

肠杆菌 4.5S RNA 基因单链构象多态性的比较研究^{*}

黄仪秀 龚 莉 张 磊 李斯明 朱圣庚

(北京大学生物学系 北京 100871)

摘要 本文对大肠杆菌(*Escherichia coli*)不同菌株和肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)不同属其他三种菌株,即普通变形菌(*Proteus vulgaris*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*),分别进行 4.5S RNA 基因聚合酶链式反应(PCR),然后对扩增产物作依赖于序列的单链构象多态性(SSCP)分析。实验结果表明,上述细菌 4.5S RNA 基因的大小和正链构象均无可觉察的差异,仅产气肠杆菌的负链构象有明显不同。由此可见 4.5S RNA 基因在进化上相当保守,产气肠杆菌 4.5S RNA 基因的序列虽有改变,仍能维持其有义链的基本构象。

关键词 肠杆菌, 4.5S RNA 基因, 单链构象多态性

原核生物的细胞内广泛存在一些代谢稳定的小分子 RNA, 它们的含量均较低^[1]。其中研究较多的是大肠杆菌的 4.5S RNA, 它由 114 个碱基组成^[2]。虽然这类 RNA 只占细胞总 RNA 含量的 0.4%, 但却是细胞生长过程中不可缺少的成分^[3-5]。Poritz 等^[6]和 Struck 等^[7]分别注意到大肠杆菌 4.5S RNA 与真核生物信号识别颗粒(SRP)中 7SL RNA 具有共同的结构特征。这种结构特征也存在于其他细菌相应小分子 RNA 中, 因而相信它具有某种保守的功能。最近, Ribes 等^[8]证明, 大肠杆菌 4.5S RNA 与 48kD 蛋白质组成的核蛋白颗粒与 SRP 类似, 在分泌蛋白的跨膜运输中起某种作用。

单链构象多态性(single strand conformation polymorphism, 简称 SSCP)分析的依据是 DNA 单链呈复杂的折叠构象, 这种空间构象是靠分子内部碱基配对和堆积等弱相互作用力来维持的, 因而受其序列的影响^[9]。当 DNA 序列发生改变, 即使只有一个碱基的变化, 就有可能影响其单链构象, 从而改变其凝胶电泳的迁移率。PCR 与单链构象多态性技术相结合(PCR-SSCP), 是最近发展起来的一种非同位素的、快速、简便、灵敏度高的检测基因突变非常用的新技术。已有人用于分子遗传学研究和检测遗传性疾病及癌症基因的异常^[10-13]。

本实验利用 PCR-SSCP 技术, 对大肠杆菌(*Escherichia coli*)不同菌株和肠杆菌科不同属的三种菌株, 即普通变形菌(*Proteus vulgaris*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)的 4.5S RNA 基因进行比较研究。实验结果表明 4.5S RNA 基因的结构相当保守。

• 国家自然科学基金资助项目。

本文于 1992 年 9 月 18 日收到。

1 材料和方法

1.1 菌种

E. coli B、*E. coli* C600 和 *E. coli* K12 来自中国科学院微生物研究所。其它实验菌种均为北京大学生物学系所保藏菌种。

1.2 培养基和培养条件

E. coli K12 用 BPY 培养基培养。*E. coli* B、*E. coli* C600、*E. coli* JM101 和 DH5 α 均采用 LB 培养基培养。普通变形菌、粘质沙雷氏菌和产气肠杆菌则用牛肉膏蛋白胨培养基培养。上述细菌均在 37℃ 培养 18—24 小时。

1.3 细菌 DNA 的提取和制备

按 Kavenoff 等人的方法^[14]。

1.4 聚合酶链式反应(PCR)

PCR 的模板 DNA 提取自 *E. coli* JM101、*E. coli* B、*E. coli* C600、*E. coli* K12、DH5 α 、普通变形菌、粘质沙雷氏菌和产气肠杆菌。

5'端引物为 GGGGGCTCTGTTGGTTCTCC

3'端引物为 GGGTGGGGGCCCTGCCAGCT

1.4.1 对称 PCR 的扩增产物为双链 DNA。总反应体积 100 μ l。其中包括 10 μ l 10 \times PCR 缓冲液, 2 μ l 4 \times dNTP 混合液(各 10mol/L), 4 μ l 模板 DNA (约 2—3 μ g), 3'端和 5'端引物各 4 μ l(各 60pmol), 76 μ l 重蒸无离子水。95℃ 加热 10 分钟, 再加 0.5 μ l Taq DNA 聚合酶(5u/ μ l)及 100 μ l 无菌石蜡油。然后将反应管置于 PCR 仪中进行反应, 变性 93℃ 45 秒, 退火 50℃ 1 分钟, 延伸 72℃ 1 分钟, 共 35 个循环, 最后一次延伸 72℃ 10 分钟。反应结束后, 取 10 μ l 扩增产物进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用 EB 染色, 并在紫外灯检测仪下观察并照相。

