

文章编号: 1000-7123(2002)-01-0014-04

【论著】

mRNA 差异显示技术分离猬迭宫绦虫幼虫特异表达基因

刘殿武 朱冰 王晓波 闫会敏 丁月新

【摘要】 目的 查找猬迭宫绦虫幼虫——裂头蚴阶段特异性表达基因。方法 裂头蚴和成虫组织用异硫氰酸胍一步法提取总 RNA,用 DNA 酶去除总 RNA 中污染的 DNA。使用 T₁₂MA、T₁₂MC、T₁₂MG 和 T₁₂MT 4 种锚定引物反转录合成 cDNA,再用 1 种随机引物与上述 4 种锚定引物在含同位素的反应液中进行 PCR 反应。将 PCR 产物用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,经放射自显影后,从凝胶上选出裂头蚴与成虫不同的差异带,PCR 扩增后经杂交试验鉴定出不同种类的基因片段;以筛选出的差异带作探针,分别与裂头蚴和成虫 RNA 进行 Northern 杂交证实裂头蚴阶段表达基因;将差异带测序后与 GenBank 中的序列进行同源性比较。结果 从凝胶中共选出 11 条差异带。将回收的 11 条带再经 PCR 扩增和杂交试验,从中选出 3 种不同的基因片段。经 Northern 杂交证实片段 1 和片段 2 为裂头蚴特异表达基因,而片段 3 为裂头蚴和成虫共同表达的基因。3 个基因片段测序后与 GenBank 中的基因进行同源性分析,基因片段 1 和 2 无同源序列;基因片段 3 与多种生物的 28S rRNA 同源。结论 通过 mRNA 差异显示技术查找出 2 个裂头蚴阶段特异性表达基因片段。

【关键词】 mRNA 差异显示; 猬迭宫绦虫; PCR; 基因; 阶段表达

中图分类号: R383.3

文献标识码: A

Screening of Stage-Specific Expression Genes of *Spirometra erinacei-europaei* Plerocercoid by mRNA Differential Display Technique

LIU Dian-wu, ZHU Bing, WANG Xiao-bo, YAN Hui-min, DING Yue-xin

(Department of Epidemiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

【Abstract】 **Objective** To screen stage-specific expression genes of plerocercoid of *Spirometra erinacei-europaei*. **Methods** RNA was extracted by the acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform from plerocercoid and adult worm of *Spirometra erinacei-europaei*. Contaminated DNA in the RNA was digested by RNase-free DNase. cDNA was synthesized by using T₁₂MA, T₁₂MC, T₁₂MG and T₁₂MT primers, and PCR was then done using the same T₁₂MN and one random primers. The PCR products were fractionated on 8% denatured polyacrylamide gel, differential bands of plerocercoid found in the gel were cut out, amplified by PCR and sequenced after the gel was dried out and autoradiographed. Northern hybridization was conducted to identify the stage-specific expression genes. **Results** Eleven differential bands were selected from the gel and classified into 3 kinds of gene fragments by hybridization after they were amplified by PCR. The fragments 1 and 2 were confirmed to express specifically in plerocercoid by Northern hybridization, but the fragment 3 was expressed in both plerocercoid and adult worm. When the 3 gene fragments were homologically analyzed in GenBank, the sequence which was homologous with the fragments 1 and 2 was not found, but the fragment 3 had high homology with many kinds of 28S rRNA. **Conclusion** The gene expression of plerocercoid was different from that of adult worm probably because they live in different hosts. Two kinds of different gene fragments in plerocercoid were identified by mRNA differential display technique.

【Key words】 mRNA differential display, *Spirometra erinacei-europaei*, PCR, gene, stage-specific expression

Supported by the Scientific and Technological Department of Hebei Province (No. 99276147D)

猬迭宫绦虫病是人兽共患的寄生虫病。成虫主要寄生在猫、狗等哺乳动物肠道,偶尔寄生在人体;其

幼虫——裂头蚴寄生在爬行类和两栖类动物体内,如蛇和青蛙。由于成虫和幼虫寄生的宿主不同,所以体内基因表达的种类也不同。已发现编码半胱氨酸酶的基因^[1]和编码某些含重复单位的抗原性多肽的基因^[2,3]只在幼虫阶段表达,而发展到成虫阶段无须这些

