

文章编号: 1000- 0615(2005)01- 0124- 04

• 研究简报 •

罗氏沼虾 18S rRNA 基因生物素标记探针的制备及应用

高风英^{1,2}, 叶 星¹, 白俊杰¹, 吴锐全¹, 劳海华¹, 简 清¹, 罗建仁¹

(1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;

2. 湛江海洋大学水产学院, 广东 湛江 524025)

关键词: 罗氏沼虾; 18S rRNA; 克隆; 生物素标记探针; 内参照

中图分类号: S917

文献标识码: A

Preparation and application of the biotin-labeled probe of 18S rRNA gene in *Macrobrachium rosenbergii*

GAO Feng-ying^{1,2}, YE Xing¹, BAI Jun-jie¹, WU Rui-quan¹

LAO Hai-hua¹, JIAN Qing¹, LUO Jian-ren¹

(1. Pearl River Fisheries Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;

2. Fisheries College of Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: Probes are essential for study of gene expression and regulation. In this study, a method was established to prepare the biotin-labeled probe for 18S rRNA gene of freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. And the labeled method was used to produce a lysozyme gene probe, then applied in analysis of lysozyme gene expression. Primers were designed according to the nucleotide sequences of 18S rRNA of Decapoda in order to isolate the 18S rRNA gene sequences of *M. rosenbergii*. Total genomic DNA was isolated from hepatopancreas of the freshwater prawn. A specific DNA fragment with desired size was amplified by PCR using the total DNA as templates. The DNA fragment was inserted into pGEM-T Easy vector and sequenced. The result of BLAST and alignment analysis confirmed that the DNA fragment isolated was the 18S rRNA gene of *M. rosenbergii*, which was 418 nt in length. Biotin-labeled probe of the 18S rRNA was then produced by PCR using the recombinant plasmid as templates. The biotin-21-dTTP and the non-labeled dNTP were added to the PCR reaction system. Ratio of the biotin-21-dTTP and the non-labeled dTTP was 3 to 1. The yield of the labeled probe is $300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. The detection limit of the probe is 60 pg. A biotin-labeled probe of lysozyme gene was prepared by the same label method, and the yield of the lysozyme gene probe is $500 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. These biotin-labeled probes were applied in Northern dot blotting analysis of tissue distribution of lysozyme mRNA of *M. rosenbergii*. Signals were scanned and quantified by Analysis System of Biology Image. The signal intensity ratio of the lysozyme to 18S rRNA represents the relative expression level of lysozyme mRNA. The results showed that the lysozyme mRNA existed in all the tissues checked, including eye, muscle, gill, hepatopancreas, haemocytes and intestine. But lysozyme mRNA levels varied among different tissues. The highest level was found in the intestine, and the second was in the hepatopancreas and the lowest was in the muscle. The signal intensities of 18S rRNA among tissues were consistent, which showed that the 18S rRNA gene expressed stably in different tissues and could be used as an internal standard for researches of specific gene expression in prawns.

Key words: *Macrobrachium rosenbergii*; 18S rRNA; clone; biotin-labeled probe; internal standard

探针 (probe) 是带有标记的特定 DNA (RNA) 片段, 是核酸杂交鉴定特定基因以及研究特定基因组织表达的重要工具^[1]。PCR 标记法是近年来发展起来的酶促标记基

因探针的方法之一^[2]。常用的标记物有放射性物质 (如 $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$) 和非放射性物质 (地高辛, 生物素, 荧光素等)^[2]。在非放射性的标记物质中, 生物素由于具有较高的化学稳定

收稿日期: 2003-11-17

资助项目: 广东省自然科学基金项目 (20010673)