1.4.2 不对称 PCR: 不对称 PCR 的扩增产物主要是单链 DNA。除 3'引物终浓度降低为 1pmol 外, 其他反应成分及反应步骤均与对称 PCR 相同。

1.5 单链构象多态性分析(SSCP)

在不同菌株 DNA 的对称或不对称 PCR 产物中加入甲酰胺(终浓度为 50%), 100℃ 水浴变性 5 分钟, 迅速置于冰盐浴(-10℃)中速冷。然后加入 0.1% 溴酚蓝染料, 进行聚丙烯酰胺不连续胶垂直板电泳, 浓缩胶为 5%, 分离胶为 12.5%, 电压 200V, 电泳槽置于冰箱中, 使电泳缓冲液温度不超过 10℃。电泳结束后, 用银染法进行染色。

1.6 银染色法

参照李港等人的方法^[15]。

1.7 DNA 分子量测定

用 Hae III 酶解的 pGEM7Zf(+)DNA 作为标准参照物, 以各片段的分子量对数与该片段的迁移率作图。由被检样品(PCR 扩增产物)的迁移率查出其近似分子量。

2 结果

2.1 肠杆菌 4.5S RNA 基因大小比较

分别取 10 μ l 大肠杆菌四种菌株(*E. coli* B、*E. coli* C600、*E. coli* K12、*E. coli* JM101 以及肠杆菌科不同属其他三种菌株(普通变形菌、粘质沙雷氏菌和产气肠杆菌)的 DNA PCR 产物,进行 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。根据各实验菌株 DNA PCR 产物迁移率与分子量标准参照物迁移率的比较,查出它们的分子量大小均约为 114 bp,与文献报道的大肠杆菌 4.5S RNA 基因大小相同^[2](图 1 及图 2)。

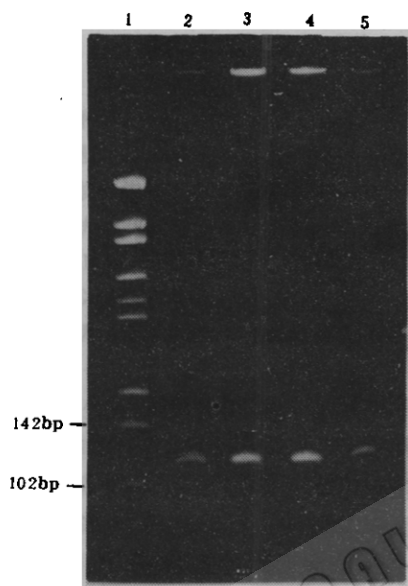


图 1 大肠杆菌不同菌株 4.5S RNA 基因 PCR 产物的 PAGE 图

Fig. 1 PAGE pattern of PCR products of 4.5S RNA gene from different strains of *E. coli*

1. Standards (pGEM7Zf(+)/Hae III); 2-5. PCR products of 4.5S RNA gene of *E. coli* B, *E. coli* C600, *E. coli* K12, *E. coli* JM101 respectively.

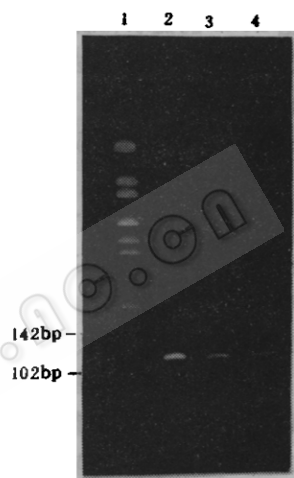


图 2 肠杆菌科不同属菌株 4.5S RNA 基因 PCA 产物的 PAGE 图

Fig. 2 PAGE pattern of PCR products of

4.5S RNA genes from three strains in different genera of *Enterobacteriaceae*

1. Standards (pGEM7Zf(+)/Hae III); 2-4. PCR products of 4.5S RNA genes from *P. vulgaris*, *S. marcescens*, and *A. aerogenes* respectively.

