

文章编号:1000-0615(2007)06-0731-06

应用 RD-PCR 技术构建溶藻弧菌的 cDNA 文库

王蓓, 吴灶和, 简纪常, 鲁义善

(广东海洋大学水产学院, 广东省水产经济动物病原生物学及流行病学重点实验室暨广东省教育厅
水产经济动物病害控制重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要:应用限制性显示 PCR(RD-PCR) 技术构建溶藻弧菌 poly(A) 化 mRNA 的 cDNA 文库, 筛选, 收集巧妙地解决了由于细菌 mRNA poly(A) 化位点的高度多态性、用常规方法构建原核 cDNA 文库所遇到的文库大量重复冗余的难题。并进行筛选、收集 cDNA 片段进行测序, 根据测序结果进行生物信息学分析和结果验证。实验结果表明, 我们成功地构建了溶藻弧菌 poly(A) 化 mRNA 的 cDNA 文库, 获得一百多个基因片段并对其中 53 个基因片段进行测序分析, 获得了如细菌 III 型分泌系统易位蛋白、趋药性传感器、类丝氨酸蛋白酶等毒力相关因子的基因片断。并且在一定程度上证实了 poly(A) 化在细菌中不是个别和偶然的发现。实验结果说明了我们所构建的溶藻弧菌 poly(A) 化 mRNA 的 cDNA 文库质量高, 文库基因片段的重复性低, 筛选基因片段效率高、目的性强。本文并探讨了限制性显示 PCR 技术在细菌 poly(A) 化 mRNA 的 cDNA 文库构建中的应用价值。

关键词:溶藻弧菌; cDNA 文库; 限制性显示 PCR

中图分类号:S 917

文献标识码:A

A cDNA library of *Vibrio alginolyticus* constructed by restriction display-PCR

WANG Bei, WU Zao-he, JIAN Ji-chang, LU Yi-shan

(Fisheries College of Guangdong Ocean University, Guangdong Province Key Laboratory of Pathogen Biology and Epidemiology of Aquatic Economic Animals & Education Department Key Laboratory of Control for Diseases of Aquatic Economic Animals, Zhanjiang 524025, China)

Abstract: A cDNA library of *Vibrio alginolyticus* mRNA with poly(A) tracts was constructed and identified by restriction display PCR (RD-PCR), which can greatly decrease the redundancy of cDNA libraries and the polymorphic site of polyadenylation of bacterial mRNA. After being selected and screened, bioinformatics of 53 clones were analyzed. The results showed that some genes such as translocation protein in type III secretion, type III secretory pathway component EscU, putative chemotaxis transducer, secreted trypsin-like serine protease were identified. This indicated that polydenylation of the 3' end of mRNA could also be found in bacteria. The result showed the cDNA fragments library is of high quality, low reproducibility, which also have high efficiency. The applied value of RD-PCR in construction of cDNA library of *Vibrio*

收稿日期:2006-12-06

资助项目:广东省重大科技专项“海水养殖鱼类重大流行性疾病的诊断、监测和防治技术研究”(A3050302);广东省重大专项“海水鱼类重大疾病疫苗及快速诊断”(A20401001)

作者简介:王蓓(1982-),女,山东潍坊人,硕士研究生,从事水产经济动物病害控制及病原生物学研究。Tel:0759-2362191, E-mail:jenkins_521@yahoo.com.cn

通讯作者:吴灶和, Tel:0759-2383023, E-mail:wuzh@gdou.edu.cn

alginolyticus mRNA with poly(A) tracts was also analyzed in this research.

