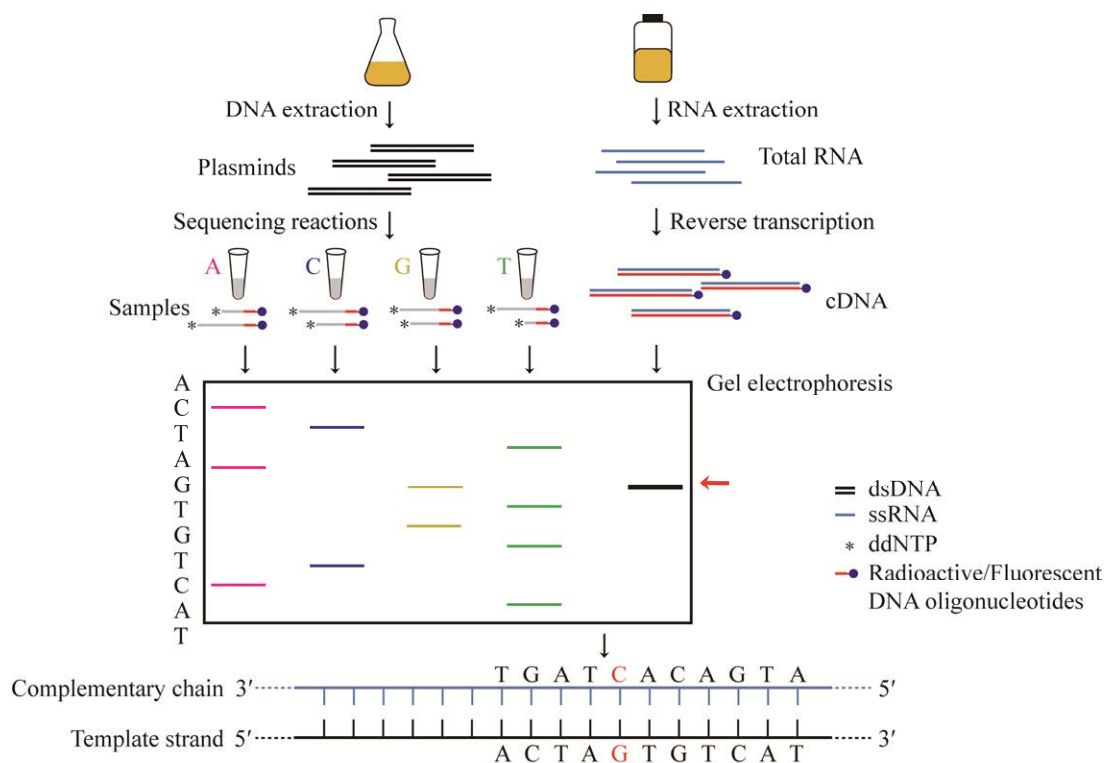


图1 引物延伸示意图

Figure 1 Overview of primer extension procedure.

宽的光学波段范围(700–1 700 nm)、较低的背景荧光干扰等,还具有高灵敏度、高信噪比及特异的组织或细胞靶向性,因而被广泛用于荧光成像^[15-18],在研究生物分子功能、药物分布和代谢以及肿瘤的诊断与靶向治疗中发挥重要的作用。

随着非放射性染料在生物学领域的广泛应用和发展,本研究旨在开发一种基于荧光染料Cy5.5标记且相较于传统的方法更加安全高效的引物延伸法,以期能够精确鉴定解纤维梭菌(*Runminiclostridium cellulolyticum*) *cip-cel* mRNA中的剪切加工位点,同时为精确探究不同转录本转录起始位点或RNA剪切加工位点提供一种更加安全可靠的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 菌种培养

研究所用菌种和质粒见表1。解纤维梭菌

(*R. cellulolyticum*) ATCC35319 需在GS-2培养基^[20]中,以纤维二糖为碳源、35 °C厌氧静置培养。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 及其转化后的细胞在LB培养基中37 °C、180 r/min振荡培养12–16 h。40 μ g/mL的红霉素和100 μ g/mL的氨苄青霉素分别用于解纤维梭菌或大肠杆菌转化子的筛选。

1.2 主要试剂和仪器

Taq DNA聚合酶、DNA Marker,北京全式金生物技术有限公司;T4 DNA连接酶、限制性内切酶、M-MLV反转录酶,宝生物工程(大连)有限公司;DNA Gel/PCR Purification MiniPrep Kit、Plasmid MiniPrep Kit、HiScript[®] III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) Kit和ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix,南京诺唯赞生物科技有限公司;RNase-Free DNase Set、EZ-10 Total RNA Mini-Prep Kit、Cy5.5

表 1 实验中所用的菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌种与质粒 Strains and plasmids	描述 Description	来源 Source or reference
Strains		
<i>E. coli</i> DH5 α	80d <i>lacZ</i> Δ M15, Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169, <i>endA1</i> , <i>recA1</i> <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>supE44</i> λ^- <i>thi-1</i> <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i> , <i>phoA</i>	Transgene
<i>R. cellulolyticum</i> H10 Δ <i>MspI</i>	Derived from <i>Ruminiclostridium cellulolyticum</i> H10 with the <i>MspI</i> deleted	Granted from Cui et al ^[19]
Plasmids		
pMTC6	pIMPI derivative expression vector bearing <i>fbfp</i> gene	This study
pIR2	pMTC6 derivative expression vector bearing intergenic regions genes (IR2)	This study
pIR5	pMTC6 derivative expression vector bearing intergenic regions genes (IR5)	This study