基金项目: 河北省科技厅资助项目(No. 99276147D)
作者单位: 河北医科大学流行病学教研室, 石家庄 050017

基因发挥作用, 所以这些基因就不表达。为了进一步研究是否还存在其他阶段特异性表达基因, 本研究应用 mRNA 差异显示技术查找裂头蚴阶段特异性表达的基因。

材料与方 法

1 寄生虫标本

猎犬宫绦虫取自日本长野县的狗, 其幼虫取自日本鼠蛇 (*Ela phequadriovigata*), 取出的成虫和幼虫洗净后 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2 RNA 的提取

$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存的成虫和幼虫采用酸性异硫氰酸胍一步法^[1]提取总 RNA, 然后用 DNA 酶消化去除污染的 DNA。

3 反转录 PCR

两种虫体组织的总 RNA 经 DNA 酶消化后, 分别用 T_{12} MA (M=A、C、G)、 T_{12} MC、 T_{12} MG 和 T_{12} MT 等 4 锚定引物反转录合成 cDNA 第 1 链。以反转录产物为模板, 上述 4 种锚定引物和 1 种随机引物 (AP1) 组合, 进行 PCR 反应。反应体积 $20\text{ }\mu\text{l}$, 其组成为: dNTP ($250\text{ }\mu\text{mol/L}$) $1.6\text{ }\mu\text{l}$, 随机引物 ($2\text{ }\mu\text{mol/L}$) $2.0\text{ }\mu\text{l}$, T_{12} MN 引物 ($10\text{ }\mu\text{mol/L}$) $2.0\text{ }\mu\text{l}$, $\alpha^{35}\text{S}$ -dATP ($444\times 10^{11}\text{ Bq/mmol}$) $1.0\text{ }\mu\text{l}$, 反转录产物 $2.0\text{ }\mu\text{l}$, $10\times\text{PCR}$ 缓冲液 $2.0\text{ }\mu\text{l}$, 去离子水 $9.2\text{ }\mu\text{l}$, Taq-DNA 聚合酶 $0.2\text{ }\mu\text{l}$ 。反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s , 共 40 个循环, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min 。

4 差异带的选择、回收、扩增和鉴定

$7\text{ }\mu\text{l}$ PCR 扩增产物与 $4\text{ }\mu\text{l}$ 上样缓冲液混合, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 加热 2 min 后, 点样在 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶上, 1500 V 电泳 4 h 后, 将凝胶放于 3 mm 滤纸上, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 真空干燥 2 h , 将 X-胶片放于凝胶上放射自显影, 室温曝光 1 wk 左右。冲洗 X-胶片, 找出差异带, 再从干燥的凝胶上相对应的位置切下差异带, 放入盛有 0.5 ml 去离子水的离心管中, 室温 10 min , 从滤纸上揭下凝胶条放入另一盛有 $30\text{ }\mu\text{l}$ 去离子水的离心管中, 煮沸 15 min , 弃去胶条, 应用相同的引物和 PCR 扩增条件进行扩增。取 1 个扩增产物作探针, 与所有扩增产物进行杂交找出不同种类的基因片段。

5 Northern 印渍杂交

$10\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 于 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳, 按 Sambrook^[5]方法将其转移到尼龙膜上 (Hybond-N, Amersham) 与 ^{32}P -dCTP 标记的选出的差异基因片段在 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 杂交 16 h 。杂交后将膜用 $2\times\text{SSPE}/0.1\%$ SDS, $1\times\text{SSPE}/0.1\%$ SDS 和 $0.1\times\text{SSPE}/0.1\%$ SDS 液 $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ 洗 3 次, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放射自显影观察结果。

6 基因片段的核苷酸序列测定和同源性比较

经杂交鉴定的不同种类的基因片段, 应用相应的随机引物, 以双脱氧核苷酸末端终止法, 用测序试剂盒 (Applied Biosystems, Inc., CA) 在 ABI 373 全自动测序仪上测定其核苷酸序列。将测出的序列用 GENETYX 软件分析其 cDNA 编码的氨基酸序列, 并通过因特网与 GenBank 中的序列进行同源性分析。

结 果

1 RNA 的提取和鉴定

两种虫体组织用异硫氰酸胍一步法提取的总 RNA 经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳后, 可见清晰的 28S 和 18S 两条带, 经紫外分光光度计测得 A_{260}/A_{280} 为 1.95 。