Key words: *Vibrio alginolyticus*; cDNA library; restriction display-PCR (RD-PCR)

溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 是一种革兰氏阴性嗜盐菌,广泛存在于世界各地海水和海产品中,是海水养殖动物如鱼、虾、贝类等的致病菌,同时也是引起人食物中毒和急性腹泻的重要病原菌^[1]。目前,大多数学者对该细菌的研究主要集中在外膜蛋白及抗溶藻弧菌独特型单克隆抗体方面,并且取得了一定的成就,然而,对于溶藻弧菌文库构建、功能基因、毒力因子的研究尚缺乏。构建溶藻弧菌的 cDNA 文库,通过生物信息学分析,是获得功能基因的有效途径,这也是本实验的目的。

自 1976 年首例 cDNA 克隆问世以来,cDNA 文库构建方法有了很大进步,已成为真核生物分子生物学的基本手段,但在原核生物却几乎止步不前。这是因为细菌 mRNA 代谢快速高效,半衰期仅为几分钟,3'端 poly(A)尾少、短和不稳定^[2-3],使得 mRNA 的纯化和用 oligo(dT)逆转录均存在较大困难,若沿用真核 cDNA 文库构建方法,即便是克隆成功,cDNA 文库也会存在大量的冗余和重复的信息,所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^[4]。2002 年,胡子有等利用 oligo(dT)与 poly(A)特异结合的特性从 *E. coli* 中纯化出 mRNA,用 oligo(dT)为引物逆转录,并用限制性显示 PCR 技术 (restriction display-PCR)^[5],克隆了 100 多个基因片段,并对其中 40 个片段进行了测序及分析。鉴于原核生物细菌的特殊性质,本研究采用 oligo(dT)₁₈为逆转录引物合成 cDNA,采用限制性显示 PCR (RD-PCR) 技术从溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 克隆了 100 多个基因片段,并对其中的 53 个进行了测序鉴定,而后利用表达序列标签 (ESTs) 技术对溶藻弧菌进行研究,获得了一些与溶藻弧菌致病性有关的基因以及功能基因,这对于我们进一步深入研究溶藻弧菌、制备弧菌工程疫苗、探讨弧菌病害防治新方法方面具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用的溶藻弧菌由患病赤点石斑鱼分离纯

化,保存于本实验室;*E. coli* DH5 α 购买于上海生物工程技术有限公司并保存于本实验室。

接头和 PCR 引物均由上海生物工程技术有限公司合成。组成接头的两个寡核苷酸分别是 SIP: 5'-pGATCCACACCAGCCAAACCCA-3', SIR: 5'-GGTTTGGCTGGTGTG-3'。通用引物 M: GTTTGGCTGGTGTGGATC。RD-PCR 选择性引物是在通用引物的 3'端分别引伸一个碱基 G,A,T,C 而得 MG,MA,MT,MC。

1.2 方法

细菌培养 取保存的溶藻弧菌菌株,平板划线后 28 °C 培养 24 h,挑取单菌落转移至 100 mL 液态 TSA 培养基中,28 °C 震荡培养 8 h,细菌的培养时间不益过长,以 8~10 h 为佳,否则 RNA 提取效果不好,容易降解。测 A₆₀₀ 约为 0.6。

总 RNA 的制备及 mRNA 的纯化 总 RNA 的制备使用 EZ spin column total RNA Isolation Kit(购于上海生工生物工程公司)试剂盒进行,BIO-TEK 酶标仪进行定量,取 2 μ L RNA 进行 1.5% 琼脂糖电泳,并对提取的总 RNA 用无 RNase 的 DNase I 进行消化,以防痕量基因组 DNA 污染。mRNA 的纯化用 Omega Biotek 的 E. Z. N. A mRNA Enrichment Kit,按说明书操作。

cDNA 合成 cDNA 第一链合成按 Superscript III(购于 Invitrogen 公司)的说明书进行,第二链的合成按照文献[6]进行,各酶用量有所调整,具体用量如下:加入第一链产物 2 μ L,10 \times *E. coli* DNA polymerase buffer 30 μ L,*E. coli* DNA polymerase 12U,10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 3 μ L,*E. coli* RNase H 120U,*E. coli* DNA Ligase 100U,RNase free H₂O 89 μ L后,轻轻搅拌,16 °C,2 h,然后 70 °C 加热 10 min,加入 T4 DNA polymerase 20U,10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 3 μ L,BSA 2 μ L,37 °C 反应 10 min,加入 15 μ L EDTA(0.25 mmol \cdot L⁻¹)终止反应。