标记的荧光引物及其他常规引物合成和测序, 生工生物工程(上海)股份有限公司; USB[®]Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit, 赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 红霉素、氨基青霉素, 北京索莱宝公司; Trizol 试剂, 上海翊圣生物科技股份有限公司; 尼龙膜, GE HealthCare 公司。

CFX Connect Real-Time PCR Detection System、电转仪、真空转印仪, Bio-Rad 公司; Odyssey CLx 红外激光双色图像分析系统, LI-COR Biosciences 公司; JYCX1B 型测序电泳槽, 北京君意东方电泳设备有限公司; 组合型分子杂交箱, 耶拿分析仪器股份公司; 高速台式离心机, Eppendorf 公司。

1.3 解纤维素梭菌的电转化

将 0.5 mL *R. cellulolyticum* 培养液($OD_{600}=0.5$)接种于 50 mL GS-2 培养基中, 35 °C 厌氧静置培养 17–24 h 至指数生长中后期($OD_{600}=0.5-0.7$)后, 冰浴 30 min, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体。用 10 mL 预冷的电转缓冲液(0.275 mol/L 蔗糖, 0.005 mol/L 磷酸氢二钾, pH 6.5)洗涤菌体 2–3 次。最后用 1 mL 预冷的电转缓冲液重悬制备感受态细胞。每 200 μ L 感受态细胞加入 1 μ g 质粒, 充分混匀后转移至 2 mm 电转杯, 于电压 1.6 kV、电阻 400 Ω 、电容 25 μ F 条件下进行电击。电击后细胞迅速转至 35 °C 预热且

无抗性的 GS-2 培养基中复苏培养 12 h, 然后涂布于红霉素抗性(20 μ g/mL)的 GS-2 固体平板, 静置培养 3–5 d 后挑取单克隆。

1.4 RNA 的提取

收集 50 mL 培养至指数生长中后期($OD_{600}=0.5-0.7$)的 *R. cellulolyticum*, 8 000 r/min 离心 10 min 收集细胞, 重悬于 1 mL Trizol 裂解细胞, 然后通过 EZ-10 Total RNA Mini-Prep Kit 提取总 RNA, 并用 RNase-free DNase Set 去除基因组 DNA。RNA 样品保存于 -80 °C 备用。

1.5 Northern blotting

取 5 μ g 总 RNA 通过 1% 甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离, 然后使用真空转移装置在 Transfer buffer (20 \times SSC, 3 mol/L 氯化钠, 0.3 mol/L 柠檬酸三钠)作用下将其印迹到尼龙膜上并通过紫外交联固定, 42 °C 与特异性靶向 *fbfp* 和 *mcherry* 的 Cy5.5 标记 DNA 探针杂交过夜。杂交之后的尼龙膜利用 Odyssey CLx 红外激光双色图像分析系统检测荧光信号^[7]。

1.6 Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

利用 Hiscript[®]III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) Kit 按照说明书将 RNA 逆转录得到 cDNA。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): cDNA 模板 500–1 000 ng, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L (引物序列见表 2)、2 \times ChamQ Universal

表 2 实验中设计的引物与探针

Table 2 Primers and probes used in this study

引物/探针名称 Primers/Probes	引物/探针序列 Sequence (5'→3')	描述及产物长度 Description and products of sizes (bp)
Primers		
IR2_F	GGAAGATCTTATTTAATACTATGACGCATATG	To amplify the intergenic region of <i>cel48F-cel8C</i> (IR2); 128
IR2_R	CTTCTCCTTTTGATAACCATGTTCTTACCTTAATCCTTTTC	
IR5_F	GGAAGATCTTTTGAAGTTTATTTGGAAC	To amplify the intergenic region of <i>cel9E-orfX</i> (IR5); 168
IR5_R	CTTCTCCTTTTGATAACCATGGCTTTTCTCCTTATTTATTC	
fbfp_F	ATGATAAATGCAAACTTCTTCAGC	To amplify the DNA fragment of <i>fbfp</i> ; 447
fbfp_R	TTAATGTTTTGCCTGACCCTG	
mcherry_F	ATGGTATTCAAAAAGGAGAAGAAG	To amplify the DNA fragment of <i>mcherry</i> ; 711
mcherry_R	TTATTTATAAAGTTCATCCATTCCTCC	
qPCR_fbfp_F	CATGATCAGCCTGGTATAGC	To clone <i>fbfp</i> fragment for qPCR; 200
qPCR_fbfp_R	TCTTCTGCAAATACCTGTGCT	
qPCR_mcherry_F	ATTTTCCTTCAGATGGACCTGT	To clone <i>mcherry</i> fragment for qPCR; 200
qPCR_mcherry_R	ATTATATGCTCCAGGAAGCTGT	
qPCR_Ccel_0312_F	AGATACTAAGCTCGGTCCTGA	To clone <i>Ccel_0312</i> fragment for qPCR; 200
qPCR_Ccel_0312_R	CACCAAAGATCGCTCTAAGCA	
Probes		
*fbfp_probe	GCTGAAGAAGTTTTGCATTTATCAT	To probe gene <i>fbfp</i>
*mcherry_probe	CTCGTCTTCTCTGTAAGTTGTCCTCCT	To probe gene <i>mcherry</i>
*mcherryPE_R	ATTGCCATATTATCTTCTTC	To target 5' end of processed transcripts

SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, ddH₂O 补足 20 μ L。混匀后在 CFX Connect Real-Time PCR Detection System 上分别对基因 *fbfp* 和 *mcherry* 的表达水平进行检测。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 3–10 s, 60 $^{\circ}$ C 10–30 s, 共 40 个循环。溶解曲线反应条件: 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s。基因的相对表达水平以 *Ccel_0312* (编码 RNA 聚合酶 β 亚基) 为内参对照。按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法对结果进行分析。

1.7 引物延伸分析

首先, 以 *Mlu* I 单酶切后的重组质粒为模板, Cy5.5 标记的探针 *mcherryPE_R 为特异性引物, 利用 USB[®] Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit 进行单引物扩增, 通过双脱氧链终止法获得测序 ladder 产物。同时, 以该荧光探针

*mcherryPE_R 为特异性引物, 使用反转录酶 M-MLV 逆转录总 RNA 获得 cDNA。然后, 将变性的测序 ladder 产物和 cDNA 样品同时经 8% 尿素变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。最后, 利用 Odyssey CLx 红外激光双色图像分析系统检测荧光信号。通过比较 cDNA 与测序 ladder 条带, 确定所检测 RNA 的剪切加工位点。

2 结果与分析

2.1 基于双荧光系统的重组质粒构建

纤维小体是 *R. cellulolyticum* 分泌的一种高分子量的多酶复合体, *cip-cel* 操纵子作为编码纤维小体中纤维素酶的基因簇, 主要含有 12 个编码关键酶亚基的基因。我们前期研究已经发现该操纵子基因间隔区(intergenic regions, IRs)中

至少存在 5 个剪切加工位点^[21]。在此基础上, 以 IR2 和 IR5 为例, 分别构建含有该基因间隔区的重组质粒, 对其存在的剪切加工事件进一步分析验证。以 *R. cellulolyticum* 基因组为模板, 利用寡核苷酸引物(表 2)分别克隆 *cip-cel* 操纵子中的 IR2 和 IR5。将扩增得到的基因间隔区片段分别与红色荧光基因 *mcherry* 通过重叠延伸 PCR (single overlap extension PCR, SOE-PCR)进行融合, 融合片段经限制性内切酶 *Bgl* II 和 *EcoR* I 双酶切后插入到质粒 pMCT6

的对应位点, 与绿色荧光基因 *fbfp* 共同在 *Pthl* 启动子调控下融合表达(图 2A)。构建好的重组质粒(分别命名为 pIR2、pIR5)经 PCR 扩增和限制性内切酶酶切鉴定。1%琼脂糖凝胶电泳结果显示, 在 2 个重组质粒中均观察到了与设计插入的目的片段大小一致的 DNA 片段, 分别为 839 bp 和 879 bp (图 2B、2C)。此外, DNA 测序分析也验证了插入片段序列的正确性。这些结果充分表明重组质粒 pIR2 与 pIR5 构建成功, 随后将重组质粒电转化导入 *R. cellulolyticum* 中。