2.2 肠杆菌 4.5S RNA 基因的单链构象多态性分析

分别将大肠杆菌五种菌株(*E. coli* B、*E. coli* C600、*E. coli* K12、*E. coli* JM101、DH5 α) 以及肠杆菌科不同属其他三种菌株(普通变形菌、粘质沙雷氏菌和产气肠杆菌)的 4.5S RNA 基因 PCR 产物热变性,并进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染色并照相。

从图 3 和图 4 可以看到,上述细菌 4.5S RNA 基因单链电泳迁移率基本相同,唯有产气肠杆菌的负链电泳迁移率有明显差别。从而初步认为大肠杆菌、普通变形菌和粘质沙雷氏菌 4.5S RNA 基因的单链构象和 DNA 序列无可觉察的差异,产气肠杆菌该基因的序列虽有差异,但仍能维持有义链(正链)的基本构象不变。图 3 中,某些大肠杆菌菌株除

4.5S RNA 基因的双链及单链条带外, 还存在 1—2 条额外条带, 有待进一步鉴定。

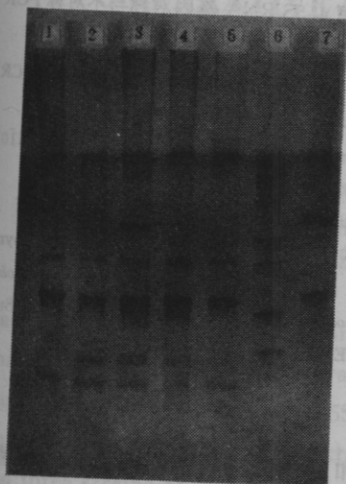


图3 大肠杆菌不同菌株 4.5S RNA 基因 PCR 产物的 SSCP 分析

Fig. 3 SSCP analysis of PCR products of 4.5S RNA genes from different strains of *E. coli*
1—5. Denatured PCR products of 4.5S RNA genes from *E. coli* JM101, *E. coli* K12, DH5 α , *E. coli* C600, *E. coli* B respectively; 6. Standards (pGEM7Zf(+)/Hae III); 7. Non denatured PCR products of *E. coli* 4.5S RNA gene.

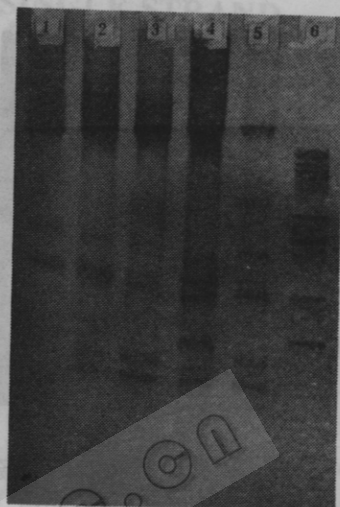


图4 肠杆菌科不同属菌株 4.5S RNA 基因 PCR 产物的 SSCP 分析

Fig. 4 SSCP analysis of PCR products of 4.5S RNA genes from three strains in different genera of *Enterobacteriaceae*
1. PCR products of 4.5S RNA gene of *P. vulgaris*; 2—5. Denatured PCR products of 4.5S RNA genes from *P. vulgaris*, *S. marcescens*, *A. aerogenes* and *E. coli* JM101 respectively; 6. Standards (pGEM7Zf(+)/Hae III).

2.3 大肠杆菌 4.5S RNA 基因正链与负链的确定

将大肠杆菌 4.5S RNA 基因对称 PCR 产物进行热变性后, 原来的双链 DNA 即解链成为两条单链, 但却无法确定哪一条为正链或负链。用不对称 PCR 产物则可确定其正负链。我们采用 5'端引物与 3'端引物的用量比例为 60 : 1(pmol)。因而不对称 PCR 产物中主要为正链(图 5)。

3 讨论

原核生物和真核生物的蛋白质跨膜转移过程有许多共同点, 两者都需要有某种复杂的机制来介导这一过程。真核生物的信号识别颗粒(SRP)先与核蛋白体上新合成的信号序列相结合, 然后再与内质网膜上的 SRP 受体结合, 并在膜上其他有关蛋白质协助下, 促使分泌蛋白跨膜转移。信号识别颗粒由 7SL RNA (约含 300 个碱基)和六种不同的蛋白质组成。大肠杆菌不含 SRP, 但其 4.5S RNA 与 48kD 蛋白质复合物在结构和功能上都与 SRP 有些相似^[8]。为了进一步了解这一机制的保守特点, 我们用 PCR-SSCP 技术对肠杆