作者简介: 高风英 (1976-), 女, 山东潍坊人, 硕士研究生, 主要从事水产生物技术研究。

通讯作者: 叶 星, Tel: 020-81616127, E-mail: yexing@163.net

性和使用安全等优点而受到瞩目^[3]。在研究特定基因组织表达的过程中, 由于仪器精确度限制和操作误差等因素, 使用于杂交的各样品上样量难以达到绝对一致。如没有内参照杂交信号间的可比性就会降低而影响实验结果的可靠性。脊椎动物的基因表达检测多使用 β -肌动蛋白作为内参照^[4, 5]。无脊椎动物的研究则用 β -肌动蛋白也有用 18S rRNA 的。18S rRNA 基因是真核生物编码核糖体 RNA 的基因之一, 与 5.8S 和 28S 组成一转录单元, 存在于机体的所有细胞内^[6]。早期无脊椎动物的相关研究中大多未使用标记探针, 而直接通过电泳和溴化乙锭染色, 把 18S rRNA 条带作为上样量和 RNA 质量的参照^[7, 8]。近年来开始使用标记探针, Destoumiex 等使用³²P 标记探针检测南美白对虾抗菌肽的组织表达^[9, 10]。Yeh 等^[11]用地高辛标记的 β -肌动蛋白作内参照检测斑节对虾血淋巴凝集蛋白基因的表达。Chan 等^[12]用地高辛标记的 18S rRNA 作内参照检测对虾核受体基因的组织表达。但未见有 18S rRNA 生物素标记探针的报道。本实验采用 PCR 法制备罗氏沼虾 18S rRNA 基因生物素标记探针, 并应用此标记方法制备溶菌酶基因生物素标记探针, 用于检测罗氏沼虾溶菌酶基因的表达, 为虾类和其它无脊椎动物特定基因表达研究过程内参照探针和生物素标记探针的制备提供技术参考。

1 材料与方 法

1.1 试验 虾、酶和主要试剂

罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) 购自广东肇庆市养殖户。限制性内切酶、T4DNA 连接酶等主要试剂购自华美生物工程公司或 Promega 公司。总 DNA 提取盒和 pGEM-T Easy Vector 为 Promega 公司产品。大肠杆菌 DH5 α 由本室保存。扩增引物由上海生物工程公司合成。生物素标记的单核苷酸 (biotin-2'-dTTP) 购自 Clontech 公司。

1.2 罗氏沼 虾 18S rRNA 基因片段的克隆

按 DNA 提取试剂盒介绍的方法提取罗氏沼虾肝胰腺总 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测总 DNA 的质量和浓度。参照已报道的十足目种类 18S rRNA 基因序列, 设计并合成 PCR 引物 P1: 5' AGG GAA GAG CGC TTT TAT TA3', P2: 5' CTA TTG GAG CTG GAA TTA CC3'。以提取的总 DNA 为模板, PCR 扩增罗氏沼虾 18S rRNA 基因片段。目的基因的克隆方法参照文献 [2]。重组质粒在 ABI PRISMTM 377 全自动荧光测序仪上进行序列测定。用 DNA 分析软件 VECTOR NTI 6.0 和 Internet 上的 Blast 程序进行序列分析比较。

1.3 18S rRNA 基因片段的生物素标记

以 18S rRNA 基因片段的重组质粒为模板, 进行 PCR 扩增标记。反应体系: H₂O 28 μ L, 10 \times PCR Buffer 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol \cdot L⁻¹) 4 μ L, dATP (10 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L,

dCTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L, dGTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 1 μ L, dTTP (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.75 μ L, Biotin-dTTP (0.5 mmol \cdot L⁻¹) 5 μ L, P1 1 μ L, P2 1 μ L, Taq 酶 0.5 μ L, 模板 2 μ L, 总体积 50 μ L。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min 后进入循环: 94 $^{\circ}$ C 3 min 预扩增, 然后进入循环, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。

1.4 探针标记产量及检测灵敏度测定

所合成探针经纯化后, 紫外分光光度计测定所标记探针的产量。参考文献 [13] 将合成的 DNA 探针依不同的浓度倍比稀释, 95 $^{\circ}$ C 热变性 10 min 后, 直接点膜、封闭、酶联、显色。以曝光在 X 光片上的信号强度介于可见与不可见之间的上样量为检测灵敏度。

1.5 罗氏沼 虾 溶菌酶基因生物素标记探针制备

以本实验室构建的罗氏沼虾溶菌酶基因重组质粒 T-lyz 为模板。用于扩增罗氏沼虾溶菌酶基因片段的特异引物为: P1 5'-GTG ATA ATA CTT GGA TCA TAG AAA TG-3', P2 5'-CTA GAA CGG GAA GAC AGA GTT GG3'。扩增与标记方法同上。探针使用前 95 $^{\circ}$ C 变性 10 min, 立即置于冰上待用。