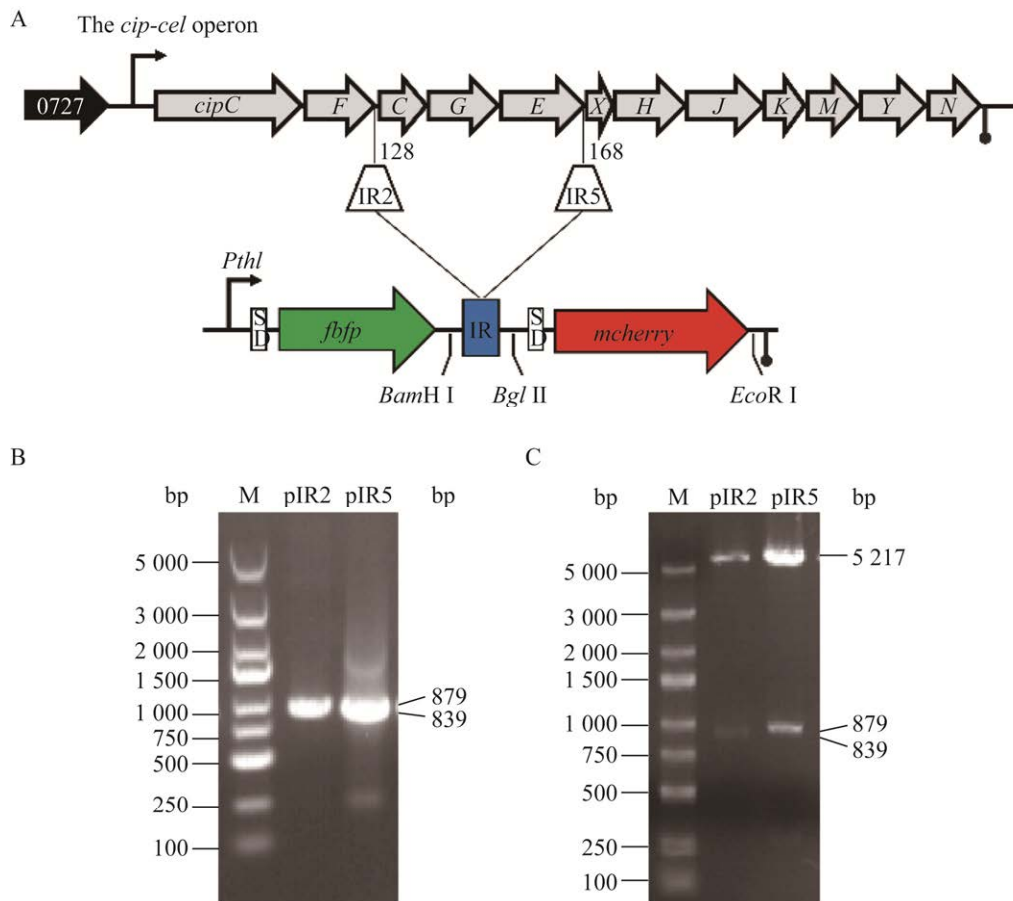


图 2 基于双荧光报告系统的重组质粒构建 A: 重组质粒构建示意图. B: PCR 扩增鉴定重组质粒. C: *Bgl* II 和 *EcoR* I 双酶切鉴定重组质粒

Figure 2 Construction of recombinant plasmids based on dual-luciferase reporter system. A: IRs (IR2 and IR5) from the *cip-cel* operon were respectively inserted into the reporter system. B: The resulted plasmids were identified by PCR. C: The resulted plasmids were digestion of *Bgl* II and *EcoR* I.

2.2 荧光引物的设计和分析

在引物延伸分析中,当用于和目标序列杂交的寡核苷酸引物位于距所预测的转录起始或剪切加工位点 150–200 bp 以内时,所得到的检测结果最准确。依据此原理,选择在红色荧光基因(*mcherry*)起始密码子下游 35 bp 处设计反向 Cy5.5 标记的寡核苷酸荧光引物 **mcherry*PE_R (图 3A)。引物长度为 25 bp, 3'末端为 C 碱基且 GC 含量为 30%, 无任何自身二级结构。为了进一步检测所设计荧光引物的扩增效率和扩增特异性,利用 IR2_F/**mcherry*PE_R 和 IR5_F/**mcherry*PE_R 两对引物,以重组质粒 pIR2 和 pIR5 为模板通过常规 PCR 扩增进行分析(图 3A)。结果显示,在 839 bp 和 879 bp 处分别检测到了

较亮的扩增条带且不存在拖尾现象(图 3B)。同时,利用 Odyssey CLx 红外激光双色图像分析系统分析扩增产物所携带的荧光信号,在相同的位置可明显检测到较强的荧光信号(图 3C)。这些结果均显示所设计的荧光引物有很好的特异性和扩增效率,其荧光信号可被荧光成像系统直接检测而无需其他额外步骤,检测过程方便简单。

2.3 IR2 和 IR5 中 RNA 剪切加工的鉴定

为了进一步确定 *cip-cel* 操纵子 IR2 和 IR5 中的 RNA 剪切加工事件,设计并合成能够特异性探测双荧光报告系统中绿色荧光基因(*fbfp*)和红色荧光基因(*mcherry*)的 Cy5.5 标记的 DNA 探针(序列见表 2),通过 Northern blotting 对人

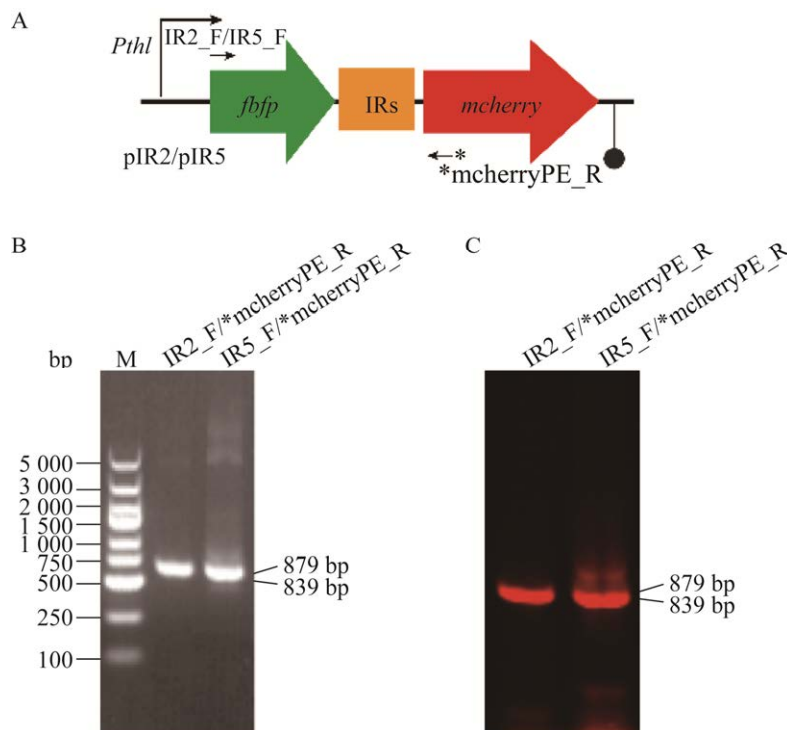


图 3 Cy5.5 标记的荧光引物特异性分析 A: 荧光引物 PCR 检测示意图. B: 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物. C: 荧光成像系统检测 PCR 扩增产物

Figure 3 Specificity of the Cy5.5-labeled primer. A: Schematic representation of the detection of fluorescent primer via PCR. B: The PCR products of fluorescent primer were analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. C: The PCR products were directly detected by fluorescence imaging system.

