

# 一种从感染的培养细胞中分离细菌 RNA 的方法

刘 红 董 杰 刘墨青 金 奇\*

(病毒基因工程国家重点实验室 北京 100176)

**摘 要** 病原菌全基因组表达谱研究是阐明其致病机理的必要的,已经成为当前生命科学领域的热点和重点;然而由于难于从感染的组织中快速固定并分离细菌 RNA,从而极大的制约了该研究的进展。介绍一种从感染的细胞中分离细菌 RNA 的方法——冷酸酚法,其主要特点是(1)使用可以破碎真核细胞但不影响细菌细胞完整性的 SDS 浓度,实现了从感染的细胞中快速分离完整的细菌,减少了宿主细胞 RNA 的污染;(2)在将细菌从细胞中分离的同时即利用苯酚-乙醇混合液将其总 RNA 快速固定,既减少了 RNA 的降解,又最大限度地保持了细菌在哺乳细胞内原有的表达模式;(3)可以从  $10^8$  个菌体中提取到至少  $30\mu\text{g}$  的总 RNA,足够用于反转录等其他研究。该方法将为利用 DNA Microarray 技术进行的病原菌表达谱研究提供有益的借鉴。

**关键词** 志贺氏菌 胞内细菌 RNA 提取 冷酸酚法

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0672-04

越来越多细菌全基因组序列的破译以及 DNA Microarray 等新技术的产生和应用,使得表达谱研究已经成为当前生命科学领域的热点和前沿。模式生物表达谱的研究可以有助于更好的理解与研究生命活动的各种现象与机理,而病原菌全基因组表达谱研究则是我们阐明病原菌致病机理的必要的,其最终目标是鉴定在宿主内差异调控的细菌基因。

理论上讲,病原菌全基因组表达谱研究应该比较细菌在感染组织中与标准的体外生长条件下的基因表达差异,然而由于在感染的组织中往往只存在很少量的病原菌,很难从中固定并分离细菌;细菌 mRNA 在细胞内的半衰期很短,并且不像真核生物的那样有一个多聚 A 尾巴,要从感染的组织或培养细胞中分离和纯化细菌 mRNA 更为困难。正是由于缺少一种普遍通用的方法从感染的组织中快速固定并分离细菌 RNA,从而极大的制约了基于 Microarray 技术的病原菌表达谱的研究,使得一直以来关于病原菌与宿主相互关系表达谱的研究主要集中在宿主的应答调控方面<sup>[1~3]</sup>。

志贺氏菌(*Shigella* spp.)是引发人类传染病中细菌性痢疾(菌痢)的专性胞内病原菌。尽管对于福氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)在温度和其他个别环境信号应答中的基因诱导有很多报道<sup>[4,5]</sup>,但对于细

菌在宿主细胞内所遭遇到的复杂信号以及在这些信号应答中所诱导的基因却知之甚少,也就是缺少一个志贺氏菌在感染过程中的全局性基因表达谱。在完成福氏志贺氏菌全基因组序列测定的基础上<sup>[7,8]</sup>,我们制备了包含其所有开放读框(ORFs)的 Microarray<sup>[9]</sup>,为我们研究志贺氏菌在感染过程中的全局性基因表达谱提供了契机,但如何从感染的细胞中分离到高质量的细菌 RNA 则成为上述研究中至为关键的步骤。

在借鉴前人经验的基础上<sup>[5,6]</sup>,我们通过反复实验,建立和发展了一种从感染的细胞中分离细菌 RNA 的方法——冷酸酚法。该方法的使用为我们提供了大量高质量的胞内细菌总 RNA,从而使我们成功地完成了上述表达谱的研究(另文发表)。本文主要对该方法做一详细介绍。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器和试剂

**1.1.1 仪器** 2100 芯片生物分析系统(Agilent),CO<sub>2</sub> 恒温细胞培养箱(SANYO),高速低温离心机(Eppendorf)等。

**1.1.2 试剂** RNA 6000 Pico LabChip kit 购自 Agilent 公司;SV Total RNA purification Kit 购自 Promega 公

基金项目 国家重点基础研究发展规划项目(G1999054103),国家“863 计划”(2001AA223011),国家科技合作重点项目(2001AA223116)