接头的制备 取寡核苷酸片段 SIP(500 μ g \cdot mL⁻¹)和 SIR(330 μ g \cdot mL⁻¹)等体积于一 PCR 管内混匀,在 PCR 仪上加热至 90 °C 5 min,随后在 30 min 内使其温度逐渐降低到室温,形成的接头(SIP/SIR)经分装后于 -20 °C 贮存备用。

RD-PCR 参照文献[7-8]方法将逆转录获得的 cDNA 2 μL (约 1 μg), 加入 *Sau3A I* 1.5 μL , 2 μL 10 \times 反应缓冲液, 于 20 μL 总反应体积中 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3 h, 然后 70 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。然后取产物 5 μL 和 6 μL 接头, 用 T4 连接酶 1 μL , 30 μL 总反应体积, 16 $^{\circ}\text{C}$ 连接 3 h 即可用于 RD-PCR 模板。取连接产物 1 μL , *Taq* 聚合酶 1 μL (5U), 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP mixture 1 μL , 10 \times PCR Buffer 5 μL , 配对的选择引物(如 MG 和 MA, 浓度均为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各取 1 μL , 50 μL 进行 PCR。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。4 种不同选择性引物 MA、MG、MT、MC 共有 10 种不同的组合, PCR 分成 10 组进行。若酶切加接头连接产物直接做模板, PCR 产物不理想, 可先用通用引物扩增, 再以通用引物扩增后的产物做模板, 再进行选择性 PCR。

RD-PCR 产物片段的克隆和测序 RD-PCR 产物使用 T 载体连接, 具体操作参见 PMD18-T 载体(购于大连宝生物工程有限公司)说明书。感受态细胞的制备及转化按文献[9-10]进行, 经快速 PCR 鉴定, 并经小量培养阳性菌落后寄往上海英俊生物工程公司进行测序。

生物信息学分析 测序结果使用 BLASTx 程序将处理后的 EST 序列在蛋白质水平上与 NCBI 非冗余蛋白质数据库 (non-redundant protein database) 进行同源性比较。所有参数设置均使用默认值。序列对齐分值 (score) 大于 80 且序列同一性大于 35% 的搜索结果认为有生物学意义上的显著相似性。挑选其中分值最高的蛋白质作为相应 EST 最有可能的翻译产物。

2 结果与分析

2.1 细菌的总 RNA 质量鉴定

图 1 为溶藻弧菌总 RNA 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳结果。从图中可见明显的 23S、16S 条带, 23S 约为 16S 的两倍, $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.8$, 这说明了总 RNA 质量很好, 达到可以进行后续反应的要求。10 mL 的 A_{600} 值为 0.6 的菌液, 得总 RNA 约 400 μg 。

2.2 10 种不同引物组合的 PCR 反应结果

图 2 为 10 种不同引物组合的 PCR 反应电泳结果。从图中可以看出, 组 at 可以见到 6 条清晰

的条带, 组 ag、tg、cg 可以见到 5 条带, 组 ac、cc 有 4 条带, 组 aa、tc、gg 可以见到 3 条清晰的条带。片段连接克隆后, 快速 PCR 鉴定结果初步表明实际每组所含片段与图示基本相符, 稍多于图示, 且条带主要分布在 250 ~ 750 bp 之间。

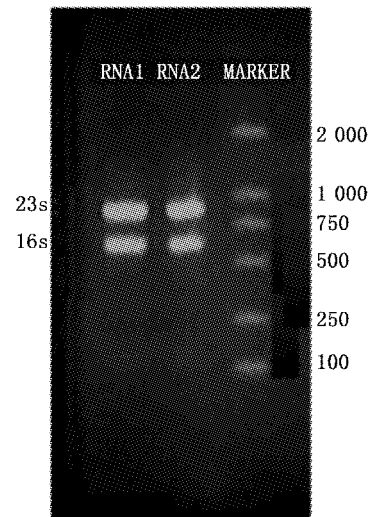


图 1 溶藻弧菌总 RNA 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 1 1.5% electrophoresis of *vibrio alginolyticus* total RNA

M: DNA Marker DL2000; RNA1: 经 DNase I 消化后的总 RNA; RNA2: 没有经 DNase I 消化后的总 RNA
M: DNA marker DL 2000; RNA1: total RNA after DNase I digestion; RNA2: total RNA before DNase I digestion