2 差异带的选择、回收和 PCR 扩增

用 T_{12} MA、 T_{12} MC、 T_{12} MG 和 T_{12} MT 4 种锚定引物反转录合成 cDNA, 然后与 1 种随机引物进行组合成 8 个反应产物进行 PCR 扩增, 经变性胶电泳、干胶和放射自显影后, 从放射自显影的胶片上共找出 11 条差异带 (图 1)。然后从凝胶的相应位置上用小刀切下差异带, 再进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 其长度最小的为 170 bp 左右, 一般为 $200\sim 500\text{ bp}$ 。

3 不同种类基因片段的鉴定

从回收的 11 条带中选一条 (300 bp 左右) 经同位素标记后作探针, 与其余 10 条带杂交, 有 3 条带出现阳性结果。从剩余的 7 条带中再选 1 条作探针, 与其余 6 条带进行第 2 次杂交, 有 2 条带出现阳性结果。经过 3 次杂交试验从 11 条带中归纳为 3 种不同种类的基因片段。

4 Northern 印渍杂交分析

将分离到的 3 种基因片段经同位素标记后, 分别与裂头蚴和成虫的 RNA 进行 Northern 杂交。结果

(图 2) 显示, 片段 1 和片段 2 只与裂头蚴产生一个很强的杂交带, 片段 1 杂交带在 2.0 kb 处, 片段 2 杂交

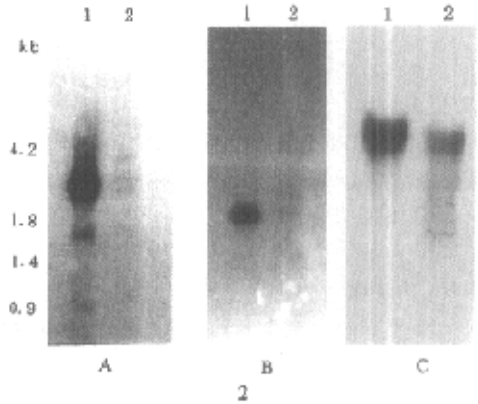
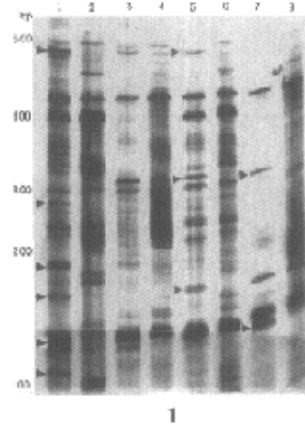


图 1 T_{12} MN 与 AP1 引物 RT-PCR 扩增后的 mRNA 差异显示电泳图 1, 2 T_{12} MA 3, 4 T_{12} MC 5, 6 T_{12} MG 7, 8 T_{12} MT 1, 3, 5, 7 裂头蚴 2, 4, 6, 8 成虫 图左边的数字为分子量对照 图 2 Northern 杂交实验结果 A, B, C, 分别为基因片段 1, 2, 3 作探针进行杂交的结果 片段 1 杂交后, 将膜再生与片段 2 杂交 与片段 2 杂交后, 将膜再生与片段 3 杂交 1 裂头蚴 2 成虫 图左边的数字为分子量对照

Fig. 1 Result of mRNA differential display by using T_{12} MN and AP1 primers Lane 1 and 2 T_{12} MA Lane 3 and 4 T_{12} MC Lane 5 and 6 T_{12} MG Lane 7 and 8 T_{12} MT Lane 1, 3, 5, 7 Plerocercoid Lane 2, 4, 6, 8 adult worm Figures (bp) on the left indicate the position of markers Fig. 2 Result of Northern hybridization Figures A, B and C show the results of hybridization of gene fragments 1, 2 and 3 respectively. RNA of plerocercoid and adult worm in the film hybridized first with gene fragment 1 and reproduced, then hybridized with gene fragment 2 and reproduced, and again hybridized with gene fragment 3. Lane 1 Plerocercoid Lane 2 Adult worm Figures (kb) on the left indicate the position of markers.

带在 1.7 kb 处, 片段 3 与裂头蚴的杂交带在 4.3 kb 处, 比与成虫的杂交带浓。

5 测序和同源性分析

经杂交试验鉴定出的基因片段, 同种的基因片段选最长的进行测序, 共测 3 条, 依次为 238 bp、383 bp 及 433 bp。将测得的 3 条基因片段通过因特网与 GenBank 内登录的基因进行同源性分析, 片段 1 和 2 未发现与之相同的基因序列, 片段 3 与多种生物的 28S rRNA 具有很高的同源性。3 条基因片段命名为裂头蚴阶段特异性表达基因 1~3 (图 3)。基因片段 1、2 及 3 在 GenBank 中的登录号分别为 AF418993、AF418989 及 AF418990。

