

## 地高辛标记的 Northern blot 检测鼠疫菌 sRNA

邓仲良<sup>1,2</sup>, 苏山春<sup>2</sup>, 孟祥荣<sup>2</sup>, 吴移谋<sup>1</sup>, 杨瑞馥<sup>2</sup>, 韩延平<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>湖南省南华大学公共卫生学院, 衡阳 421001

<sup>2</sup>军事医学科学院微生物与流行病研究所, 北京 100071

**摘要:** 【目的】随着高通量测序方法的应用,越来越多的 sRNA (small non-coding RNA, sRNA) 需验证。本研究建立用地高辛标记 Northern blot 检测鼠疫菌 sRNA 的技术,为细菌 sRNA 验证提供一种灵敏、特异的方法。【方法】在低铁条件下,提取鼠疫菌总 RNA, 10% dPAGE 分离后电转到尼龙膜上并用紫外线交联 RNA。膜经地高辛标记 RyhB1 或 RyhB2 寡核苷酸 RNA 探针过夜杂交后洗脱、封闭和免疫检测,最后曝光显影。【结果】地高辛标记的 Northern blot 曝光时间为 20 s–3 min, RyhB1 或 RyhB2 检测灵敏度分别为 0.005 μg 和 0.05 μg。RyhB1 或 RyhB2 探针特异性好,相互间无交叉反应。带正电或中性的尼龙膜都适用于杂交反应。RNA 探针在 42℃–65℃ 内杂交均可,提高温度可减少非特异性反应;而 DNA 探针杂交温度需摸索。【结论】本研究成功构建一种地高辛标记 Northern blot 检测鼠疫菌 sRNA 技术,具有特异性好、灵敏度高、探针易保存、曝光时间短等优点,为细菌 sRNA 验证和功能研究提供有利工具。

**关键词:** sRNA, RNA 寡核苷酸探针, 地高辛, Northern blot

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2013)03-0293-06

原核生物 sRNA (small non-coding RNA, sRNA) 在转录后水平调控靶 mRNA 稳定和翻译,是近年来的研究热点。sRNA 通常位于基因间区 (intergenic regions, IGRs), 长度为 50–500bp 左右,转录后一般不翻译蛋白质,有特殊的茎环结构,可通过碱基反向互补调控靶 mRNA 翻译和稳定性。可参与对细菌铁代谢、压力反应、碳代谢、糖利用、外膜平衡、密度感应和毒力等的调控<sup>[1–2]</sup>。

目前在大肠杆菌中发现有 80 多种 sRNA。大多数 sRNA 是通过高通量方法如生物芯片、RNA-seq 等发现,再用 Northern blot 或 RT-PCR 验证。尽管灵敏度不太高, Northern blot 仍是目前验证 sRNA 的标

准方法,可比较 mRNA 表达的丰度、验证转录本的大小、选择性剪切产物的存在,还可分析 RNA 是否降解、RNA 半衰期以及基因调控或敲除,此外可用放射性或非放射性标记 DNA、RNA 或寡核苷酸探针,且探针只要跟靶基因部分同源即可<sup>[3,5]</sup>。传统的 Northern blot 是采用同位素标记方法,由于探针保存时间短 (1–4 w)、显影时间长 (12–48 h)、有放射性污染,费用贵,且需要独立的空间、设备及特殊防护,应用受到局限<sup>[4–5]</sup>。因此发展一种非放射性标记的方法尤显重要。

2006 年, Ramkissoon 等发展一种用地高辛 (Digoxigenin, DIG) 标记寡核苷酸 RNA 探针来检测

基金项目: 国家自然科学基金 (31171248, 30930001)

\* 通信作者。Tel: +86-10-66948562; E-mail: yanpinghan@gmail.com

作者简介: 邓仲良 (1973–), 男, 湖南省冷水江人, 博士研究生, 从事细菌感染免疫及小 RNA 调控研究。E-mail: dzl021015@sina.com