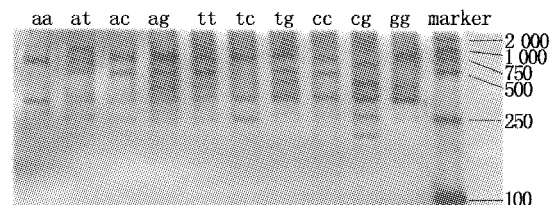


图 2 RD-PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram of PAGE of the RD-PCR products

2.3 菌落克隆的快速 PCR 鉴定

图 3 为 PCR 产物连接转化的克隆快速 PCR 鉴定部分克隆电泳图。本试验共得到 100 多个克隆, 以 M13 通用引物对其进行鉴定, 得到 100 多个阳性克隆。该图为 ag 组的 61-72 号克隆 PCR 鉴定的电泳图。

2.4 测序分析

随机挑选 53 个阳性克隆菌斑, 送往上海英俊生物技术有限公司进行测序。将 DNA 结果

进行 BLASTx 比较,进行同源性基因搜索,有效 ESTs 序列分类见表 1。从中挑选出 4 个与溶藻弧菌毒力有关的基因序列,他们分别是:细菌 III 型分泌系统易位蛋白、III 型分泌途径分子伴侣 EscM、趋药性传感器^[11]、类丝氨酸蛋白酶。序列及比对结果见表 2。

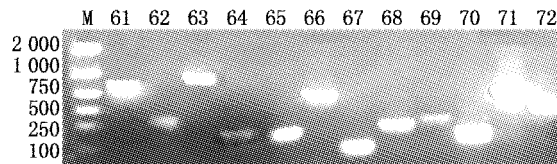


图 3 ag 组 PCR 产物连接转化的克隆快速 PCR 鉴定电泳图(61-72 克隆)
Fig. 3 Electrophoretogram of PCR product of a complementation negative colony in ag combination no. 61-72

表 2 毒力相关基因

Tab. 2 The gene of virulence gene

基因序号 gene number	BALST 结果 result of BLAST	E 值 value of E	同源物种 allied species	同源性(%) homology
1	translocation protein in type III secretion	5e-62	<i>Vibrio alginolyticus</i>	99
2	type III secretory pathway, component EscU	8e-87	<i>Vibrio alginolyticus</i> 12G01	99
3	putative chemotaxis transducer	2e-50	<i>Vibrio alginolyticus</i> 12G01	97
4	secreted trypsin-like serine protease	1e-61	<i>Vibrio vulnificus</i> CMCP6	72

的限制酶消化,将 cDNA 克隆到载体中去。然而由于细菌 mRNA 的 poly(A) 化没有特定的序列,加上 A 位点高度特异性,如果沿用真核生物 cDNA 文库构建方法,则会产生大量重复和冗余的序列,所获得的多个大小不同的克隆,可能都来自一种基因不同状态的 mRNA,这将大大增加文库筛选鉴定的工作量。1986 年 Karnik 及 1996 年 Kushner 等人采用传统的真核生物构建 cDNA 文库的方法构建了大肠杆菌的 cDNA 文库,然而却只克隆到极少数的片断且未见对该文库的后续鉴定研究^[12-13]。而 RD-PCR 技术则可使细菌 cDNA 文库的构建更具有目的性,筛选鉴定效率提高。逆转录的 cDNA 经限制性内切酶酶解后连接上互补的接头,这样使同一基因的不同状态 mRNA 逆转录所得 cDNA 以同一形式被扩增和克隆,有效的避免了 cDNA 文库信息的重复和冗余,大大缩短文库鉴定工作量。由于接头和酶切位点的 DNA 序列已知,因而可设计标准的 PCR 通用引物。在该通用引物的 3' 端分别延伸一个或几个碱基,通过引物间的两两组合,将 PCR 产