讨 论

基因的阶段性表达是寄生虫的一大特点, 由于寄生虫发育的不同时期, 其寄生宿主和寄生部位不同, 因而体内基因的表达种类和量也不同。作者以前已证明猪旋宫绦虫多种基因, 如编码半胱氨酸酶的基因及编码多种含重复单位的抗原基因都有阶段表达的特性^[1,2], 这些基因在幼虫体内大量表达, 而发育到成虫

基因片段 1 (fragment 1)
 TGCCACATGCACC09GCCATG8T7T6T68A9GT0GACATGAT0CAAT7T6T9GTATGA 60
 G Y C T G P W C C G R H D I Q L W Y E
 GGCTGGCGCAGCTAAATGCTTTTGTABAGACTTAATGTTTGT09GGABADGTGAGTAT 120
 R G G T K S F V D D L H F C R G D V S I
 TCGACAGCTATGACACTGCGAGTATTGAGTCTAT0CATG8TACCG8ATCGCT08AAAT 180
 R A T I T L R G I E S Y P W Y P D P R I
 TGAAG8T1TAAAC09GGATAAT7GAADAAAT7AAACT0YT7CA0CTTAAAAA888888 238
 Q R L N G E *

基因片段 2 (fragment 2)
 GAATTG888ATCG88TACCATG88888T888TATTTAA7TAA888AA8CTT888TATT 60
 N S R I R V P W Q V S I L I K E T S L L
 A888888ATG888 120
 G S I E K G H L N I S G R *
 AAAAACTTTTTC888TTC888TCA888TCA888TCA888TCA888TCA888TCA888TCA888 180
 AA888888TCA888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 240
 G888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 300
 TG888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 360
 C888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 383
 C888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888

基因片段 3 (fragment 3)
 G888CAG88 60
 A888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 120
 TG888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 180
 AT0888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 240
 A888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 300
 C888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 360
 CT888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 420
 TT888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888TTC888 433

* 终止密码 stop codon

图 3 裂头蚴特异性基因片段的核苷酸序列及其编码的氨基酸序列 Fig. 3 Nucleotide and predicted amino acid sequence of gene fragments of *Spirometra erinaceiuroupei* plerocercoid. The amino acid of the gene fragments 1 and 2 is indicated under the nucleotide sequence.

时就不表达。已有很多报道寄生虫在发育的不同时期体内的基因表达不同^[8]。在幼虫时期表达, 而到成虫时期不表达的基因, 一般与幼虫在宿主体内的穿入和移行、逃避宿主免疫系统的杀伤以及致病作用有关。mRNA 差异显示技术是近年来发明的一种新的分子生物学技术, 此技术常用于寻找同种处于不同时期的细胞内表达的特异基因。mRNA 差异显示技术^[9]自 20 世纪 90 年代初发明以来常用于寻找新的基因, 尤其在肿瘤的研究中, 常用此法筛选肿瘤相关基因^[10-13]。此种技术是使用 3' 端的 T₁₂MN 引物和 5' 端的随机引物合理匹配进行反转录 PCR 扩增, 从理论上讲, 使用 12 条 T₁₂MN 引物和 20 条随机引物组合进行 PCR 扩增, 可将细胞内所有的基因扩增出来。因而, 如果细胞内基因发生突变或表达的种类不同很容易被筛选出来, 与精简杂交技术^[14]相比, 具有快速、灵敏、重复性好等优点。mRNA 差异显示技术成败的关键在于提出的 RNA 是否完整, 以及 RNA 中是否有 DNA 的污染。如果 RNA 被破坏, 则无扩增带出现; 如果有 DNA 污染, 则易出现假阳性反应。为了防止 RNA 被破坏, 在提取前保证组织新鲜或低温冷冻组织, 防止被内源性 RNA 酶降解, 在提取过程中要使用 RNA 酶强抑制剂, 抑制内源性和外源性 RNA 酶。为了防止 DNA 的污染造成的假阳性反应, RNA 被抽提后用 DNA 酶消化去除污染的 DNA。本研究用猎迭宫缘虫的幼虫和成虫组织的总 RNA 作模板, 使用 4 种 T₁₂MN 引物和 1 种随机引物共组合成 8 个 RT-PCR 反应物, 经电泳、干胶和放射自显影后, 从凝胶上筛选出 11 条差异带, 经 PCR 扩增、杂交试验, 筛选出 3 个不同种类的基因片段, 经 Northern 杂交证实片段 1 和片段 2 为裂头蚴特异表达的基因, 片段 3 为非阶段表达的基因。测序后与 GenBank 中的序列进行同源性分析。唯基因片段 3 与多种生物的 28S rRNA 同源。