收稿日期: 2012-11-14; 修回日期: 2012-12-18

真核生物的 miRNA 和 siRNA 的方法,且灵敏度与<sup>32</sup>P 标记的探针相当<sup>[6]</sup>。RyhB 是 2002 年在大肠埃希菌发现的一种跟铁代谢相关的 sRNA,在高铁时低表达,而在低铁时高表达。通过 BLAST 比对发现鼠疫菌 RyhB 有两个拷贝,分别为 RyhB1 和 RyhB2,且两拷贝同源性相当高(一致性序列为 69%),大小约 100nt<sup>[7]</sup>。因此本研究以鼠疫菌的 RyhB1 和 RyhB2 为研究对象,建立一种在寡核苷酸 3' 末端用地高辛标记的 RNA 探针,且特异性和灵敏度高的 Northern blot 检测技术,并探讨尼龙膜、温度和探针类型对实验结果的影响,为原核生物 sRNA 验证和调控等提供有利工具。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**鼠疫菌野生株 201 株属于田鼠型菌株,其主要表型为 F1+ (可以形成荚膜),LcrV+ (合成 V 抗原),Pst+ (产生鼠毒素)以及 Pgm+。基于  $\lambda$  Red 同源重组系统构建鼠疫菌 RyhB 单双敲除株,分别为  $\Delta$ ryhb1、 $\Delta$ ryhb2 和  $\Delta$ ryhb1: $\Delta$ ryhb2,由本室保存。

**1.1.2 TMH 培养基:**人工配制含盐、维生素、稳定及不稳定氨基酸等多种营养成分的限制性培养基,使铁终浓度为(10  $\mu$ mol/L),用 5.5 mol/L NaOH 调节 pH 至 7.2,过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 保存。

**1.1.3 主要试剂:**TRIzol Reagent、SYBR<sup>®</sup> Gold Nucleic Acid Gel Stain 购自美国 Invitrogen 公司; DEPC 购自 Sigma 公司; 3M 醋酸钠、Gel loading buffer II、ULTRAhyb 杂交液、BrightStar-Plus Membrane 等购自 Ambion 公司; Nylon Membrances, positively charged (Roche)、DIG Wash and Block Buffer Set、Anti digoxigenin-AP conjugate、CDP-Star、Hybridization Bags、DIG RNA Labeling Mix 等购自德国 Roche 公司; T7 RNA Polymerase、RiboLock Ribonuclease Inhibitor、DNaseI 等购自 Fermentas 公司; Hybond-NX 购自美国 Amersham Biosciences 公司。

### 1.2 Trizol 提取总 RNA

将野生株 WT (201 株)、 $\Delta$ ryhb1、 $\Delta$ ryhb2 和  $\Delta$ ryhb1: $\Delta$ ryhb2 接种到 5 mL 含相应抗性的 TMH 低铁培养基 (10  $\mu$ mol/L FeSO<sub>4</sub>), 26 $^{\circ}$ C 培养 48 h 达平台

期后过夜传代 1 次,并将过夜培养菌液 1:30 接种到新鲜配制的 TMH 培养基,26 $^{\circ}$ C 培养至 OD<sub>620</sub> = 1.0 - 1.2,将每株菌培养物等量分装至两个锥形瓶中,37 $^{\circ}$ C 预培养 1 h,一瓶加入终浓度为 50  $\mu$ mol/L 的 FeSO<sub>4</sub>,另 1 瓶加入终浓度为 100  $\mu$ mol/L 联吡啶 (DIP,铁的螯合剂);在高、低铁条件下 37 $^{\circ}$ C 诱导 30 min,4 $^{\circ}$ C 分别收集菌体,用 Trizol 提取总 RNA。用 DEPC 水溶解后,用紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,-70 $^{\circ}$ C 冷冻保存。取 1.0 - 2  $\mu$ g RNA 样品加等体积去离子甲酰胺重悬,用 1.2% 琼脂糖电泳检查 RNA 质量。上样时取 9 - 10  $\mu$ L 50% 甲酰胺重悬 RNA 样品,再加 1  $\mu$ L SYBR (DMSO 1:100 倍稀释)染料。低电压 80 v 电泳 30 - 40 min 后,紫外灯观察 RNA 质量。

