

大肠杆菌poly(A)化mRNA基因片段的RD-PCR克隆

除组蛋白mRNA等极少数mRNA外,真核生物mRNA 3'端普遍存在poly(A)尾,其长度在80~200 bp之间,特异地加于mRNA 3'端AAUAAA序列下游10~30碱基处,对于mRNA的翻译和稳定均起重要的作用。

细菌mRNA代谢快速且高效,在体内很不稳定,半衰期可从30 s到20 min,多为几分钟[1]。由于细菌mRNA的不稳定,且细菌中与mRNA代谢有关的基因在功能上普遍存在重叠和冗余现象[2],因此极大地增加了研究其特性的难度。虽然1962年就有人从大肠杆菌(*E. coli*)中分离纯化出多聚腺苷酸聚合酶(PAP),并于1975年利用poly(A)与oligo(dT)特异结合的特性从*E. coli*中分离鉴定了poly(A)尾[3],但细菌mRNA poly(A)化仍被认为是偶然和个别现象,而非在*E. coli*中普遍存在。对细菌poly(A)RNA分子水平的研究基本始于1992年[4][5],但主要针对个别特定基因和一些特殊菌株[如多核苷酸磷酸化酶(polynucleotide phosphorylase, PNPase)、核糖核酸酶II(ribonuclease II, RNase II)和核糖核酸酶E(RNase E)]的基因突变。本研究利用poly(A)与oligo(dT)特异结合的特性进行*E. coli* mRNA纯化和逆转录,应用限制性显示-聚合酶链反应(RD-PCR)[6][7]克隆了100多个基因片段,并对其中30个片段进行了测序鉴定。

1 材料和方法

1.1 试剂和材料

Tryptone和Yeast Extract(英国Oxoid公司);溶菌酶(上海伯奥生物科技公司);mRNA纯化试剂盒和小量质粒提取试剂盒(美国Omega Biotek公司);逆转录酶Superscript II(美国Life Technologies公司);DNase I、oligo(dT)18、*E. coli* DNA聚合酶I、*E. coli* RNase H、*E. coli* DNA Ligase、RNase抑制剂、限制性内切酶Sau 3A I、Premix Taq、pMD18-T vector、T4 DNA Ligase等(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^mCACACCAGCCAAACCCA, SIR: 5' GGTT TGGCTGGTGTG。通用引物M: 5' GTTTGGCTGGT GTGGATC。RD-PCR分组引物是在通用引物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 °C培养24 h,挑取单菌落转移至100 ml液态LB中,37 °C、200 r/min培养8 h,测D₆₀₀约为0.6。

1.2.2 总RNA的制备和mRNA纯化 总RNA制备按文献[8]进行。DU530紫外分光光度计进行定量,取2 μg总RNA于1.5%琼脂糖电泳。对提取的总RNA用无RNase的DNase I进行消化,以防痕量基因组DNA污染。mRNA的纯化按照mRNA纯化试剂盒和小量质粒提取试剂盒说明书操作。

1.2.3 cDNA合成 提取的mRNA混合后分成两份,分别作为实验组和阴性对照组二的逆转录模板。实验组cDNA第一链合成按Superscript II的说明书进行,第二链的合成按文献[9]进行,各种酶用量有所调整。设立的阴性对照组一(未加mRNA)和对照组二(加mRNA,但未加oligo(dT)18)按实验组方法进行相同处理。

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PCR管内混匀,然后在PCR仪上加热至90 °C,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 参照文献[6][7]进行,具体步骤如下:取1 μg逆转录所得的cDNA,以1.5 μl Sau 3A I于20 μl总反应体积中37 °C酶切3 h。取酶切产物5 μl和制备的接头6 μl,以1 μl T4 DNA连接酶于30 μl总反应体积中16 °C连接3 h,即可用作RD-PCR的模板。取连接产物1 μl、2×Premix Taq 25 μl、配对的分组引物(如MG和MA,浓度均为10 μmol/L)各0.75 μl于50 μl总反应体积中进行RD-PCR,反应条件:94 °C变性5 min,然后经94 °C 30 s、65 °C 30 s、72 °C 1 min,共35个循环,最后72 °C延伸6 min。因4种不同的分组引物(MG、MA、MT、MC)共有10种不同的组合,