Northern 杂交结果显示, 片段 3 杂交带于 4.3 kb 处, 与 28S rRNA 的长度相似, 说明此基因片段为猎迭宫缘虫 28S rRNA 的一部分。但此基因在裂头蚴的表达量明显大于成虫。这 3 种基因的全长有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Liu DW, Kato H, Nakamura T, et al. Molecular cloning and expression of the gene encoding a cysteine proteinase of *Spirometra erinacei* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1996, 76:11-21.
 [2] Liu DW, Kato H, Sugane K. Isolation of a cDNA encoding an antigenic polypeptide containing repeating units of *Spirometra erinacei-europaei* [J]. Jpn J Parasitol, 1996, 45:324-327.
 [3] 刘殿武, 刘殿军, 冷双英, 等. 猎迭宫缘虫幼虫一个含重复序列的 cDNA 的分子克隆 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, 17:39-42.
 [4] Chromzynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction [J]. Anal Biochem, 1987, 162:156-169.
 [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual [M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:7.39-7.52.
 [6] Pratt D, Cox GN, Milhausen MJ, et al. A developmentally regulated cysteine protease gene family in *Haemonchus contortus* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1990, 43:181-192.
 [7] Ray C, McKerrow JH. Gut specific and developmental expression of a *Caenorhabditis elegans* cysteine protease gene [J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 51:239-250.
 [8] Meier B, Dobeli H, Certa U. Stage-specific expression of aldolase isoenzymes in the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* [J]. Mol Biochem Parasitol, 1992, 52:15-28.
 [9] Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction [J]. Science, 1992, 257:967-971.
 [10] 龙华, 范清宇, 殷建宁, 等. 改良差示 PCR 技术在肿瘤转移研究中的应用 [J]. 第四军医大学学报, 1999, 20(6):12-13.
 [11] 张辛燕, 冯捷, 李刚, 等. mRNA 差异显示方法筛选卵巢癌相关基因 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1999, 6:204.
 [12] Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, et al. Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential [J]. J Natl Cancer Inst, 1988, 80:209-204.
 [13] Basset P, Bellocq J, Wolf C. A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas [J]. Nature, 1990, 348:699-704.
 [14] Sam W, Lee SW, Tomasetto C, et al. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:2825-2829.

(收稿日期: 2001-03-02 编辑: 富秀兰)

【消息】

《劳动医学》杂志正式更名为《环境与职业医学》

文章编号: 1000-7423(2002)-01-0017-01

2001 年 10 月 15 日, 国家科技部颁发 [国科财字 (2001) 32 号], 正式批准《劳动医学》杂志更名为《环境与职业医学》。为此, 杂志编辑部在原编委会领导下, 经报请中华预防医学会同意, 组建了一年前开始筹备的第四届编委会。以张胜年研究员为主编的新一届编委会 69 名编委来自全国 15 个省、市、自治区, 18 所高校 (博士及硕士导师占 60%), 16 个预防卫生机构, 环境与职业医学领域学者数之比为 2:3。来自世界 7 个国家的刘世杰、Andrew Chen 等 20 位中外著名专家任顾问。2001 年 12 月 23~25 日, 在上海召开了“《环境与职业医学》(原《劳动医学》) 杂志第四届编委会第一次全会”。54 位编委和顾问到会, 中华预防医学会编辑出版部刘伟主任出席会议并讲话, 全国十家中华预防医学会系列杂志及高校、预防卫生机构等祝贺大会召开。

会议认为, 这次杂志更名, 决不是简单的“1+1”, 而是适应人类健康观和医学模式变化及学科发展而产生的职业医学环境医学相融合的新理念、新潮流的一种表达和显现。这一率先与国际接轨的举措, 不仅更有利于学科的交流与发展, 还将会对我国医学教育和卫生机构改革产生积极影响。会议确定“推进环境与职业医学学科发展、提高职业及全体人群健康水平”为新刊的办刊宗旨。与会专家坚信新刊一定会处理好“安全与质量, 普及与提高, 科研与实践, 基础与专题”四大关系, 终至办成一流期刊, 力争早日收录进 SCI 等国际权威信息网。

(《环境与职业医学》编辑部供稿)