### 1.3 RyhB 和 5S rRNA 探针的制备

RyhB 寡核苷酸探针合成:对鼠疫菌 RyhB1 和 RyhB2 序列进行比对,发现两者一致序列相似性达 69%,人工合成寡核苷酸 RNA 探针,在 3' 末端用地高辛 (DIG) 进行化学修饰。RyhB1 探针:5'-CAUAAUGUGAACACCUAAACUUUGAUGCGCUCA-3' (34 个); RyhB2 探针:5'-UCUGACCAAAGCAAAGACUGCCUGCCUUGU-3' (31 个)。而 RyhB1 或 RyhB2 DNA 寡核苷酸探针,除用 T 代替 U 外,其余碱基和地高辛的修饰与 RNA 寡核苷酸探针相同。

体外转录合成 5S rRNA 探针:先用 PCR 扩增 5S rRNA DNA 线性模板并纯化回收,20  $\mu$ L 体外转录体系含 DEPC 水 10.5  $\mu$ L、线性模板 DNA 1.5  $\mu$ L (0.2  $\mu$ g)、DIG RNA Labeling MIX (10 $\times$ ) 2  $\mu$ L、5X 转录缓冲液 4  $\mu$ L、T7 RNA 聚合酶 (20 u/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L。混匀并短暂离心,37 $^{\circ}$ C 2 h,加 2  $\mu$ L DNaseI (2 U/ $\mu$ L) 消化 15 min,再加 1  $\mu$ L 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0) 终止反应。加入 1/10 体积的 5 mol/L 乙酸铵和 3 倍体积冰预冷的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 至少 2 h,12000 $\times$ g 4 $^{\circ}$ C 离心 15 - 20 min,75% 乙醇漂洗。用 50  $\mu$ L DEPC 水溶解,用 10% dPAGE 胶检查探针质量,取 1 - 2  $\mu$ L 探针加 2 - 4  $\mu$ L RNA 上样缓冲液,95 $^{\circ}$ C 加热 3 min,电泳结束后用 SYBR (1 $\times$  TBE 1:10000 稀释) 荧光染料染色 30 - 40 min,观察结果。

### 1.4 10% dPAGE 电泳

电泳缓冲液预热到 55 $^{\circ}$ C,200 V 预电泳 30 min。取 5  $\mu$ g RNA 样品,各加等体积的上样缓冲液 II,95 $^{\circ}$ C 加热 3 min 后迅速置冰上。电泳 200 V (胶长

20 V/cm) 继续 30–40 min, 直至溴酚蓝到达胶底部停止电泳。

### 1.5 转膜

将膜与 6 层 Whatman 滤纸在  $1 \times$  TBE 电转缓冲液中浸湿。将胶置于 3 层滤纸上并放在阴极侧, 并将 BrightStar-Plus Membrane 膜覆盖至胶上, 再加 3 层滤纸。滚动玻璃滴管并挤走气泡。将电泳装置至 4℃ 冰箱, 使用半干式转移装置 50 mA 电转 45 min ( $8 \text{ cm} \times 4 \text{ cm}$ )。