RD-PCR分成10组进行(若以酶切加接头连接产物直接做模板, 则PCR扩增效果不理想, 可用通用引物扩增并以扩增后的产物做模板, 再行分组PCR)。

1.2.6 RD-PCR产物片段的克隆和测序 PCR产物无须纯化, 可直接与T载体连接, 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[10]进行。经快速PCR鉴定后, 少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测序仪测序。

2 结果

2.1 细菌的总RNA质量鉴定结果(图1)

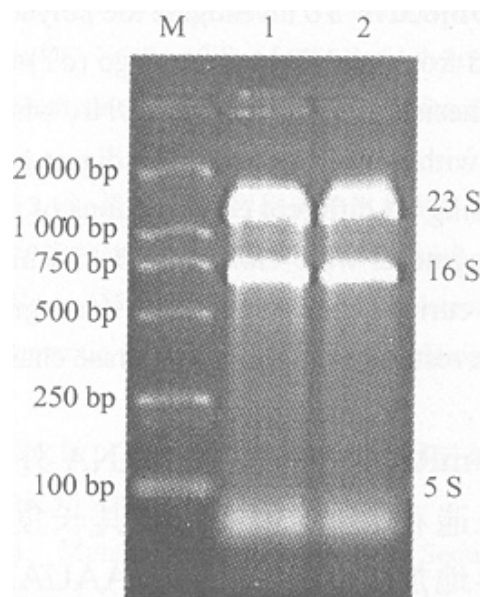


图1 大肠杆菌总RNA电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of the E.coli total RNA

M: DNA marker of DL2000; 1: Total RNA before DNase digestion; 2: Total RNA after DNase digestion

从图1可见明显的23 S、16 S、5 S条带, 23 S约是16 S的两倍, 总RNA质量非常好。D₆₀₀=0.6的10 ml菌液得到总RNA 约400 μg, 800 μg总RNA经纯化可得mRNA约2 μg。

2.2 10种不同引物组合的PCR反应结果

组AA、AT、AC、AG、TT、TC、CC有10多条条带, 组CG有8条左右, 组TG带少, 且亮度明显弱于其他组。片段连接克隆后, 快速PCR鉴定结果初步表明每组实际所含片段多于图示或紫外透射仪下所见条数。实验组的酶切片段经通用引物PCR扩增产物电泳可见有250~750 bp范围的涂片(图2), 两个阴性对照组的RD-PCR产物电泳均未显示条带。

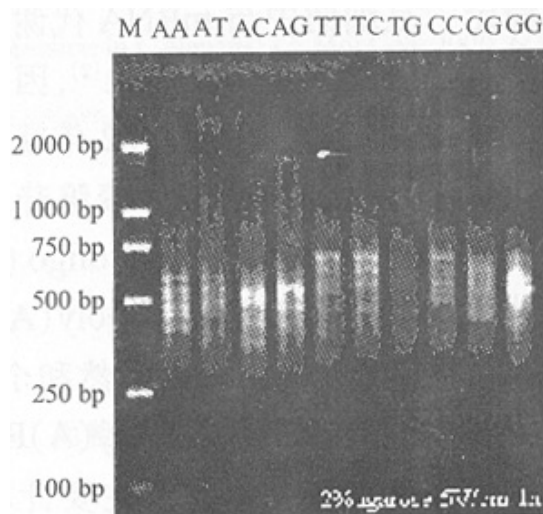


图2 RD-PCR产物电泳图

Fig.2 Electrophoretogram of the RD-PCR products
AA to GG : Different combinations of the 4 primers

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，组tt的1~15个克隆(为尽可能多的获取每组内不同的基因片段，每组都随机挑取了60个白色菌落)PCR鉴定结果见图3。

