

基因重组乳链球菌防龋疫苗的研究

V. 重组乳链球菌中RNA的提取纯化 及RNA点印迹杂交

凌均 樊明文

摘要 对参与蛋白质生物合成的转录产物RNA进行异硫氰酸胍提取,氯化铯超速离心纯化以及RNA点印迹杂交,测定重组乳链球菌中特定的RNA,分析影响重组基因表达的因素。紫外分光法测定获得高浓度(5~8 mg/ml)、纯度($OD_{260}/OD_{280} > 2.0$)RNA。以切口平移生物素标记DNA探针并进行DNA-RNA点印迹杂交,光基因核酸系统检测结果提示,乳链球菌HL 107, HL 45均含有与变形链球菌相同的特定PAc mRNA靶序列及密度扫描影像。提示PAc mRNA作为指导蛋白质合成的中介物存在于重组乳链球菌中,使重组乳链球菌完成了克隆pac基因的表达。
关键词 乳链球菌 防龋疫苗 RNA点印迹杂交 基因工程

根据遗传信息传递表达的中心法则,遗传信息从DNA(基因)RNA蛋白质(性状),由蛋白质分子表现各种不同的信息功能。这种从基因到蛋白的过程称为基因表达。在以DNA为遗传物质的细胞的基因表达过程中, RNA是DNA指导蛋白质合成的中介物,在遗传信息的传递中起着承上启下的作用。本课题对变形链球菌pac基因在乳链球菌中的表达产物PAc进行了检测分析,发现重组子产生的PAc量略低于供体菌变形链球菌,为了提高克隆基因的表达水平,本研究对参与蛋白质生物合成的转录产物RNA进行异硫氰酸胍提取,氯化铯超速离心纯化¹以及RNA点印迹杂交²,以测定重组乳链球菌中特定的RNA,分析影响重组基因表达的因素。

1 材料和方法

1.1 菌种和培养基

变形链球菌 Ingbritt; 重组乳链球菌 HL 45 (pLF45), HL 107 (pLF107); Todd-Hewitt 液体培养基。

1.2 主要试剂和仪器

GIT 缓冲液; 5.7 mol/L 氯化铯; 0.1 mol/L EDTA; 生物缺口标记系统(BioNick Labeling System, 美国Life Technologies 公司); 光敏基因核酸检测系统(Photogene Nucleic Acid Detection System 美国Life Technologies 公司); L8-60M 超速离心机(美国Benkm an); 96孔过滤吸印仪(中国·北京); 尼龙膜(美国Gibco BRL); UV-265 分光光度计(日本·岛津); CS-930 双波长薄层扫描仪(日本·岛津)

1.3 异硫氰酸胍提取、氯化铯梯度超速离心制备RNA

1.3.1 接种重组乳链球菌 HL 45 (pLF45), HL 107 (pLF107)至加有5 μg/ml红霉素, 20 mol/L 苏氨酸的 Todd-Hewitt 培养基中, 30℃ 培养6 h。同时接种变形链球菌 Ingbritt 至 20 mol/L 苏氨酸, Todd-Hewitt 培养基中, 37℃ 厌氧培养6 h。使培养物生长至 10^9 /ml细胞浓度。

1.3.2 室温下离心收集菌细胞。用30% 棉子糖BHI悬浮沉淀细菌,加2 mg/ml溶菌酶, 0.1 mg/ml乙酰溶菌酶, 37℃ 温育。GIT 缓冲液悬浮沉淀细菌。用18号针反复抽吸混悬液, 分裂细胞。

1.3.3 取上相至超速离心管中,加入1.2 g氯化铯,待溶解后再加入1.4 ml 5.7 mol/L 氯化铯, 0.1 mol/L EDTA,然后将样品悬液铺在溶液上方。取SW 50.1转头,于L8-60M 超速离心机中,21℃ 下30000 r/min离心16 h。吸去上清液, RNA溶于0.3 mol/L 醋酸钠,加2.5倍乙醇沉淀。14000 r/min离心,弃上清。将沉淀的RNA样品溶于200 μl 0.01% SDS TE 缓冲液, -20℃ 保存。