\* 通讯作者。Tel 86-10-67877732;Fax 86-10-67877736;E-mail:zdsys@sina.com

作者简介 刘 红(1973-),女,山东鱼台人,博士,主要从事病原微生物基因组学研究,现在山东大学生命学院做博士后工作。E-mail: hongl-2002@163.com 董杰为并列第一作者,对本工作有同等贡献。

收稿日期 2003-12-26,修回日期 2004-05-13

司 细胞培养基 D-MEM 和 R/MINI 1640、胎牛血清 (FBS) L-glutamine、青霉素、链霉素、庆大霉素等购自 Gibco 公司 ; 刚果红、Phorbol myristate acetate (TPA) SDS、酚 (pH5.3) 等均购自 Sigma 公司。

1.2 菌株和生长条件

志贺氏菌福氏 2a 301 株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所提供 , 本实验室保存。从刚果红平板上挑取红色菌落 , 在不含抗生素的 LB 培养基中于 37℃ 振荡培养过夜 , 次日以 1:100 接种于 50mL 新鲜培养基中 , 待 OD<sub>600</sub> 为 0.45 时停止生长 , 于 37℃、5000g 的速度 , 离心收获菌体用于侵袭细胞试验。

1.3 细胞和培养

人单核巨噬细胞 U937 细胞系由英国帝国理工大学 St Mary 医学院于 军博士惠赠 , HeLa 细胞系由本实验室保存提供。

HeLa 与 U937 细胞系分别培养在 D-MEM 和 R/MINI 1640 培养基中 , 两种培养基中都含有 10% 的胎牛血清、2mmol/L L-glutamine 及 100μg/μL 的青、链霉素。所有细胞接种在 120mm 直径的培养皿中 , 于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的潮湿环境中培养至 90% 丰度。在细菌侵袭前 , U937 细胞培养物要先用 200ng/mL 的 TPA 诱导分化。

1.4 细菌侵袭、感染和感染细胞中细菌的回收

侵袭与感染均参照文献 [10~12] 进行 , 只是起始的细菌侵袭量为 100 细菌/细胞 , 且所有的操作均在 120mm 培养皿中进行 , 每一个时间点的侵袭均使用总数 2 OD<sub>600</sub> 的起始菌量。

以 10mL 1 × PBS 洗细胞后加入 6mL 预冷的细胞裂解液 (0.1% SDS , 1% 酚 , 19% 乙醇) , 在冰浴中振荡孵育 30~60min , 将粘稠的细胞裂解液转入离心管中 , 4℃ , 14000r/min 离心 10min , 弃上清后加入 500μL 清洗缓冲液 (1% 酚 , 19% 乙醇) , 重悬沉淀 ; 重复上述离心、重悬操作 , 再次于 4℃ , 14000r/min 离心 10min。沉淀直接进行或暂存于 -80℃ 以等待 RNA 的分离。

1.5 细菌总 RNA 的提取和检测

将上述沉淀重悬于 100μL 含 200μg/mL 溶菌酶的 TE 溶液中 , 振荡器混匀 , 室温放置 5min (或者离心收集对照生长的菌体) 。采用 SV Total RNA purification kit 进行 RNA 的分离与纯化 ; 所得 RNA 用 DNaseI 处理后 , 再经过苯酚/氯仿抽提进一步纯化。所获 RNA 样品浓度与纯度的检测利用 Agilent 公司的 2100 Bioanalyzer 生物分析仪以及 RNA 6000 Nano

LabChip 试剂盒 , 具体操作参见使用指南。

2 结果

2.1 感染细胞内细菌的回收

为了尽可能的减少真核细胞 RNA 的污染 , 我们首先确定了如何从感染的真核细胞中回收完整的细菌菌体。出于经济和操作方便的考虑 , 在前人常用的裂解细胞的去污剂中 , 我们选择了 SDS , 并分别尝试了从 0.1% 到 1% 的不同浓度下细胞的裂解以及其内细菌的完整性。结果证实 0.1% 的 SDS 足以完全裂解真核细胞而不会影响到其中所感染的细菌细胞的完整性 (图 1)。