菌 4.5S RNA 基因进行比较研究。

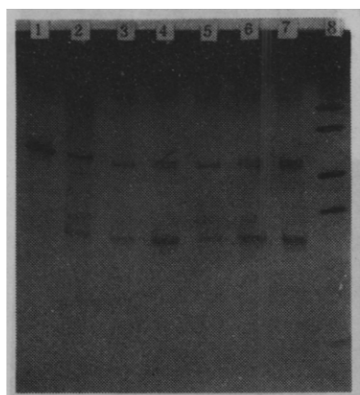


图 5 大肠杆菌 4.5S RNA 基因对称与不对称 PCR 产物 SSCP 分析

Fig. 5 SSCP analysis of symmetric or asymmetric PCR products of *E. coli* 4.5S RNA gene.

1. Non-denatured PCR products of *E. coli* JM101 4.5S RNA gene;
2. Denatured symmetric PCR products of *E. coli* JM101 4.5S RNA gene; 3-7 Denatured asymmetric PCR products from *E. coli* K12, DH 5 α , *E. coli* C600, *E. coli* B, *E. coli* JM101 respectively; 8. Standards (pGEM7Zf(+)/Hae III).

实验结果表明,所测定的大肠杆菌五种菌株和肠杆菌科其他不同属的三种菌株,其 4.5S RNA 基因的大小基本相同。除产气肠杆菌外,其余菌株 4.5S RNA 基因的单链构象也大致相同,推测它们的序列无显著差别。产气肠杆菌 4.5S RNA 基因的负链构象与其余菌株的负链构象不同,但正链构象仍相一致。表明产气肠杆菌 4.5S RNA 基因的序列有明显差别,但并不影响其正链的基本构象。由此可见,4.5S RNA 的二级结构在进化中是相当保守的。

致谢 本文承钱存柔教授提出宝贵意见,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] Inouye M, Delias N. *Cell*, 1988, **53**:5-7.
- [2] Hsu L. M et al. *J Mol Biol*, 1984, **178**:509-531.
- [3] Brown S, Fourmier M J. *J Mol Biol*, 1984, **178**:533-550.
- [4] Bourgaize D B, Fourmier M J. *Nature*, 1987, **325**:281-284.
- [5] Brown S. *Cell*, 1987, **49**:825-833.
- [6] Poritz M A et al. *Cell*, 1988, **55**:4-6.
- [7] Struck J C R et al. *Nucl Acids Res*, 1988, **16**:7740.
- [8] Ribos V et al. *Cell*, 1990, **63**:591-600.
- [9] Orita M et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**:2766-2770.
- [10] Ainsworth P J et al. *Nucl Acids Res*, 1991, **19**:405.
- [11] Dockhorn-Dworniczak B et al. *Nucl Acids Res*, 1991, **19**:2580.
- [12] Mohabeer A J et al. *Nucl Acids Res*, 1991, **19**:3154.
- [13] Kovar H et al. *Nucl Acids Res*, 1991, **19**:3507-3510.
- [14] Kavenoff R et al. *Chromosoma* (Berlin), 1973, **41**:1-27.
- [15] 李 港,等. 中华医学检验杂志, 1989, **12**: (5):277-278.

COMPARATIVE STUDY OF SINGLE STRAND CONFORMATION POLYMORPHISM OF 4. 5S RNA GENE IN ENTEROBACTERIA

Huang Yixiu Gong Li Zhang Lei

Li Siming Zhu Shenggeng

(Department of Biology, Peking University, Beijing 100871)

Abstract A recently developed technique, non-isotopic single strand conformation polymorphism analysis (PCR-SSCP), was applied to study the conserved feature of 4. 5S RNA gene in enterobacteria. The 4. 5S RNA gene was amplified by the polymerase chain reaction, using the template DNA extracted respectively from five strains of *Escherichia coli* and three strains of different genera in *Enterobacteriaceae*, i. e. *Proteus vulgaris*, *Serratia marcescens* and *Enterobacter aerogenes*. The PCR products were then carried out SSCP analysis. The experimental results showed that there seemed to be no detectable differences in the size and single strand conformation of 4. 5S RNA genes from above strains, except the negative strand conformation of *Enterobacter aerogenes*. Thus it can be seen that the secondary structures of 4. 5S RNA gene in enterobacteria are quite conservative.

Key words Enterobacteria, 4. 5S RNA gene, Single strand conformation polymorphism