1.4 分光光度法测定RNA含量

取3 μl RNA 样品加入3 ml灭菌水中稀释。在UV-265紫外分光光度计中读取RNA在 OD_{260} , OD_{280} 值,作图记录。根据 OD_{260}/OD_{280} 比值估计核酸的纯度。

1.5 RNA点印迹

1.5.1 分别取4 μl RNA 样品(Ingbritt, HL 45, HL 107)加入50 μl 1 mol/L 乙二醛, 0.01 mol/L 磷酸钠缓冲液中, 50℃ 温育1 h。

本课题为国家自然科学基金资助项目,编号39270720

作者单位: 510060 中山医科大学附属光华口腔医院(凌均)
) 湖北医科大学口腔医学院(樊明文)

1.5.2 用 3 mol/L 氯化钠, 0.3 mol/L 柠檬酸钠平衡尼龙膜。

1.5.3 取 50 μl RNA 样本在真空条件下加入多孔过滤吸印仪中的尼龙膜上。

1.5.4 将点印迹尼龙膜置 80 °C 真空干燥 2 h。

1.6 RNA 点杂交

1.6.1 用 BioNick Labeling System 缺口转移法制备生物素标记 1.5 kb pac DNA 探针。

1.6.2 将 RNA Dot 尼龙膜置于 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液中, 100 °C 处理 5 min。将 Dot 膜放在塑料杂交袋中, 加 250 μl/cm² 预杂交液, 42 °C 温育 4 h。取 8 μl 5 ng/μl 探针乙醇沉淀后溶于杂交液中, 100 °C 处理 10 min 使探针变性。去除预杂交液, 加变性探针溶液, 42 °C 水浴振荡过夜。

1.6.3 加 2 ml/cm² 5 × SSC, 0.5% (W/V) SDS, 60 °C 洗膜 2 次, 每次 5 min。加 0.1 × SSC, 1% (W/V) SDS, 50 °C 洗膜 30 min。加 2 × SSC 室温下洗膜 5 min。用 1 ml/cm² TBS-Tween 20 洗膜 1 min, 同时浸润 DNA 对照带。加 0.75 ml/cm² blocking 溶液, 65 °C 温育 1 h。

1.6.4 取 7 μl/100 cm² SA-SP, 用 TBS-Tween 20 1:1000 倍稀释后, 加入放有 Dot 膜的杂交袋中, 温育 10 min。用 12 ml/cm² TBS-Tween 20 室温下洗膜 2 次, 每次 15 min。加 1 ml/cm² 1 × 终洗液, 室温下洗膜 60 min。

1.6.5 暗光下吸取 0.01 ml/cm² 检测剂于 Dot 膜上, 使检测剂扩散后用支持膜封闭。将 Dot 膜与 X 线胶片均放入胶片盒中, 23 °C 曝光 18 h。取出 X 线胶片, 常规冲洗, 观察结果。

2 结 果

2.1 紫外分光光度法测定 RNA 含量及纯度

采用紫外分光光度法作 RNA 定量, 见均呈标准 RNA 吸收曲线, 在 260 nm 处一吸收高峰(图 1), 根据 OD 为 1 相当 40 μg/ml RNA, RNA 纯品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 2.0 以上, 计算样品浓度和纯度如下(见附表), 提示已获得纯化的 RNA 样品。

附表 样品 RNA 的浓度和纯度

	OD ₂₆₀ 值	OD ₂₈₀ 值	纯度	
			OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度 (mg/ml)
变形链菌 Ingbritt	0.156	0.073	2.14	6.24
乳链球菌 HL45	0.126	0.055	2.29	5.04
乳链球菌 HL107	0.185	0.083	2.20	8.40