工操纵子 (*fbfp-Irs-mcherry*) 的转录状态进行分析。结果显示, 与不含剪切序列的对照相比, IR2 和 IR5 还检测到了与荧光基因大小一致的单顺反子转录本的存在(图 4A、4B), 确定 IR2 和 IR5 中包含剪切信号, 能够被核糖核酸内切酶识别剪切。同时 RT-qPCR 结果显示(图 4C、4D), IR2 和 IR5 上、下游基因的转录水平也显著增加, 说明剪切能够促进 RNA 的稳定性。

2.4 引物延伸法鉴定 RNA 剪切加工位点

为了进一步精确分析 IR2 和 IR5 中的 RNA

剪切加工位点, 利用 Cy5.5 标记的引物延伸法对 RNA 剪切加工位点进行鉴定。利用 8% 的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶同时对测序 ladder 和 cDNA 进行分离, 通过分析 cDNA 条带对齐的测序 ladder 确定 mRNA 的 5' 末端。图 5 展示了 IR2 和 IR5 发生 RNA 剪切加工后转录本的引物延伸结果。结果显示, IR2 和 IR5 的 RNA 剪切加工位点均位于 A 碱基附近。对剪切位点附近的序列和结构进行分析发现, 2 个剪切加工位点附近的碱基序列均不具有保守性, 但在其上游均预测到颈环结构的存在。因此, 颈环结构

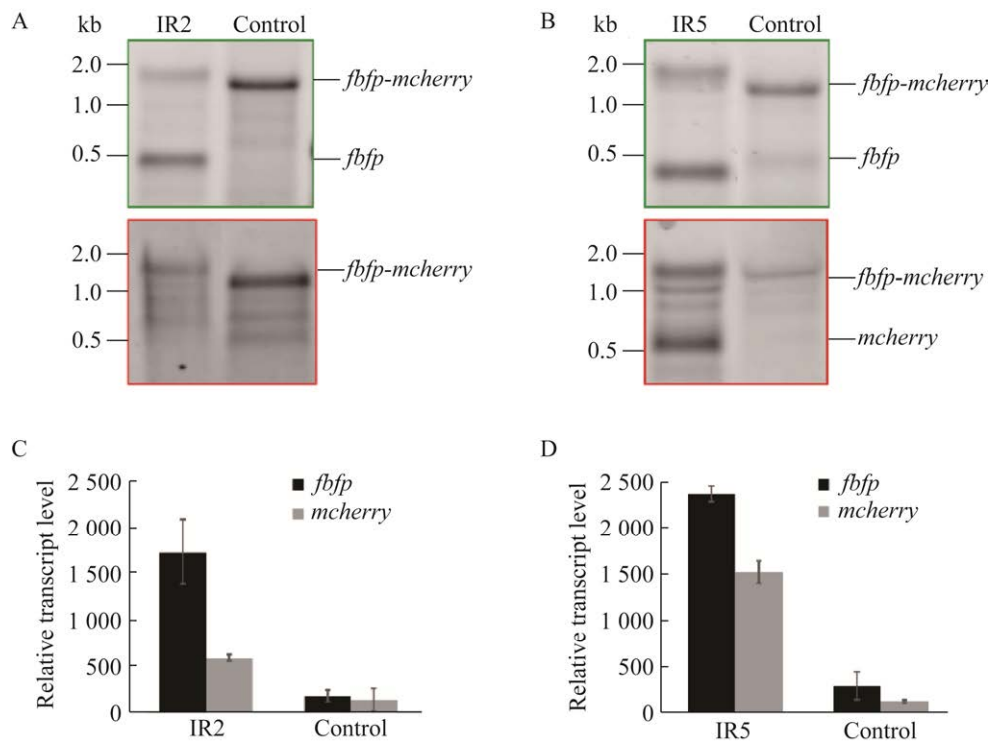


图 4 IR2 和 IR5 中 RNA 剪切加工的鉴定 A、B: 利用靶向 *fbfp* 和 *mcherry* 探针通过 Northern blotting 分别分析 IR2 和 IR5 的 RNA 剪切。C、D: 通过 RT-qPCR 分别分析 IR2 和 IR5 中基因 *fbfp* 和 *mcherry* 的转录水平。以不含 IRs 的重组载体为空白对照。误差条表示 3 次重复实验的平均值的标准偏差

Figure 4 Analysis of RNA processing in IR2 and IR5. A, B: Northern blotting analysis of transcripts using the dual-luciferase reporter system carrying each IR2 and IR5 with *fbfp*- and *mcherry*-targeting probes. C, D: Relative transcription level of *fbfp* and *mcherry* in artificial operons harboring IR2 and IR5 measured by RT-qPCR. No any IRs harbored was as control. Error bars indicate the standard deviation of the mean from experiments done in triplicate.

