



大肠杆菌poly(A)化mRNA cDNA 文库的构建与鉴定

大肠杆菌的mRNA 3'端多存在多聚腺苷酸化现象[polyadenylation, poly(A)],通常比真核生物的poly(A)尾短得多,一般为15~60 bp。大肠杆菌mRNA的poly(A)化,加A位点高度多态性,在未受保护的3'端也可能发生poly(A)化[1]。大肠杆菌的mRNA代谢快速高效,mRNA在体内不稳定,半衰期从30 s到20 min不等,多为几分钟[2]。细菌mRNA降解也无明显方向性,可从3'端、5'端开始降解,或从3'和5'端同时进行[3]。大肠杆菌mRNA的不稳定性,加上大肠杆菌mRNA 3'端加A位点的高度多态性和poly(A)尾较短,极大地增加了研究其特性的难度,使得完全沿用真核生物构建cDNA文库的方法难以获得一个理想的cDNA文库,即获得的多个大小不同克隆可能都来自同一基因不同状态的mRNA,增加了文库的重复性。本研究应用限制性显示PCR技术(RD-PCR)[4][5]构建了一个新型的大肠杆菌限制性cDNA文库,经初步筛选,获得了170多个基因片段克隆,选取其中的66个克隆进行测序鉴定和初步的生物信息学分析,以初步了解该文库内容和质量。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Tryptone、Yeast Extract购自Oxiod,溶菌酶购自上海伯奥生物科技公司,小量质粒提取试剂盒购自Omega Biotek,逆转录酶Superscript II购自Life Technologies, DNase I、oligo(dT)18、核糖核酸酶抑制剂、Premix Taq、pMD18-T vector、T₄ DNA连接酶购自大连宝生物工程有限公司。引物S0100(GTAAAC GACGGCCAGT)购自上海生物工程有限公司。

1.1.2 大肠杆菌poly(A)化mRNA cDNA文库 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第一链,用置换法合成cDNA双链。用限制性内切酶消化cDNA,所得的限制性片段与通用接头相连,通过10对选择性引物进行PCR,使各片段得以扩增并分布于10个亚组中,并进行A-T克隆,经筛选共获得170多个基因片段。提取含相应基因片段克隆的质粒并编号索引,-20℃保存。

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℃、200r/min培养8 h,测D₆₀₀约为0.6。

1.2.2 总RNA的制备 总RNA制备按文献[6]进行。用DU530紫外分光光度计进行定量。取2 μg总RNA于1.5% Agarose电泳。对提取的总RNA用无RNase的DNase I进行消化,以防基因组DNA污染。

1.2.3 测序 应用RD-PCR技术构建的cDNA文库的基因片段均克隆于pMD18 T-vector中,以含有基因片段的质粒为模板,S0100为测序引物,在本室310 DNA测序仪上测序。

1.2.4 生物信息学分析 测序结果经在线BLAST进行序列同源性比较(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>)。选取目的序列,经BLAST比较,了解序列与大肠杆菌基因组序列的符合程度,序列所对应的基因及基因功能的简单说明等。明确序列片段所属的基因后,可以利用基因名再到

(<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/>)进一步查询,以获得更多的信息,如基因是否为大肠杆菌生存所必须、非生存所必须还是功能未明的基因等。

1.2.5 限制性文库基因片段来源的验证 为了验证克隆所得的基因片段是否来自大肠杆菌poly(A)化mRNA,我们从已测序的基因片段中,随机抽取2个基因片段(其对应的基因为yjiM和ygeW)和跨越murB和birA基因部分序列的片段,结合测序结果,尽量包含克隆的基因片段的序列,使用primer5.0(从www.bio-soft.net下载)设计引物(yjiM:CCTTCTCCCACTGCTGA, AACCTCTGCCCGCTGATT; ygeW:CGAAGGCAAATCACAAAT, ACTTCGGATAAACGATGTCT; murB和birA: CGCACCACCAAACCTCCCT, CCAGACGCCAGAACATCG)。提取细菌总RNA,用无RNase的DNase I进行消化,去除DNA污染。纯化所得的总RNA均分成两等份,分别作为验证组的逆转录模板和对照组的PCR反应模板(用于检查是否存在基因组DNA污染)。验证组以oligo(dT)18为逆转录引物,具体操作按Superscript II的说明书进行,生成cDNA第一链后,然后以其为模板进行PCR反应;对照组直接以DNase I处理后的RNA为模板,进行PCR,PCR反应条件同验证组。