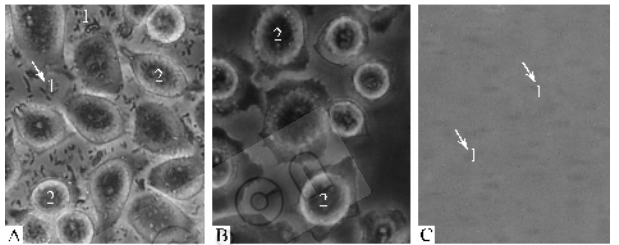


图 1 感染细胞内细菌的回收

Fig.1 Recovery of bacteria from infected eukaryotic cells  
A : Infected HeLa cells before washing with PBS ; B : Infected HeLa cells after washing with PBS ; C : *Shigella flexneri* released from the lysed HeLa cells treated with 0.1% SDS. 1. *Shigella flexneri* ; 2. HeLa cell.

2.2 细菌总 RNA 的分离

本方法所分离的细菌总 RNA 的色谱层析结果如图 2 所示 , 其中 23S RNA (2、3、4 泳道) 或 28S RNA (第 1 泳道) 的浓度明显高于相应的 16S 或 18S RNA , 且两条带都非常清晰、整齐 , 说明 RNA 的降解非常少。从感染的细胞中提取的细菌总 RNA (2、3 泳道) 与从体外生长的细菌分离的总 RNA (第 4 泳道) 相比 , 没有多余的 rRNA 条带 , 层析图谱极为一

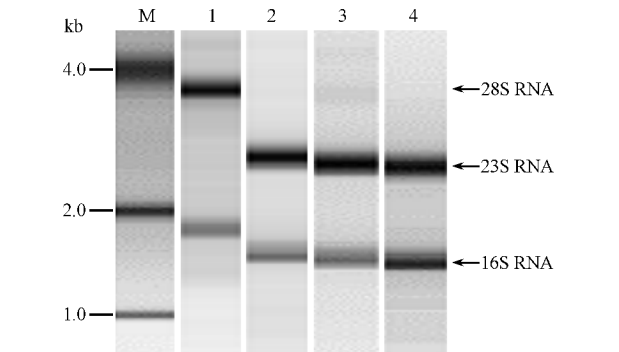


图 2 RNA 样品的色谱层析分析

Fig.2 Size chromatographic separation of RNA  
1. U937 cells alone ; 2. *S. flexneri* from infected U937 cells ; 3. *S. flexneri* from infected HeLa cells ; 4. *S. flexneri* grown in LB media in vitro ; M. RNA Ladder.

致,而与从没有感染的巨噬细胞系 U937 中提取的真核细胞总 RNA 相比, rRNA 的图谱存在明显的差异,说明所制备的细菌 RNA 样品中几乎没有真核 RNA 的污染。

### 3 讨论

在表达谱研究中,至关重要的是保持 RNA 样品的完整性从而保持生物体原有的表达模式。处理 RNA 样品时,任何影响 mRNA 快速稳定的操作都可能导致细菌表达模式的改变,从而使基因表达分析产生误差。我们知道,用传统方法从细菌中分离 RNA,有两个主要因素会影响到 mRNA 的稳定性,一是由于内源或外源性 RNA 酶污染而导致一些 mRNA 的降解甚至丢失,这一影响对于半衰期往往只有几 min 的细菌 mRNA 尤为严重;二是某些基因在操作过程中被诱导表达。由此获得的相关基因的表达增加或降低均为假阳性,从而难以体现细菌在实验条件下真实的表达模式。