2.2 生物素标记 DNA 探针与重组乳链球菌 RNA 点杂交

用生物素标记变形链球菌 pac 基因 1.5 kb

DNA 探针与重组乳链球菌 HL45, HL107 及变形链球菌 RNA 杂交, 结果见 pac 基因探针与样品 RNA 均呈阳性杂交反应(图 2)。

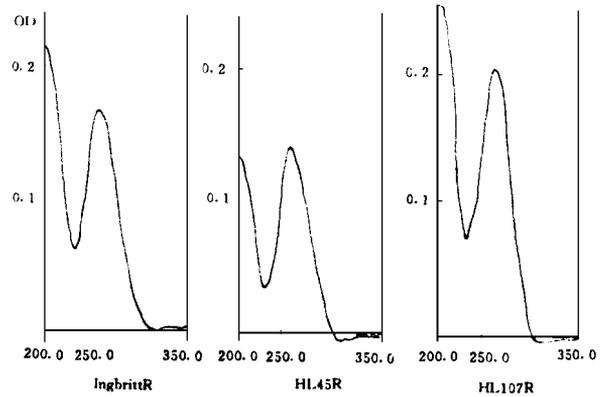


图 1 各 RNA 样本的紫外吸光光谱

3 讨 论

3.1 RNA 的分析研究

细菌的遗传信息以基因的形式位于细胞的 DNA 分子上, DNA 将所控制的遗传信息通过 RNA 转变成蛋白质分子, 从而决定细菌的遗传表型。

通过检测 mRNA 转录物可以分析 DNA 的基因表达, 核酸杂交可用于确定总 RNA 中某种 RNA 的基本结构、浓度和合成速度。RNA 点印迹杂交为利用过量的标记探针与固定在固相支持体上的 RNA 分子杂交, 以相对地确定不同 DNA 样品中待测靶序列的含量^{1,2}。Koga 等³ 在变形链球菌细胞表面蛋白抗原突变株的表面疏水性、附着和聚集的研究中, 采用 RNA 点印迹杂交检测 PAc-特异性 (PAc-S)mRNA 转录的量, 发现变形链球菌突变菌株 TK15 和 TK18 PAc-S mRNA 转录的表达大约是变形链球菌 M8148 和 GS-5 菌株的 8 倍, TK15 和 TK18 的 PAc 和 PAc-S mRNA 的高表达, 提示这些转化子可用于制备大量高纯度的 PAc 表面蛋白抗原。Iwaki 等⁴ 通过 RNA 点印迹法对重组乳链球菌中的 pac 基因的转录水平进行分析, 发现乳链球菌 L1403 (pSM1) 的 PAc-S mRNA 的水平低于野生型变形链球菌 M8148 4~8 倍。从而推测由于在 3'-末端缺少 207 个碱基对, C-末端缺少 69 个氨基酸, 引起了无效转录和合成不成熟的 mRNA, 以及无效转译, 导致了转化子的低 PAc 表面

蛋白抗原量。本研究以异硫氰酸胍提取,氯化铯梯度超离心纯化 RNA,通过点印迹杂交及薄层扫描分析,发现重组乳链球菌 HL 45 (pLF45) 和 HL 107 (pLF107) 的 RNA 水平与变形链球菌 Ingbritt 一致,点免疫印迹分析亦已证实重组乳链球菌 HL 107 可以形成 PA c 表面蛋白抗原。提示 PA c-S mRNA 作为指导蛋白质合成的中介物存在于乳链球菌中,重组乳链球菌经过了以 DNA 为模板,在 RNA 聚合酶催化下由 4 种三磷酸核苷 (ATP, UTP, GTP 和 CTP) 合成 RNA 的转录过程,以及以 mRNA 为模板,利用各种氨基酸合成蛋白质的转译过程,即通过信使 RNA、核糖体 RNA 和转运 RNA 等转录产物,完成了克隆 pac 基因的表达。