2 结果

2.1 细菌的总RNA质量鉴定

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。无RNase的DNase I消化后电泳未见基因组污染。

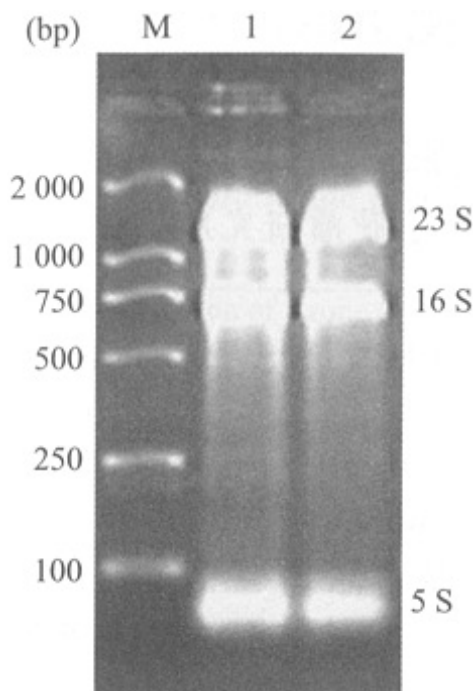


图1 大肠杆菌总RNA电泳图

Fig.1 Electrophoresis of the E.coli total RNA

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

2.2 测序结果分析

66个基因片段经信息学分析后,按基因片段序列对应的大肠杆菌基因序列,可分为3类情况:(1)克隆的基因片段位于某一基因内部,共51个克隆,分别对应于下列基因:phoB, fhuE, relA, vacJ, b1522, yigM, rbsA, yegW, yecA, lpxD, iscS, yhcS, ygeW, bglF, mpl, mrcA, speE, yfcU, ykgA, araE,

sdhC, gsp, atoC, yjiY, mhpT, yfbK, dos, ptr, recG, yfbS, aceE, yfjM, atpB, kdgK, vacB1, vacB2, yjbB, thiC, yciV, acrA, imp, yhhI, phoE, hofC, cpsB, upp, yicP, yhbC, cadA, emrD, speD (vacB1和vacB2同属于vacB基因, 但两者的基因序列不存在交叉重叠, 基因ptr, cadA, cpsB对应的片段克隆存在1次重复); (2) 克隆的基因片段跨越了同属于某一操纵子的两个相邻基因的部分序列, 共9个克隆, 分别跨越下列的两个基因: yejE-yejF, yidX-yidA, umuD-umuC, sucA-sucB, yjfL-yjfM, ydfM-b1547, ylbA -ylbB, yfjL -yfjM, yhfW-yhfX; (3) 克隆的基因片段对应的基因可能存在转录通读现象, 共3个克隆, 分别跨越下列两个基因: murB-birA, ypjE-yfjD, nohB-ybcX。

2.3 Poly(A)化mRNA的验证

经琼脂糖电泳鉴定, 结果(图2)显示验证组3对引物均扩增出了目的长度的片段; 阴性对照(直接以DNase I 处理后的RNA为模板, 进行PCR)未见条带。

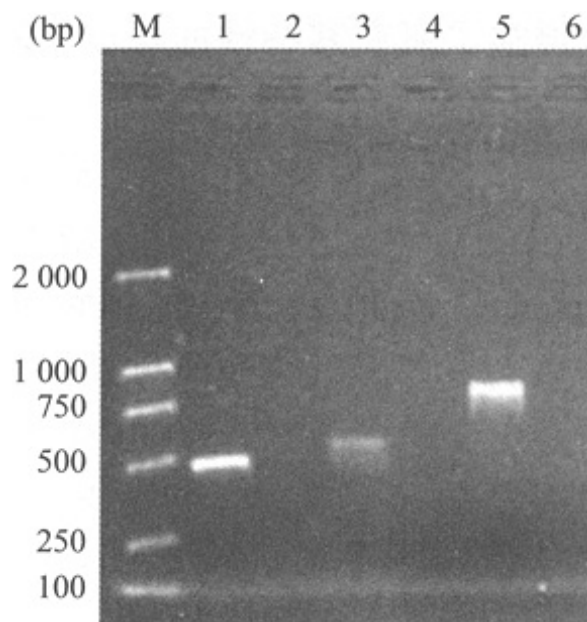


图2 PCR产物电泳鉴定

Fig.2 Electrophoresis of the PCR products

M: DNA marker DL2000; Lane 1: yjiM gene; Lane 3: ygeW gene; Lane 5: murB-birA gene; Lane 2, 4, 6: Blank control