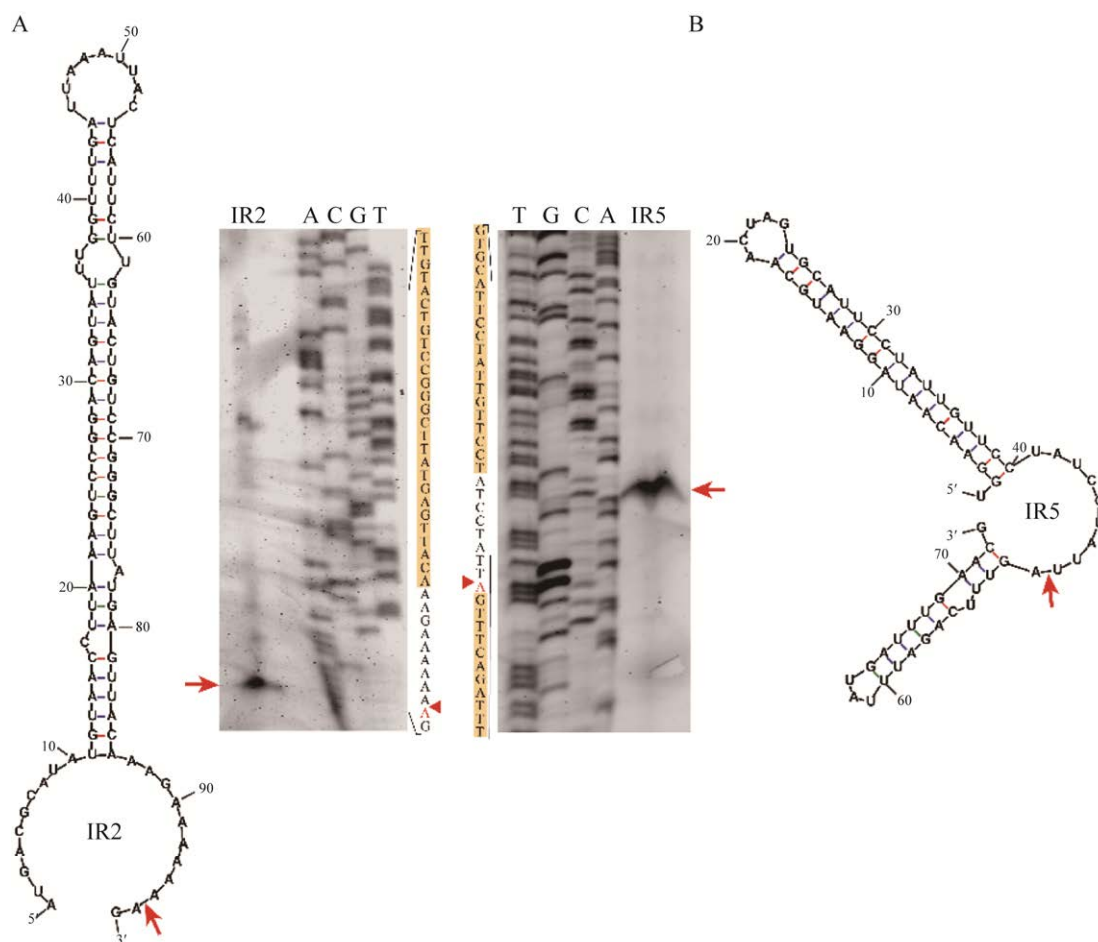


图5 引物延伸鉴定 IR2 (A)和 IR5 (B)中的 RNA 剪切加工位点 RNA 剪切位点用红色箭头指出
Figure 5 RNA cleavage sites of IR2 (A) and IR5 (B) were precisely identified by primer extension assay. Cleavage sites are indicated by red arrows.

可能在控制 RNA 剪切方面起到了关键作用，但其具体的作用机制还需要进一步的探索分析。

3 讨论与结论

在本研究中，我们开发了一种更加安全、简便的利用荧光染料 Cy5.5 标记的引物延伸法，利用该方法精确鉴定了 *R. cellulolyticum* 的 *cip-cel* 操纵子 IR2 和 IR5 中的 RNA 剪切加工位点。该方法不仅有助于探究潜在的作用于 *cip-cel* 操纵子的核糖核酸酶及其所识别的剪切信号，同时也进一步拓展了近红外荧光染料尤其是花菁染料 Cy5.5 在生物技术中的应用。

花菁染料 Cy5.5 作为当前备受关注的一类近红外荧光基团，由于其吸收光谱和发射光谱在近红外区，具有低光谱背景干扰、高灵敏度等特点^[22]，因而广泛用于疾病模型和医药治疗的研究中，如检测细胞程序性死亡^[23-24]、分子构象动力学^[25]、免疫分析^[26]及肿瘤的认识检测^[27-28]等诸多方面。利用 Cy5.5 标记的寡核苷酸探针检测肿瘤中特异性表达的 miRNA^[29]或 lncRNA^[30]的灵敏度和效率也得到了充分验证。同时，本实验室开发的 Cy5.5 标记的荧光探针还成功应用于核酸印迹杂交^[7]。在本研究中，我们验证了 Cy5.5 标记的寡核苷酸引物在引物延伸实验应用