1.6 斑点杂交检测罗氏沼 虾 溶菌酶基因的组织表达

预杂交和杂交: 将用 Trizol 试剂提取的眼、肌肉、鳃、肝胰腺、血淋巴和肠管等组织的总 RNA 约 5 μ g, 变性后点于干燥的尼龙膜上, 微波炉 750W 烘烤 2~3 min。于 42 $^{\circ}$ C 预杂交 2h 后, 置于含探针 (100 ng \cdot mL⁻¹) 的杂交液 (含 50% 甲酰胺) 中过夜 (16~18 h)。

洗膜及杂交结果检测: 杂交后的尼龙膜用含 0.5% SDS 的 2 \times SSPE 室温漂洗 2 次, 每次 15 min。含 0.5% SDS 的 0.2 \times SSPE 55 $^{\circ}$ C 洗 2 次, 每次 30 min。然后按以下步骤检测: detector block solution 温育 45 min 后换新溶液并加入 AP-SA 温育 30 min。用 1 \times phosphate wash solution 中洗 3 次, 每次 5 min。再在 1 \times assay buffer 中洗 2 次, 每次 2 min。于 CDP-star chemiluminescent substrate 中静置温育 5 min。蘸去多余水分后, 将尼龙膜放在杂交袋中, 在暗盒中曝光于 X 胶片。常规手工洗片保留结果。将杂交后的尼龙膜用煮沸的 0.1% SDS 将第 1 次杂交的探针洗脱下来以后再与第 2 个探针杂交。杂交条件及程序同上。

光密度扫描与数值统计: 曝光信号用 FR-1000 生物图像分析系统分析杂交斑点的平均光密度。该光密度和斑点的面积的乘积代表杂交信号的强度。杂交信号强度的数值分析方法参照文献 [9, 10], 重复 3 次实验, 取其结果平均值。

2 结 果

2.1 罗氏沼 虾 18S rRNA 基因片段的克隆与测序

胶回收大小约 400bp 的特异带并克隆到 T 载体上, 筛选并酶切鉴定重组子 (图 1)。重组子序列测定表明所克

隆的基因片段确为罗氏沼虾的 18S rRNA 基因片段 (GenBank accession no. AY461599)。该基因片段与同属长臂虾科的小长臂虾 (*Palaemonetes kadiakensis*) (M34359) 相应片段同源性高达 90%；与不同科的其它种类如玻璃虾科的猛细螯虾 (*Parastacus pugnax*) (AF235969)、龙虾科的海岛岩龙虾 (*Jasus tristani*) (AF498664) 等的同源性均高于 85%。

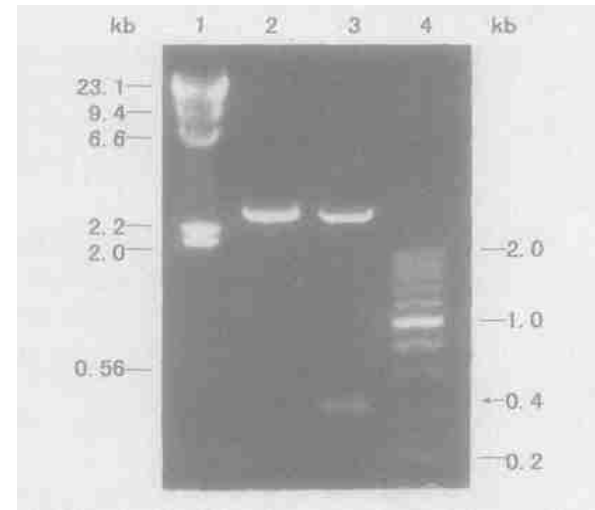


图1 罗氏沼虾 18S rRNA 基因重组子酶切鉴定
Fig. 1 Identification of 18S rRNA recombinants
1. λ DNA/*Hind* III-DNA marker; 2. T vector/*pst* iv;
3. T-18S recombinant/*Eco*R iv; 4. 200 bp marker

2.2 18S rRNA 基因探针标记产量与灵敏度

紫外分光光度计测定所标记探针的产量约为 $300 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。探针样品直接点膜酶联显色检测 18S rRNA 基因探针的灵敏度约为 60 pg(图 2)。

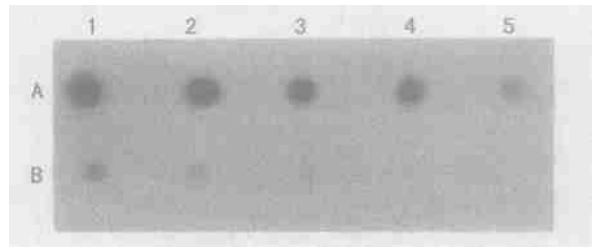


图2 18S rRNA 基因探针灵敏度检测
Fig. 2 The detection limit of 18S rRNA gene probe
lane A 1- 5: 15 ng; 7.50 ng; 3.78 ng; 1.92 ng; 0.94 ng
lane B 1- 5: 0.48 ng; 0.24 ng; 0.12 ng; 60 pg; 30 pg