### 1.6 交联

将膜上 RNA 面朝上放入到一张湿润的滤纸上, 置于紫外交联仪内,  $120 \text{ mJ/cm}^2$  能量交联。

### 1.7 杂交

将 ULTRAhyb 杂交液预热到 65℃。将膜置于热密封的杂交袋中, 加杂交液 ( $1 \text{ mL}/10 \text{ cm}^2$  膜)。对于 RNA 探针, 杂交温度为 42℃–65℃; 对于 DNA 探针, 杂交温度从 42℃ 开始, 杂交温度则需摸索。预杂交时间为 1–2 h。正式杂交探针的终浓度为 10–20 ng/mL。杂交液必须完全覆盖膜, 不能有气泡, 并温和震荡。在杂交炉上 42℃–65℃ 杂交过夜 (12–18 h)。

### 1.8 高、低严谨洗涤

用低严谨洗液室温洗 2 次, 每次 5 min, 以去除多余的杂交液和未结合的探针。再用高严谨洗液 65℃ 洗 2 次, 每次 15 min, 避免非特异性交叉反应。

### 1.9 洗脱、封闭和免疫检测

用 Washing buffer 洗膜 1–5 min 后, Blocking buffer 孵育 30 min。将膜置于 Anti digoxigenin-AP conjugat solution (1:20000) 中孵育 20 min。再用 Washing buffer 洗 2 次, 每次 15 min, 最后在 Dection buffer 中平衡 3 min。加 CDP-Star 均匀覆盖膜, 孵育 5 min。用单层保鲜膜包裹, 放在压片夹中。在暗室中取出柯达胶片压片 1–5 min, 取出胶片在显影液中显影 20 s–1 min, 蒸馏水中洗膜 5–8 次; 定影液中定影 1 min, 观察结果, 扫描图片。

## 2 结果和分析

### 2.1 RNA 和探针质量检查

用紫外分光光度法检测 WT、 $\Delta ryhb1$ 、 $\Delta ryhb2$  和  $\Delta ryhb1:\Delta ryhb2$  等 4 个菌提取的 RNA 的  $OD_{260}/OD_{280}$  的比值为 2.0 左右, 说明 RNA 纯度达到要求,

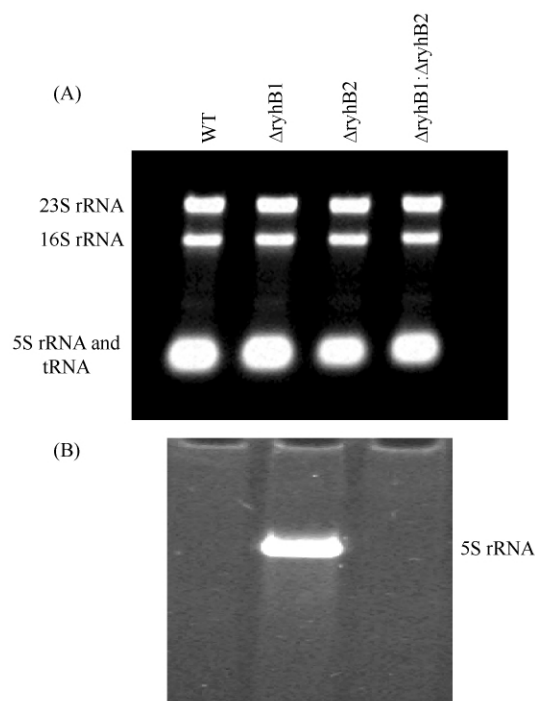


图 1 RNA 和探针质量检查

Fig. 1 Evaluation of the quality of RNA and probe. A: Assessing the quality of RNA sample by 1.2% agarose gel electrophoresis; B: Evaluation of the quality of 5S rRNA probe by 10% denaturing urea polyacrylamide gel.