中的可能性,发现 Cy5.5 标记的引物具有良好的特异性和扩增效率,不存在异源延伸产物,此外还具有较高的稳定性以及安全性且制备简单,无需复杂的标记程序。因此,本研究进一步丰富了花菁染料 Cy5.5 在生物领域的应用。

与传统的放射性标记的引物延伸法相比,该方法不仅避免使用危险的放射性同位素标记试剂及后续的废物处理问题,而且还具有诸多优点。(1) 由花菁染料 Cy5.5 标记的引物制备简单,可以从大多数寡核苷酸合成公司订购,无需后续复杂的标记程序便可直接使用,更加提高了实验效率。(2) 放射性引物的半衰期较短,长时间使用的话需要不断重新标记,浪费时间的同时也造成了经济压力,相比而言,荧光标记引物更稳定,可在-20 °C保存长达 1-2 年的时间,更加节约时间和实验成本。(3) 相较于放射性标记后续严苛和烦琐的信号检测程序,荧光信号可被荧光成像系统直接检测而无需对凝胶进行再次处理,检测过程更加方便简单且曝光时间较短。因此,由 Cy5.5 标记的引物延伸法可满足一般实验室对于鉴定转录起始位点或转录后水平剪切加工位点等一系列研究的需求。

然而,基于 Cy5.5 标记的引物延伸法仍然存在一定的缺陷,需要进一步完善和改进。与传统的放射性标记的引物延伸法相比,该方法的检测灵敏度较低,但可以通过提高 cDNA 的上样量或者在反转录反应中提高 RNA 模板的质量和 RNA 的质量来改善这一缺点,从而获得更加准确的结果。值得注意的是,利用引物延伸法鉴定转录起始位点或 RNA 剪切加工位点时,必须做好充分的对照实验,避免不同来源的 RNA 5'末端相互混淆,影响鉴定结果。此外,基于 Cy5.5 标记的引物延伸法对一些转录丰度较高转录本的检测是比较准确的,但对于一些转录丰度较低的转录本,其检测结果不可

避免地存在微小误差,这些误差可能由多种外界因素所致,如反转录的准确性、样品的纯度以及电泳迁移时间等。

REFERENCES

- [1] CAREY MF, PETERSON CL, SMALE ST. The primer extension assay[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2013, 2013(2): 164-173.
- [2] 黎志凤, 张文燕, 刘杨, 曲绍峰, 王岩, 朱丽萍, 李越中. 基于遗传片段分析系统的转录起始位点分析技术: 从预测到结果评估[J]. 微生物学报, 2017, 57(2): 254-263.
LI ZF, ZHANG WY, LIU Y, QU SF, WANG Y, ZHU LP, LI YZ. Transcriptional start site analysis based on genetic fragment analysis system: from prediction to data evaluation[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(2): 254-263 (in Chinese).
- [3] KITAMI Y, HIWADA K. Primer extension analysis to map transcription start sites of vascular genes[J]. Methods in Molecular Medicine, 1999, 30: 133-142.
- [4] GREEN MR, SAMBROOK J. Analysis of RNA by primer extension[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2021, 2021(5): 215-220.
- [5] SCHUSTER CF, BERTRAM R. Fluorescence based primer extension technique to determine transcriptional starting points and cleavage sites of RNases *in vivo*[J]. Journal of Visualized Experiments, 2014(92):e52134.
- [6] NILSEN TW. RNA sequencing by primer extension[J]. Cold Spring Harbor Protocols, 2013, 2013(12): 1182-1185.
- [7] CHENG Y, WANG N, REN ZX, XU CG. Development of fluorescence-based nucleic acid blot hybridization method using Cy5.5 labeled DNA probes[J]. Journal of Microbiological Methods, 2022, 197: 106479.
- [8] QI XT, CHAI XQ, CHAI TY. An improved primer extension method for detection of mRNA start-points using non-radioactive digoxigenin-labeling primers[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(7): 1125-1128.
- [9] HÖLTKE HJ, ANKENBAUER W, MÜHLEGGGER K, REIN R, SAGNER G, SEIBL R, WALTER T. The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labelling and detection of nucleic acids: an overview[J]. Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France), 1995, 41(7): 883-905.
- [10] HÖLTKE HJ, KESSLER C. Non-radioactive labeling of RNA transcripts *in vitro* with the haptent digoxigenin (DIG); hybridization and ELISA-based detection[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(19): 5843-5851.