表 1 有效 EST 序列分类

Tab. 1 Database match categories of ESTs sequenced in *Vibrio alginolyticus*

EST 分类 classification of ESTs	EST 数量 no. of ESTs	百分比(%) ESTs
总数 total	53	100
在数据库中发现同源片段的总数 total of database matches	40	75.47
在数据库中无同源片段的总数 no. database match	13	24.53

3 讨论

真核生物经典的 cDNA 文库构建是以带 poly(A) 尾的 mRNA 为模板,在逆转录酶作用下合成 cDNA 第一链,再用适当的方法合成第二链,加入含有一个或多个限制酶位点的合成接头,经相应

物分成 10 个或 $4n \times (4n + 1) / 2$ 个亚组,从而使基因片段通过选择性引物被有效地分配于不同的亚组中,结合 AT 克隆和快速 PCR 鉴定,可以快速地对目的片段进行初步筛选,最终鉴定需经测序分析。由于该过程中应用了限制性内切酶 *Sau3A* I,使得到的限制性片段得以限制性分组扩增,因而该方法被定为限制性显示 PCR^[7]。

本研究结果表明,在进行逆转录过程中,采用了经典的逆转录方法,以 oligo(dT)₁₈ 为引物进行了反转录,从后续实验来看,我们成功的反转录得到了双链 cDNA,这说明了在逆转录步骤使用真核生物的经典方法是可行的。本研究 PAGE 结果表明,使用不同引物进行分组 PCR 后,我们可以看出其中条带最多的是 at 组,有 6 条清晰的条带;最少的为 aa, tc, gg 组,有 3 条清晰的条带,这与胡子有等^[14]所做的大肠杆菌结果有所差别,他们在经过银染后每分组引物扩增产物均有 15 条左右的片段,这样的差别可能是由两个原因造成,一是由于菌株的不同而产生不同的结果;第二,从理论上来说,聚丙烯酰胺电泳胶浓度越高,其分辨

率也相应的越高^[9],而本实验采用了浓度相对较低的 5% 聚丙烯酰胺电泳,结合后续克隆实验中克隆出的片段数目均多于 5% 聚丙烯酰胺电泳图中条带数目的现象,可以在一定称度上说明,5% 聚丙烯酰胺电泳的分辨率不够,是造成 RD-PCR 产物没能够完整的显现出来的原因。

本实验应用 RD-PCR 技术共克隆 85 个基因片段,经部分已测序的片段分析表明,所获得的基因片段质量较高,重复性低。很长一段时间以来,多数学者认为以带 poly(A) 尾的 mRNA 为模版逆转录构建 cDNA 文库是真核生物所特有的方式,然而,当 1962 年大肠杆菌的 poly(A) 聚合酶及 1975 年大肠杆菌的 poly(A) RNA 被纯化出来时^[15-16],引起了生物化学界的关注。在本实验中,我们发现,从已分析的 53 个基因片段来看,我们成功地利用 poly(A) 与 oligo(dT) 特异结合的特性,应用 RD-PCR 技术克隆了溶藻弧菌的基因片段,从而验证了细菌中确实也存在 poly(A) 尾。当然我们只克隆了近一百条基因片段,不足以证明 poly(A) 化在细菌中是一个普遍的现象,但至少提示 poly(A) 化在细菌中确实不是个别和偶然的现象。从我们的实验结果还可以看出, RD-PCR 技术在 cDNA 文库构建中引入了酶切和 PCR 技术,对欲克隆的基因片段进行了扩增,由于酶切后片段大小较均一,可以有效地避免 PCR 对短片的优先扩增,防止所构建的 cDNA 文库出现明显偏向,在这点上优于一般 PCR 介导的 cDNA 文库构建法。同时 RD-PCR 扩增后的产物不需纯化,可直接用于 AT 连接克隆,不像真核 cDNA 文库构建的接头法,在连接克隆前必须进行纯化,而纯化有可能导致基因片段丢失。

从测序结果来看,应用 RD-PCR 技术构建的溶藻弧菌 poly(A) 化 mRNA 限制性 cDNA 文库质量高,所筛选的基因片段重复性低,已测序的 53 个样品中,仅有 6 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。