Runyen-Janecky 等<sup>[5]</sup>在鉴定受真核细胞内环境诱导的福氏志贺氏菌染色体基因时,曾利用 0.5% 到 2.5% 的去氧胆酸破碎被福氏志贺氏菌感染的 HeLa 细胞,同样保证了其内细菌的完整性。但由于释放出的细菌是用于其后的差异荧光诱导,所以对于细菌的回收量要求不高,而表达谱分析则要求有足够多的 RNA;另外在具体应用中,去氧胆酸也远不及 SDS 更加方便和经济。Staudinger 等<sup>[6]</sup>发现 0.1% 的 SDS 可以破碎嗜中性粒细胞以释放出被其吞噬的大肠杆菌,但并不影响其以后的生存与繁殖能力。通过福氏志贺氏菌感染 HeLa 和 U937 细胞后细菌回收实验也证实了这一点;不仅如此,我们还发现随着 SDS 的浓度由 0.1% 增高到 1% 时,细菌的回收率只有轻微的降低趋势,提示 SDS 在低浓度 (<1%) 时可以裂解真核细胞,而不会对细菌产生破壁作用。

基于上述分析和实验结果,并针对表达谱研究的要求,对传统方法进行了综合与改进从而形成了本文介绍的冷酸酚法。该方法有两个主要特征即优点:一是使用了可以破碎真核细胞但不影响细菌细胞完整性的 SDS 浓度,实现了从感染的细胞中快速分离完整的细菌,减少了宿主细胞 RNA 的污染。二是细菌 RNA 的快速固定,在将细菌从细胞中分离的同时即利用细胞裂解液中的苯酚-乙醇将其总 RNA 快速固定,既减少了 RNA 的降解,又最大限度地保

持了细菌在哺乳细胞内原有的表达模式,保证了其后表达谱分析的高保真性。由于细菌分离与 RNA 固定一步完成,从而极大的简化了实验步骤和流程,节省了时间。利用 Microarray 技术进行表达谱研究所面临的另一个挑战是难以获得足够量的 RNA 样品,我们介绍的这一方法可以从  $10^8$  个菌体中提取到至少  $30\mu\text{g}$  的总 RNA,足够用于其后的反转录等其他研究。在我们进行的志贺氏菌表达谱的研究中,从每一种细胞系、每一个时间点所分离到的胞内细菌 RNA 经反转录标记后,都足以进行 4 次芯片杂交,数据分析结果也充分证实了这些 RNA 样品的高纯度与高完整性。

### 参 考 文 献

- [1] Cohen P, Bouaboula M, Bellis M, et al. Monitoring cellular responses to *Listeria monocytogenes* with oligonucleotide arrays. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 11181–11190.
- [2] Ichikawa J K, Norris A, Bangera M G, et al. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* with epithelial cells: identification of differentially regulated genes by expression microarray analysis of human cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**: 9659–9664.
- [3] Rosenberger C M, Scott M G, Gold M R, et al. *Salmonella typhimurium* infection and lipopolysaccharide stimulation induce similar changes in macrophage gene expression. *J Immunol*, 2000, **164**: 5894–5904.
- [4] Way S S, Sallustio S, Magliozzo R S, et al. Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome bd expression on *Shigella flexneri* virulence. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 1229–1237.
- [5] Runyen-Janecky L J, Payne S M. Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. *Infect Immun*, 2002, **70**: 4379–4388.
- [6] Staudinger B J, Oberdoerster M A, Lewis P J, et al. mRNA expression profiles for *Escherichia coli* ingested by normal and phagocyte oxidase-deficient human neutrophils. *J Clin Invest*, 2002, **110** (8): 1151–1163.
- [7] Jin Q, Yuan Z H, Xu J G, et al. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: Insight into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucl Acid Res*, 2002, **30** (20): 4432–4441.
- [8] 刘红,杨帆,张笑冰,等.志贺氏菌全基因组序列及基因组岛的分析.中国工程科学,2002, **4** (10): 40–47.
- [9] 刘红,彭俊平,杨剑,等.志贺氏菌属各亚群菌株基因组共有“骨架”组成的分析.科学通报,2003, **48** (23): 2451–2456.
- [10] Jun Y, Emmanuelle E O, Stephens A, et al. Inactivation of DsbA alters the behaviour of *Shigella flexneri* towards murine and human-derived macrophage-like cells. *FEMS Microbiology Letters*, 2001, **204**: 81–88.