- [11] ZAVALA AG, KULKARNI AS, FORTUNATO EA. A dual color Southern blot to visualize two genomes or genic regions simultaneously[J]. Journal of Virological Methods, 2014, 198: 64-68.
- [12] LI SJ, ZHOU DY, LI YF, YANG B, OU-YANG J, JIE J, LIU J, LI CY. Mitochondria-targeted near-infrared fluorescent probe for the detection of carbon monoxide *in vivo*[J]. Talanta, 2018, 188: 691-700.
- [13] SUN W, GUO SG, HU C, FAN JL, PENG XJ. Recent development of chemosensors based on cyanine platforms[J]. Chemical Reviews, 2016, 116(14): 7768-7817.
- [14] GUO ZQ, PARK S, YOON J, SHIN I. Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications[J]. Chemical Society Reviews, 2014, 43(1): 16-29.
- [15] 刘强, 李忠原, 陈颂, 郝利国, 李春香, 韩康, 田洪达, 谷弘谦, 李忠涛. 聚乙二醇连接荧光 Cy5.5 构建超小超顺磁性氧化铁成像探针的制备与表征[J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(10): 1829-1833, 1850.
LIU Q, LI ZY, CHEN S, HAO LG, LI CX, HAN K, TIAN HD, GU HQ, LI ZT. Preparation and characterization of ultra small superparamagnetic iron oxide imaging probe constructed by fluorescent Cy5.5 linked with polyethylene glycol[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2022, 22(10): 1829-1833, 1850 (in Chinese).
- [16] 国飞, 张修石. 近红外荧光成像的新进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2008, 22(2): 198-200.
GUO F, ZHANG XS. New progress of near infrared fluorescence imaging[J]. Journal of Practical Oncology, 2008, 22(2): 198-200 (in Chinese).
- [17] HONG JX, XIA QF, ZHOU EB, FENG GQ. NIR fluorescent probe based on a modified rhodol-dye with good water solubility and large Stokes shift for monitoring CO in living systems[J]. Talanta, 2020, 215: 120914.
- [18] 王晓驰, 常刚, 曹瑞军, 孟令杰. 近红外荧光染料的结构、性质及生物荧光成像应用[J]. 化学进展, 2015, 27(7): 794-805.
WANG XC, CHANG G, CAO RJ, MENG LJ. Structure and properties of near-infrared fluorescent dyes and the bioimaging application[J]. Progress in Chemistry, 2015, 27(7): 794-805 (in Chinese).
- [19] CUI GZ, HONG W, ZHANG J, LI WL, FENG YG, LIU YJ, CUI Q. Targeted gene engineering in *Clostridium cellulolyticum* H10 without methylation[J]. Journal of Microbiological Methods, 2012, 89(3): 201-208.
- [20] ZOU X, REN ZX, WANG N, CHENG Y, JIANG YY, WANG Y, XU CG. Function analysis of 5'-UTR of the cellulosomal *xyl-doc* cluster in *Clostridium papyrosolvens*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 43.
- [21] XU CG, HUANG RR, TENG L, JING XY, HU JQ, CUI GZ, WANG YL, CUI Q, XU J. Cellulosome stoichiometry in *Clostridium cellulolyticum* is regulated by selective RNA processing and stabilization[J]. Nature Communications, 2015, 6: 6900.
- [22] LI YH, WANG YJ, YANG S, ZHAO YR, YUAN L, ZHENG J, YANG RH. Hemicyanine-based high resolution ratiometric near-infrared fluorescent probe for monitoring pH changes *in vivo*[J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(4): 2495-2503.
- [23] LEE GH, LEE EJ, HAH SS. TAMRA- and Cy5-labeled probe for efficient kinetic characterization of caspase-3[J]. Analytical Biochemistry, 2014, 446: 22-24.
- [24] ZHANG JM, ZHOU JY, YUAN QY, ZHAN CY, SHANG Z, GU Q, ZHANG J, FU GB, HU WC. Characterization of ginsenoside compound K loaded ionically cross-linked carboxymethyl chitosan-calcium nanoparticles and its cytotoxic potential against prostate cancer cells[J]. Journal of Ginseng Research, 2021, 45(2): 228-235.
- [25] YE H, PULEO CM, HO YP, BAILEY VJ, LIM TC, LIU K, WANG TH. Tunable blinking kinetics of cy5 for precise DNA quantification and single-nucleotide difference detection[J]. Biophysical Journal, 2008, 95(2): 729-737.
- [26] 胡佳. 近红外荧光探针在免疫分析中的应用研究进展[J]. 现代农业研究, 2019(4): 108-109.
HU J. Advances in the application of near-infrared fluorescent probes in immunoassays[J]. Modern Agriculture Research, 2019(4): 108-109 (in Chinese).
- [27] YANG HY, JANG MS, LI Y, LEE JH, LEE DS. Multifunctional and redox-responsive self-assembled magnetic nanovectors for protein delivery and dual-modal imaging[J]. ACS Applied Materials & Interfaces, 2017, 9(22): 19184-19192.
- [28] YANG XJ, SHAO C, WANG RX, CHU CY, HU PZ, MASTER V, OSUNKOYA AO, KIM HL, ZHAU HE, CHUNG LWK. Optical imaging of kidney cancer with novel near infrared heptamethine carbocyanine fluorescent dyes[J]. The Journal of Urology, 2013, 189(2): 702-710.
- [29] YANG GJ, ZHAO YJ, GONG AD, MIAO WJ, YAN L, NIE P, WANG ZG. Improved cellular delivery of antisense oligonucleotide for miRNA-21 imaging *in vivo* using cell-penetrating peptide-based nanoprobe[J]. Molecular Pharmaceutics, 2021, 18(3): 787-795.
- [30] DONG MJ, WANG CQ, WANG GL, WANG YH, LIU ZF. Development of novel long noncoding RNA MALAT1 near-infrared optical probes for *in vivo* tumour imaging[J]. Oncotarget, 2017, 8(49): 85804-85815.