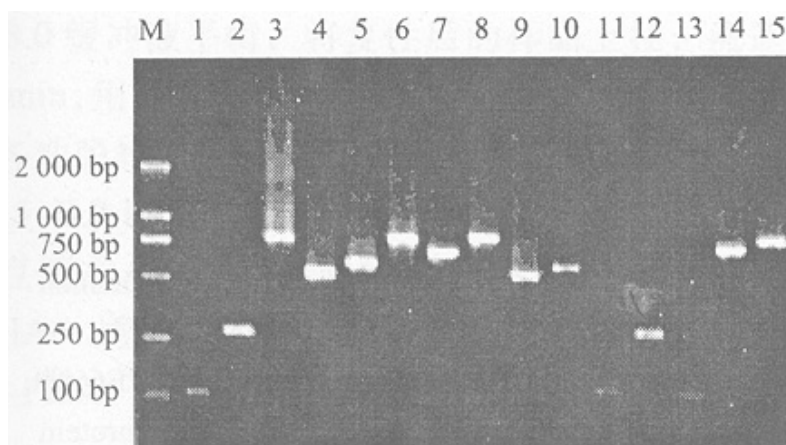
图3 α 互补阴性克隆的PCR产物电泳结果

Fig.3 Electrophoretogram of PCR product of α -complementary negative colony
M: DNA marker DL2000; 1-15: The sequence number of colony

2.4 测序分析

以下是两个有代表性的基因片段。

基因片段一，位于AG组：

```
GATCTGGTGGTCGGTGAAACCACCTGCGACGGCAAAAAGAAAATGTATGAATACATGGGGCGGAGTTTAAGCCTGTTTCATGTGATGCAATTG
CCCAACAGCGTTAAGGACGATGCCTCGCGTGCCTTATGGAAAGCCGAGATGCTGCGCTTGCAAAAAACGGTAGAAGAACGTTTTGGGCACGA
GATTAGCGAAGATGCTCTGCGCGATGCCATTGCGCTGAAAAACCGGAACGTCGCGCACTGGCTAATTTTTATCATCTTGGGCAGTTAAATC
CTCCGGCGCTTAGCGGCAGCGACATTCTGAAAGTGGTTTACGGCGCAACCTTCCGGTTCNATAAAGAGGCGTTGATC,
```

在yjiM基因内部。

基因片段二，位于AT组：

```
GATCGCTGGCGTGAAGCAGCGATTCCGCATGAAAACGAATATCCGCCGGAGAGATATTCAACCGCGGGGAAAGGGAGCAGGCGTAAAATTG
ACAGCGCGGTAACGCTTTTGCCTGAACCTGACTCACCCACCAGCGCCAGCGTTTCGCCAGCCTCAATCTGTAGTGAACATCTTTGACTACT
GTACGTACGTTTGTGATGGCGAAAACCCACCGACAAATTTTCAATCGCTAACAGAGTTTGCGTTCATGCTACACCGCCTTATTAAGATC,
```

跨越同属于yej操纵子的yejE、yejF基因的部分序列。

3 讨论

在本实验中，我们用无RNase酶的DNase I对提取的总RNA进行了消化，从图1可见提取的总RNA质量非常好，此外，mRNA纯化试剂盒的使用充分保证了实验结果不是由于基因组DNA污染所致。阴性对照一和对照二的RD-PCR结果均未见条带，表明逆转录所用的mRNA模板不存在基因组DNA污染，我们的测序结果也支持了这一点。30个基因片段的测序结果经BLAST比较，发现所有克隆的片段序列都分布于某个基因内或位于跨越同属一个操纵子的紧邻的两个基因，未包含启动子序列(启动子不被转录)。根据基因组序列推断，这些能利用oligo(dT)逆转录的基因，其poly(A)尾是在转录后再加上去的。