但并不能真正反映 RNA 的质量。配制变性甲醛胶进行琼脂糖电泳并用 EB 观察, 是检查 RNA 质量的传统方法, 但配制含甲醛变性胶费时且有毒, 且 EB 有强致癌性。本研究构建了一种检测 RNA 质量的简单和安全的方法。在样品中加 50% 去离子甲酰胺以维护 RNA 稳定, 使用 SYBR 胶体金核染料代替 EB 观察结果, 观察到 23S rRNA, 16S rRNA, 5S rRNA, 条带明亮, 边缘清晰, 且 23S rRNA 条带的亮度是 16S rRNA 的 2 倍以上, 说明 RNA 质量良好, 无降解。用 10% dPAGE 检查 5S rRNA 探针质量, 只有单一条带 (图 1), 说明探针特异性好, 质量可靠。

### 2.2 Northern blot 特异性分析

在营养限制性培养基 TMH ( $10 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ ) 中, 加入铁螯合剂联吡啶 (DIP) 诱导 30 min 后, 使鼠疫菌处在低铁环境, 野生株 (WT) RyhB1 或 RyhB2 高表达, 而在高铁条件下 ( $50 \mu\text{mol/L FeSO}_4$ ), RyhB1 或 RyhB2 低表达。在低铁条件下, RyhB1 在 WT 和  $\Delta ryhb2$  高表达, 而在  $\Delta ryhb1$  和  $\Delta ryhb1:\Delta ryhb2$  中因 RyhB1 被敲除而不能表达; 类似的 RyhB2 在 WT 和  $\Delta ryhb1$  高表达, 而在  $\Delta ryhb2$  和

$\Delta ryhb1: \Delta ryhb2$  中不能表达 (图 2)。以上结果表明: 尽管 RyhB1 和 RyhB2 同源性高, 但 RyhB1 和 RyhB2 探针特异性好, 相互间无交叉反应。5S rRNA 作为一种细菌 sRNA 的构成性表达形式, 可用作内参基因来定量, 也可判断 RNA 质量是否完整。

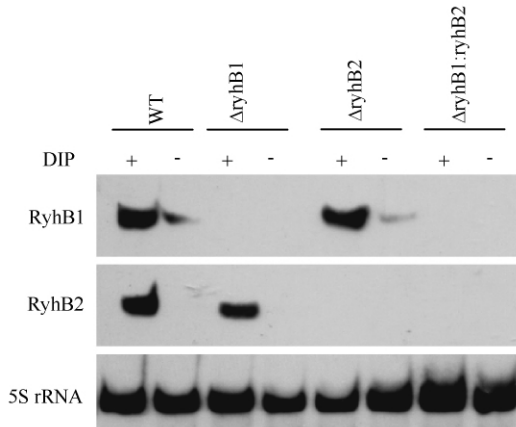


图 2 Northern blot 检测鼠疫菌 RyhB 探针特异性

Fig. 2 Specificity of *Yersinia pestis* RyhB probe detected by Northern blot. +: low iron; -: high iron.

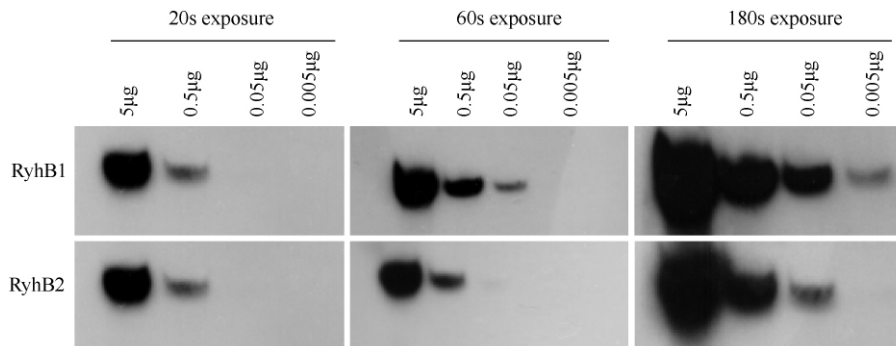


图 3 Northern blot 检测鼠疫菌 RyhB 的灵敏度

Fig. 3 Evaluation of sensitivity of *Yersinia pestis* RyhB by Northern blot.