通过对克隆测序片段进行 EST 序列分析,我们比对到有 4 个与溶藻弧菌毒力相关的基因序列。他们包括:细菌 III 型分泌系统易位蛋白(translocation protein in type III secretion)、III 型分泌途径分子伴侣 EscU(type III secretory pathway, component EscU)、趋药性传感器(putative

chemotaxis transducer)、类丝氨酸蛋白酶(secreted trypsin-like serine protease)。这 4 个基因序列与溶藻弧菌的致病机理有着紧密的联系,其中以细菌 III 型分泌系统尤为重要。致病细菌和宿主细胞相互作用的特点是将致病因子定位到细菌表面或分泌到胞外,在细菌中以特有的 III 型分泌系统把致病蛋白转运到宿主细胞中^[17-18],就目前研究现状来看,对于这个机制一些功能和它的分泌蛋白有了一定的了解,但是在未来仍有很多问题要解决。而且细菌 III 型分泌系统的研究主要集中在肠道致病菌耶尔森菌属和鼠伤寒沙门菌属^[19],然而,作为海水养殖业的主要致病菌之一的溶藻弧菌在这方面的研究几乎处于空白状态,对该系统的作用机制与蛋白质分泌特性的研究将是我们今后的研究重点。

参考文献:

- [1] 华鼎可. 我国鱼病学研究的现状与进展(一)[J]. 现代渔业信息,1995,10(3):9-15.
- [2] Sarkar N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes [J]. Annu Rev Biochem,1997,66:173-97.
- [3] Rauhut R, Klug G. mRNA degradation in bacteria [J]. FEMS Microbiol Rev,1999,23(3):353-70.
- [4] Donovan W P, Kushner S R. 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):120-124.
- [5] 胡子有,马文丽. 应用限制性显示 PCR 技术构建细菌 poly(A) 化 mRNA 的 cDNA 文库[J]. 生物技术通讯,2002,13(4):269-272.
- [6] 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):285-289.
- [7] 马文丽,郑文岭. 限制性显示(RD-PCR):一种新的差异显示技术[M]//孙志贤. 全军生物化学与分子生物学研究进展. 北京:军事医学科学出版社,1998:113-114.
- [8] 黄留玉. 限制性显示 PCR 技术[M]//黄留玉. PCR 最新技术原理、方法及应用. 北京:化学工业出版社,2005.
- [9] 彭秀铃,袁汉英,谢毅,等. 基因工程实验技术. 第二版[M]. 长沙:湖南科学技术出版社,1997:201.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed [M]. New York:

- Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989:63.
- [11] 刘俊, 郑浩然, 钮俊清. 基于多 agent 系统的细菌趋药性仿真[J]. 计算机仿真, 2004, 23(4): 138 - 140.
- [12] Hardy S J, Kurland C G. The polycleotide product of poly(A) polymerase from *Escherichia coli* [J]. *Biochemistry*, 1966, 5(11): 3668.
- [13] Nakazato H, Vankatesan S, Edmonds M. Polyadenylic acid sequences in *E. coli* messenger RNA [J]. *Nature*, 1975, 256(5513): 144.
- [14] 胡子有, 马文丽. 大肠杆菌 poly(A) 化 mRNA cDNA 文库的构建及鉴定[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(11): 1005 - 1007.
- [15] Cao G J, Sarkar N. Poly(A) RNA in *Escherichia coli*; nucleotide sequence at the junction of the lpp transcript and the polyadenylate moiety [J]. *Proc Natl Sci USA*, 1992; 89(16): 7546.
- [16] Cao G J, Sarkar N. Identification of the gene for an *Escherichia coli* poly(A) polymerase [J]. *Proc Natl Sci USA*, 1992; 89(21): 10380.
- [17] 周永运, 徐建国. 肠道病原菌的 III 型分泌系统和侵袭 [J]. 中国人兽共患病杂志, 2003, 19(4): 102 - 105.
- [18] 沈正达. 细菌毒力岛的研究进展 [J]. 中国兽医学报, 2003, 23(4): 412 - 414.
- [19] 王效义. 沙门氏菌毒力岛及其 III 型分泌系统 [J]. 生物技术通讯, 2004, 15(2): 160 - 162.