我们对所克隆的30个基因片段进行了初步的分析, 由此证明我们应用RD-PCR技术确实成功克隆了E. coli的基因片段, 从而在国内首次用实验证实了细菌中确实存在poly(A)尾。当然, 我们克隆的基因片段仅百余条, 这还不足以证明poly(A)化在细菌中是一个普遍的现象, 但至少可提示poly(A)化在细菌中并不是个别和偶然的现象。另外, 由于我们获得的克隆只有100多个, 而且我们在实验中利用oligo(dT)纤维素对细菌mRNA纯化的得率远低于真核mRNA的得率, 这些均在一定程度上支持了细菌中mRNA poly(A)尾短、少和不稳定的理论。

本研究使用的XL-1菌株是外切核酸酶PNPase、RNase II和内切核酸酶RNase E均不缺陷的菌株, 这三种酶在E. coli mRNA的降解中起着重要作用, 如果选用这三种酶基因都突变或PNPase、RNase II突变的菌株(如SK5704和SK5726), 获得的poly(A)化的基因片段则有可能更多。

致谢: 感谢本实验室李凌博士、祝骥博士、吴炳义副教授、冯亦教、李燕、刘莉及Kushner SR(Life Science Building, Department of Genetics, University of Georgia)的支持和帮助。

参考文献:

- [1] Rauhut R, Klug G. mRNA degradation in bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23(2): 353-70.
 - [2] Donovan WP, Kushner SR. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(1): 120-4.
 - [3] Nakazato H, Venkatesan S, Edmonds M. Polyadenylic acid sequences in E. coli messenger RNA [J]. Nature, 1975, 256(5513): 144-6.
 - [4] Cao GJ, Sarkar N. Poly(A) RNA in Escherichia coli: nucleotide sequence at the junction of the 1 pp transcript and the polyadenylate moiety[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(6): 7546-50.
 - [5] Cao GJ, Sarkar N. Identification of the gene for an Escherichia coli poly(A) polymerase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21): 10380-4.
 - [6] 叶鑫生, 沈倍奋. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.
 - [7] 马文丽, 郑文岭, 崔东, 等. 利用瓷片材料制备DNA微集芯片[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 285-9.
- Ma WL, Zheng WL, Cui D, et al. DNA Microarray Chips Made on Surface of Ceramic Slides[J]. Acta Biochimica Biophys Sin, 2000, 32(3): 285-9.
- Frederick MA, Roger B, Robert EK, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M], 3 nd. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995. 4-11.
- 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术[M]. 第2版, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997. 201-6.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版, 北京: 科学出版社, 1992. 55-6.

参考文献:

- [1] Rauhut R, Klug G. mRNA degradation in bacteria[J]. FEMS Microbiol Rev, 1999, 23(2): 353-70.
 - [2] Donovan WP, Kushner SR. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in Escherichia coli K-12[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(1): 120-4.
 - [3] Nakazato H, Venkatesan S, Edmonds M. Polyadenylic acid sequences in E. coli messenger RNA [J]. Nature, 1975, 256(5513): 144-6.
 - [4] Cao GJ, Sarkar N. Poly(A) RNA in Escherichia coli: nucleotide sequence at the junction of the 1 pp transcript and the polyadenylate moiety[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(6): 7546-50.
 - [5] Cao GJ, Sarkar N. Identification of the gene for an Escherichia coli poly(A) polymerase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89(21): 10380-4.
 - [6] 叶鑫生, 沈倍奋. 细胞调控探索[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.
 - [7] 马文丽, 郑文岭, 崔东, 等. 利用瓷片材料制备DNA微集芯片[J]. 生物化学与生物物理学报, 2000, 32(3): 285-9.
- Ma WL, Zheng WL, Cui D, et al. DNA Microarray Chips Made on Surface of Ceramic Slides[J]. Acta Biochimica Biophys Sin, 2000, 32(3): 285-9.
- Frederick MA, Roger B, Robert EK, et al. Short Protocols in Molecular Biology[M], 3 nd. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995. 4-11.

回结果列表