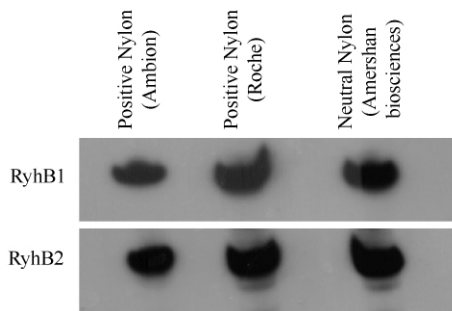


图 4 尼龙膜对 Northern blot 的影响

Fig. 4 Effect of three different nylon membranes on Northern blot.

## 2.3 Northern blot 灵敏度分析

鼠疫菌野生株经 DIP 诱导 30 min 后提取总 RNA, 分别取 5、0.5、0.05、0.005  $\mu\text{g}$  样品, Northern blot 检测 RyhB1 和 RyhB2 的灵敏度。从图 3 可看出: 0.5 - 5  $\mu\text{g}$  RNA 样品, 在曝光 20 - 180s 后 RyhB1 或 RyhB2 均能检测。RyhB1 在曝光 20s、60 s 和 120 s 的检测灵敏度分别为 0.5、0.05 和 0.005  $\mu\text{g}$ ; 而 RyhB2 的灵敏度分别为 0.5、0.5 和 0.05  $\mu\text{g}$ 。以上结果表明: 鼠疫菌 RyhB 在低铁条件下高表达, 灵敏度跟 RNA 量和曝光时间有关。

## 2.4 尼龙膜对 Northern blot 结果的影响

通过半干式电转将 RNA 转移到尼龙膜上, 选择 BrightStar-Plus (Ambion)、Nylon Membrances, positively charged (Roche) 等两种带正电荷尼龙膜和一种中性尼龙膜 Hybond-NX (Amersham Biosciences), Northern blot 检测正电荷和中性尼龙膜对 RyhB1 或 RyhB2 表达的影响。结果表明: 无论是正电荷或中性尼龙膜, RyhB1 或 RyhB2 均能高表达, 不过 Roche 和 Amersham Biosciences 公司膜的 RyhB 杂交信号较 Ambion 的尼龙膜信号强 (图 4), 与 Kim 等报道的结果一致<sup>[5]</sup>。

## 2.5 温度和探针对 Northern blot 结果的影响

将 RNA 紫外交联到正电荷尼龙膜 (Roche), 选择 3' 端 DIG 标记寡核寡酸的 RNA 或 DNA 探针在 ULTRAhyb (Ambion) 杂交液中杂交, 探讨杂交温度和探针类型对 RyhB 表达的影响。从图 5 可知: 当使用寡核苷酸 RyhB1 RNA 探针时, 杂交温度在 42 $^{\circ}\text{C}$  - 65 $^{\circ}\text{C}$  均可, RyhB1 表达都很明显, 其中在 42 $^{\circ}\text{C}$  杂交信号最强, 但出现了一些非特异性反应, 而在 65 $^{\circ}\text{C}$  杂交信号相对减弱, 但特异性很强, 无非特异性反应。随着杂交温度的提高, RyhB1 杂交信号减弱, 而特异性增强; 当使用寡核苷酸 RyhB1 DNA

探针时, 杂交温度对 Northern blot 结果影响很大。在 42°C 或 65°C 时, 杂交信号很弱, 而最适杂交温度是 50°C。类似的, 当使用 RyhB2 RNA 寡核苷酸探针, 在 42°C - 65°C 内, 杂交温度对结果影响不大。随着杂交温度的升高, 非特异性反应随之减少。而用 DNA 寡核苷酸探针时, 杂交温度 50°C 时杂交信号最强。以上结果表明: RNA 探针杂交温度范围宽, 在 42°C - 65°C 内均可, 对实验结果影响不大, 但提高温度可减少非特异性反应; 而 DNA 探针杂交温度则需根据探针 T<sub>m</sub> 值进行探索, 范围较窄, 对结果影响大。