3.2 关于 RNA 的提取、纯化及分析方法

在 RNA 的提取过程中, 一个重要的问题是样本中 RNase 污染所致的 RNA 分子降解, 因此, 操作 RNA 时必须采取一系列措施防止内外源 RNase 的存在。为了获得高质量的 mRNA, 本研究选用裂解细胞和灭活 RNA 酶同步进行的方法, 通过硫氰酸胍提取 RNA, 最大限度地降低细胞破碎过程中所释放的 RNA 酶的活性。

为了获得高纯度 RNA, 本研究选用氯化铯密度梯度超速离心进行制备纯化。根据氯化铯密度梯度离心原理, 本研究将硫氰酸胍裂解的细胞匀浆铺在氯化铯浓溶液上, RNA 在氯化铯中的浮密度 (> 1.8 g/ml) 比其它细胞部分的浮密度大得多, 离心过程中, RNA 在管底形成沉淀, 而 RNA 和蛋白质则悬浮在上层液体中。取出的沉淀物经紫外分光光度计测定, 获得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均为 2.0 以上的高纯度 RNA。

3.3 基因重组乳链球菌 RNA 点印迹杂交

本研究的主要目的是测定重组乳链球菌的特定 RNA, 同时相对地确定不同菌株中 RNA 的含量。实验中首先用乙二醛使 RNA 含有的双链区变

性, 使单链 RNA 能有效地结合在滤膜上。乙二醛通过共价结合鸟嘌呤残基, 形成一种在酸性和中性 pH 下稳定的加合物而变性 RNA, 连接乙二醛的核酸能有效地与尼龙膜结合。然后将变性 RNA 样品加入多孔过滤吸印仪使核酸在负压下以固定的斑点状聚积于尼龙膜上, 用切口平移生物素标记变形链球菌 pac 基因中段的 1.5 kb DNA, 制备生物素 DNA 探针, 进行 DNA-RNA 杂交, 以光基因核酸检测系统检测杂交结果, 提示乳链球菌 HL 107, HL 45 均含有与变形链球菌 Ingbritt 相同的特定 PA c-S mRNA 靶序列。RNA 点印迹杂交薄层扫描结果显示, 重组乳链球菌与变形链球菌具有相同的密度影像, 提示 HL 107, HL 45 的 RNA 浓度与变形链球菌相近。

(本文图 2 见中心插页 13)

4 参考文献

- 1 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 7.3-7.87
- 2 Thomas P. Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose membrane. Methods Enzymol, 1983, 100: 255
- 3 Koga T, Okahashi N, Takahashi I, et al. Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of streptococcus mutans serotype c. Infect Immun, 1990, 58: 289
- 4 Iwaki M, Okahashi N, Takahashi I, et al. Oral immunization with recombinant streptococcus lactis carrying the streptococcus mutans surface protein antigen gene. Infect Immun, 1990, 59: 2929
- 5 林万明主编. 核酸探针杂交实验技术. 北京: 中国科学技术出版社出版, 1992: 18
- 6 齐义鹏, 黄永香, 梁明山编著. 基因工程原理和方法. 成都: 四川大学出版社, 1988: 250

(1997-04-28 收稿)

(下转第 311 页)

第六届全国副省级市口腔学术会在深圳市召开

第六届全国副省级市口腔医学学术会于 1997 年 11 月 7~11 日在深圳市举行, 本次会议由中华口腔医学会深圳分会主办。会议由深圳市口腔医学会常务主席、深圳红十字会医院张文清教授主持。深圳市副市长袁汝稳、卫生局副局长徐国光莅临大会并讲话, 祝贺本次大会的胜利召开。

全国口腔医学界知名的专家、教授史俊南、岳松龄、王谦、张举之等 16 位在大会上做了专题报告。介绍了口腔医学的新进展、新材料、新疗法、新技术。《中华口腔医学杂志》《华西口腔医学杂志》也派代表参加大会。大会收到论文 378 篇, 到会代表 200 余人。本次会议采用专家专题报告、论文贴榜的形式举行, 受到与会代表普遍的赞许。

(张文清)