- [ 11 ] Hale T L , Formal S B . Protein synthesis in HeLa or Henle 407 cells infected with *Shigella dysenteriae* 1 , *Shigella flexneri* 2a , or *Salmonella typhimurium* W118 . *Infect Immun* , 1981 , **32** : 137 - 144 .
- [ 12 ] Hong M , Gleason Y , Wyckoff E E , *et al* . Identification of two *Shigella flexneri* chromosomal loci involved in intercellular spreading . *Infect Immun* , 1998 , **66** : 4700 - 4710 .

## A Method of RNA Isolation of Bacterial from Infected Mammalian Cells

LIU Hong<sup>1</sup> DONG Jie<sup>1</sup> LIU Mo-Qing JIN Qi<sup>\*</sup>

( State Key Laboratory for Molecular Virology and Genetic Engineering , Beijing 100052 , China )

**Abstract** : The cold-acidic phenol protocol—a new method that can isolate enough amounts of bacteria RNA from infected cells has been introduced in detail . At each time point , infected cells were lysed to recover the intracellular bacteria with 0.1% SDS , 1% acidic phenol and 19% ethanol in water for 30 min on ice . Bacteria were pooled and RNA was prepared using Promega SV total RNA purification kit according to manufacture 's instruction . Bacterial RNAs were further purified by DNaseI treatment and phenol-chloroform extraction . Control RNAs from bacterial grown in L-broth and eukaryotic cells were isolated using the same RNA purification kit . RNA size chromatography was carried out with an Agilent 2100 Bioanalyser . This method is designed for quick lysis of host cells and preservation of bacterial RNA . The quality of RNA isolated from both cell-lines at all time points appeared to be excellent with minimal degradation and host RNA contamination . The quantity of the RNA from each time point of both cell-lines was enough for at least four times array hybridization .

**Key words** : *Shigella* spp . , Intracellular bacteria , RNA isolation , Cold-acidic Phenol method

Foundation item : Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development ( G1999054103 ) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development ( 2001AA223011 ) ; International Science and Technology Co-operation Project ( 2001AA223116 )

<sup>\*</sup> Corresponding author . Tel 86-10-67877732 Fax 86-10-67877736 E-mail zdsys@sina.com

<sup>1</sup>The first two authors made equal contributions to this work .

Received date : 12-26-2003

## 欢迎订阅《中国生物防治》

《中国生物防治》是全国性学术期刊、全国中文核心期刊,被国内外多家重要的数据库和科技文献库收录。本刊中国农科院生物防治研究所与中国植物保护学会共同主办。根据 CNKI 中国知识基础设施工程“中国学术期刊综合引证年度报告”的统计分析,2002 年的影响因子为 0.6804,欢迎广大读者踊跃投稿。

主要内容:主要刊登利用昆虫天敌、生物农药、昆虫信息素、生物技术工程等无公害新技术,防治农林牧医业病虫害的论文。

主要栏目:研究报告、专题综述、基础知识与实验技术、研究简报、国外生防等。

读者对象:农林牧、贮粮、卫生各级管理干部、科技人员、院校师生、基层技术骨干等。

本刊季中月 8 日出版,16 开 64 页。国内外公开发行,国内邮发代号 2-507,国外代号 Q812。每册定价 10 元,全年 40 元,全国各地邮局均有订售。本编辑部备有 1985~2003 年过期期刊(2~5 元),2000、2002 年增刊(10 元),1985~2003 年精装合订本 1~19 卷(1996 年已卖完),每卷定价 35 元(含邮费),欢迎来函订购。

编辑部地址 北京中关村南大街 12 号 邮编 100081

电话 010-68919774 E-mail zgswfz@hotmail.com jyangxl@cjac.org.cn