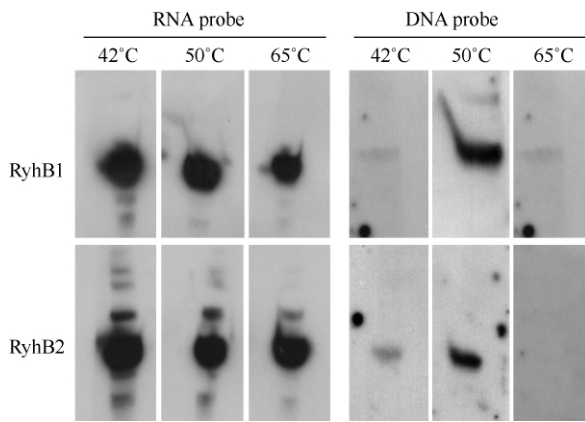


图 5 不同温度和探针 Northern blot 结果的影响  
Fig. 5 Effect of different temperature and probes on Northern blot.

### 3 讨论

Northern blot 能对 sRNA 表达进行定量和验证转录本大小, 具有多种标记方法, 且方法简单和特异, 是目前验证 sRNA 的一项标准方法。放射性标记方法需要单独设备和空间, 有放射性污染, 而地高辛标记寡核苷酸 RNA 探针具有以下优点: 特异性好 (RyhB1、RyhB2 和 5sRNA 无非特异性反应)、灵敏度高 (RyhB1 和 RyhB2 各自为 0.005 μg 和 0.05 μg)、曝光时间短 (20 s - 3 min)、探针有更长的保存期 (本实验室探针已保存 2 年)、多种标记方法 (寡核苷酸化学修饰和体外转录合成)、安全性好、成本低廉, 可在基层实验室推广使用。

影响 Northern blot 结果的因素很多, 包括 RNA 质量、探针类型和浓度、转膜、交联、杂交温度和杂交液、免疫显影等。但 RNA 和探针质量是决定实验是否成功的基础。本研究将 RNA 样品溶于 50% 甲酰

胺, 用 SYBR 荧光染料代替强致癌的 EB, 用普通琼脂糖电泳观察 RNA 质量, 方法简单, 效果良好, 可避免实验室甲醛和 EB 污染。

影响 Northern blot 的特异性有许多因素, 如探针质量、杂交温度和高低严谨洗涤等。其中最重要的是探针质量。实验前跑 10% dPAGE 胶检查探针质量是很有必要的。如果探针降解会导致实验失败; 若探针不纯, 则要检查体外转录时 DNA 线性模板是否特异, 否则会影响结果的特异性。提高杂交温度, 可减少探针与非靶 mRNA 碱基的错配, 本研究中的 RyhB1 和 RyhB2 寡核苷酸 RNA 探针, 杂交温度范围很宽, 在 42°C - 65°C 杂交特异性均可, 在 65°C 最佳。而对于 DNA 探针, 杂交温度则凭经验。此外增加高严谨洗涤的次数和延长长时间, 可去除与靶基因同源序列结合的探针或错配探针, 避免非特异性交叉反应。如果出现多条非特异条带, 而不能确定目的带, 较好的方法是构建 sRNA 敲除株, 比较敲除之前和之后条带的变化就能确定目的带。鼠疫苗 RyhB1 和 RyhB2 是高表达 sRNA, 检测灵敏度高, 对于低表达的 sRNA 想提高灵敏度, 可考虑以下因素: ①可提高 RNA 总量 (5 - 30 μg), ②提高探针浓度 (10 - 100 ng/mL), ③选择商业化的杂交液如 ULTRAhyb (Ambion) ④提高曝光时间, 可由 20 s 延长到 15 min。⑤使用 RNA 探针代替 DNA 探针, 可提高检测灵敏度。