2.3 18S rRNA 生物素标记探针在罗氏沼虾溶菌酶基因表达研究中的应用

用所制备的生物素标记内参照 18S rRNA 基因探针和溶菌酶基因探针与各组织总 RNA 样品进行斑点杂交,显示罗氏沼虾溶菌酶基因在眼、肌肉、鳃、肝胰腺、血淋巴、肠管等组织中均有表达(图 3),但表达量有差别。其中在肠管中的相对表达量最高,肝胰腺次之,肌肉中的相对表达量最低(图 4)。18S rRNA 基因在各组织间获得了相近的杂交信号强度。

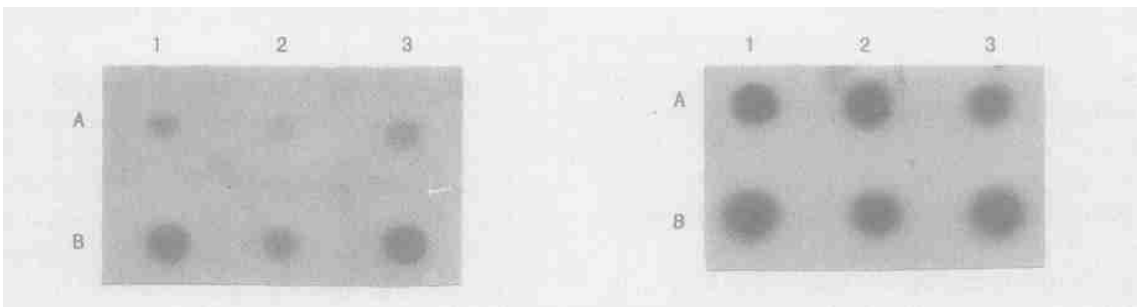


图3 罗氏沼虾溶菌酶基因在各组织中的表达

Fig. 3 Tissue expression of *M. rosenbergii* lysozyme gene

左图: 溶菌酶基因探针与各组织总 RNA 斑点杂交; 右图: 18S rRNA 探针与各组织总 RNA 斑点杂交
left: Northern dot blotting with lysozyme probe; right: Northern dot blotting with 18S rRNA probe
lane A 1- 3: 眼; 肌肉; 鳃; lane B 1- 3: 肝胰腺; 血淋巴; 肠管
lane A 1- 3: eye; muscle; gill; lane B 1- 3: hepatopancreas; haemocytes; intestine

3 讨论

本实验用 PCR 法成功合成了生物素标记的 DNA 探针,且所制备的探针检测灵敏度较高。高志贤等用生物素标记的葡萄球菌肠毒素 B 基因探针的检测灵敏度为 $250 \text{ pg}^{[14]}$, 本实验所合成的探针检测灵敏度为 60 pg, 比前者高出 4 倍。灵敏度差异的原因可能是由于所使用的生物

素的臂长不同所致。本实验使用的生物素标记的核苷酸为 biotin-2'-dUTP, 而前者使用的为 biotin-1'-dUTP。生物素的臂长越长,在标记过程中的掺入率会降低但臂长越长其检测灵敏度会越高^[15]。本实验使用 biotin-2'-dUTP 是目前使用的连接臂最长的生物素,可有较高的检测灵敏度。

杂交过程中 DNA 分子量的大小和浓度直接影响杂交

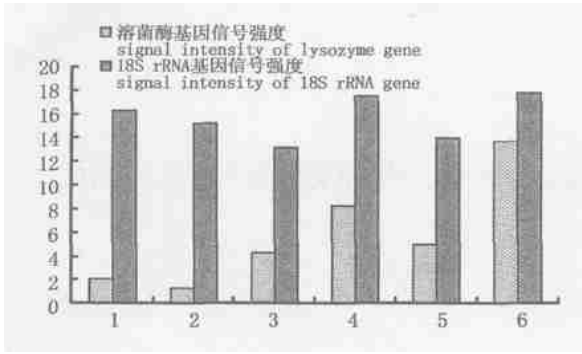


图4 罗氏沼虾溶菌酶基因在各组织中的表达

Fig. 4 Tissue expression of *M. rosenbergii* lysozyme gene

1. 眼; 2. 肌肉; 3. 鳃; 4. 肝胰腺; 5. 血淋巴; 6. 肠管
1. eye; 2. muscle; 3. gill; 4. hepatopancreas;
5. haemocytetes; 6. intestine