3 讨论

从测序结果看, 应用RD-PCR技术构建的大肠杆菌poly(A)化mRNA限制性cDNA文库质量高, 所筛选的克隆基因片段重复性很低, 已测序的66个基因片段中, 仅有3个重复, 这在一定程度上表明应用RD-PCR技术构建的文库基因片段的重复性低, 筛选基因片段效率高, 目的性强。细菌中很多基因以多顺反子形式表达, 所以克隆所得的基因片段有部分存在跨越两个相邻基因的情况。构建该文库的RD-PCR技术中用的内切酶是Sau3A I, 为四碱基酶。从理论上讲, 256个碱基就存在一个酶切位点, 所以只要逆转录所得的双链cDNA 中存在3个或以上的酶切位点, 就有可能出现2个或更多不同序列的基因片段对应于同一个基因。从66个基因片段测序结果看, 这种情况可能不是很多。有1个片段跨越murB和birA基因的部分序列, 可能是由于这两个基因存在转录的通读现象(ypjE-yfjD, nohB-ybcX 因为都有1个基因产物尚未得到证实, 暂难以判定是属于一个操纵子的多顺子形式转录还是不同基因的转录通读现象)。

对所构建的限制性文库基因片段来源的验证结果表明, 应用RD-PCR技术构建所得的cDNA文库来自大肠杆菌poly(A)化的mRNA。目前, 我们正在将这些基因片段打印到玻片上, 制成基因芯片, 以便进一步观察这些基

因在各种理化因素作用下的变化,以探讨这些基因的生物学特性和功能。

(责任编辑:黄开颜)

参考文献:

- [1] Sarkar N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes[J]. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66:173-97.
 - [2] Rauhut R, Klug G. mRNA degradation in bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, 23(3): 353-70.
 - [3] Arraiano CM, Cruz AA, Kushner SR. Analysis of the in vivo decay of the *Escherichia coli* dicistronic pyrF-orfF transcript: evidence for multiple degradation pathways[J]. *J Mol Biol*, 1997, 268(2): 261-72.
 - [4] 郑文岭, 马文丽, Cater Van Waes. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达技术[A]. 见: 细胞调控探索[M]. 叶鑫生, 沈培奋. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.
 - [5] 马文丽, 郑文岭. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术[A]. 见: 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 孙志贤. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113-4.
- Frederick MA, Roger B, Robert EK, et al. *Short protocols in molecular biology*[M]. 3rd ed., New York: John Wiley & Sons Inc, 1995. 11.

参考文献:

- [1] Sarkar N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes[J]. *Annu Rev Biochem*, 1997, 66:173-97.
 - [2] Rauhut R, Klug G. mRNA degradation in bacteria[J]. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, 23(3): 353-70.
 - [3] Arraiano CM, Cruz AA, Kushner SR. Analysis of the in vivo decay of the *Escherichia coli* dicistronic pyrF-orfF transcript: evidence for multiple degradation pathways[J]. *J Mol Biol*, 1997, 268(2): 261-72.
 - [4] 郑文岭, 马文丽, Cater Van Waes. 肿瘤细胞多聚腺苷酸聚合酶(PAP)的差异表达技术[A]. 见: 细胞调控探索[M]. 叶鑫生, 沈培奋. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 73-9.
 - [5] 马文丽, 郑文岭. 限制性显示(RD-PCR): 一种新的差异显示技术[A]. 见: 全军生物化学与分子生物学研究进展[M]. 孙志贤. 北京: 军事医学科学出版社, 1998. 113-4.
- Frederick MA, Roger B, Robert EK, et al. *Short protocols in molecular biology*[M]. 3rd ed., New York: John Wiley & Sons Inc, 1995. 11.