非编码 RNA 研究是近十年来的研究热点, 较真核生物而言, 细菌 sRNA 的研究才刚开始, 高通量的测序可能会发现许多 sRNA, 但需要 Northern blot 的验证。本研究构建的地高辛标记的 Northern blot 平台, 成功验证了鼠疫苗 RyhB1 和 RyhB2 的存在, 在低铁时高表达, 在高铁时低表达, 通过基因敲除, 验证了探针特异性很好, 且检测灵敏度高, 为其他 sRNA 的验证提供了有利的依据。

### 参考文献

- [1] Waters LS, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell*, 2009, 136 (4) :615-628.
- [2] Brantl S. Regulatory mechanisms employed by cis-encoded antisense RNAs. *current opinion in microbiology*, 2007, 10 (2) :102-109.
- [3] Pall GS, Hamilton AJ. Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA. *Nature Protocols*, 2008, 3 (6) :1077-1084.

- [4] Pall GS, Codony SC, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35 (8) :e60.
- [5] Kim SW, Li Z, Moore PS, Monaghan AP, Chang Y, Nichols M, John B. A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38 (7) :e98.
- [6] Ramkissoon SH, Mainwaring LA, Sloand EM, Young NS, Kajigay S. Nonisotopic detection of microRNA using digoxigenin labeled RNA probes. *Molecular and Cellular Probes*, 2006, 20 (1) :1-4.
- [7] Deng ZL, Meng XR, Su SC, Liu ZZ, Ji XL, Zhang YQ, Zhao XN, Wang XY, Yang RF, Han YP. Two sRNA RyhB homologs from *Yersinia pestis* biovar microtus expressed in vivo have differential Hfq-dependent stability. *Research in Microbiology*, 2012, 163 (6-7) :413-418.

## Detection of *Yersinia pestis* sRNA by digoxigenin-labeled Northern blot

Zhongliang Deng<sup>1,2</sup>, Shanchun Su<sup>2</sup>, Xiangrong Meng<sup>2</sup>, Yimou Wu<sup>1</sup>, Ruifu Yang<sup>2</sup>, Yanping Han<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China

<sup>2</sup>State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China

**Abstract:** [Objective] With the application of high-throughput sequencing methods, more and more sRNAs are required to be verified. In this study, we developed the digoxigenin-labeled Northern blot method for detection of *Yersinia pestis* sRNA. [Methods] Total RNAs extracted from *Yersinia. pestis* grown under low-iron conditions were loaded onto 10% denaturing urea polyacrylamide gel (dPAGE), electrophoresed and transferred to nylon membranes. Northern blots were fixed to the membrane by UV cross-linking and subjected to hybridization with 3'-end digoxigenin-labeled oligonucleotides RNA probe for RyhB1 and RyhB2 overnight and followed by washing, blocking, immunological detection and finally exposed to film. [Results] Exposure time of digoxigenin-labelled Northern blot was 20s-3min. The detection sensitivity of RyhB1 and RyhB2 was 0.005 $\mu$ g and 0.05 $\mu$ g, respectively. RyhB1 and RyhB2 probe specificity was high and no cross reaction with each other was found. Positively charged or neutral nylon membranes are applicable to the hybridization reaction. Hybridization for RNA probe can proceed within 42 to 65 $^{\circ}$ C with reduced non-specific probe interactions by increasing the temperature while the hybridization temperature for DNA oligonucleotide probes seemed to be determined empirically. [Conclusion] A digoxigenin-labeled Northern blot has been developed for detection of *Yersinia pestis* sRNA, which was characterized by good specificity, high sensitivity, longer shelf life and short exposure times and provided an power tool for validation of bacterial sRNAs and function studies.

**Keywords:** sRNA, RNA oligonucleotide probe, DIG, Northern blot

(本文责编:张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31171248 30930001)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-66948562; E-mail: yanpinghan@gmail.com

Received: 14 November 2012/Revised: 18 December 2012