速度。片段越长, 扩散速度越慢, 杂交速度越慢^[14], 探针长度一般不大于 500 bp。在一般规定的条件下核酸中每 100~150 个碱基可接合 1 个生物素^[3], 本实验设计标记的 18S rRNA 的长度为 418 bp, 溶菌酶探针长度为 477 bp, 均有较好的杂交效果。检测过程中生物素标记的核酸探针与链酶亲和素(抗生物素蛋白)和碱性磷酸酶的复合物结合, 可使加入的碱性磷酸酶作用底物在暗处发出肉眼可见荧光, 该荧光可持续几小时到数天。本实验观察到的可见荧光持续时间大约为 24 h, 每次曝光时间只需 1~3 min。因此可供多次曝光, 克服了放射性标记检测曝光时间长, 基本上不能重复曝光的缺点。所制备的 18S rRNA 生物素标记探针初步应用于检测罗氏沼虾溶菌酶基因组织表达, 结果显示 18S rRNA 探针在各组织间获得了相近的杂交信号强度(图 4), 溶菌酶基因的杂交信号则有差异(图 3), 显示出较好的内参照效果。目前本实验室正应用此标记探针进一步检测罗氏沼虾受细菌感染后溶菌酶基因表达水平的变化。此探针制备方法的建立也可为今后虾类及其它无脊椎动物的特定基因表达研究提供参考。

参考文献:

- [1] 齐义鹏. 基因及其操作原理[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1998. 168-170.
- [2] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 719-800.
- [3] 姜泊, 张亚历, 周殿元. 分子生物学常用实验方法[M]. 人民军医出版社, 1995. 122-123.
- [4] Jur-ichi H, Sonomi M, Ikuo H, et al. Molecular cloning, expression and evolution of the Japanese flounder goose-type lysozyme gene, and the lytic activity of its recombinant protein[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2001, 1520: 35-44.
- [5] Hirono I, Nam B H, Kurobe T, et al. Molecular cloning, characterization, and expression of TNF cDNA and gene from Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. Journal of Immunology, 2000, 165: 4423-4427.
- [6] 阎隆飞, 张玉麟. 分子生物学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1997. 193-194.
- [7] Won J L, Paul T B. Isolation and characterization of the lysozyme-encoding gene from the silkworm *Bombyx mori* [J]. Gene, 1995, 161: 199-203.
- [8] Souchi F, Izumi T T, Keiko K, et al. Protein purification, cDNA cloning and gene expression of lysozyme from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2001, 128: 709-718.
- [9] Destouniex D, Munoz M, Cosseau C, et al. Panacidsins, antimicrobial peptides with chitin-binding activity, are produced and stored in shrimp granulocytes and released after microbial challenge [J]. J Cell Sci, 2000, 113: 461-491.
- [10] Munoz M, Vandembulcke F, Sauthier D, et al. Expression and distribution of penaeidin antimicrobial peptides are regulated by haemocyte reactions in microbial challenged shrimp [J]. Eur J Biochem, 2002, 269: 2678-2689.
- [11] Yeh M S, Huang C J, Len J H, et al. Molecular cloning and characterization of a hemolymph clottable protein from tiger shrimp (*Penaeus monodon*) [J]. European Journal of Biochemistry, 1999, 266(2): 624-33.
- [12] Chan S M. Cloning of a shrimp (*Metapenaeus ensis*) cDNA encoding a nuclear receptor superfamily member: an insect homologue of E75 gene [J]. FEBS Letter, 1998, 9, 436(3): 395-400.
- [13] 王子慧, 于鼎, 王瑞绵. PCR 法及随机引物法标记 cDNA 探针杂交效率的研究 [J]. 湖北医科大学学报, 2000, 21(1): 4-6.
- [14] 高志贤, 郑玉玲, 晁福襄, 等. 生物素标记的 DNA 探针检测葡萄球菌肠毒素 B 基因 [J]. 中华医学检验杂志, 1999, 22(5): 281-283.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验指导 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.