DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.20.036
第25卷第20期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 20
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003 

文章编号:1000-5404(2003)20-1857-02

技术方法

# 核糖核酸酶保护法MD-2探针的制备

# Preparation of MD-2 probe for RNase protection assay

陈永华[1],李昌麟[2],王 韵[1],蒋建新[1],朱佩芳[1],张宗梁[2] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042;[2]中国科学院生化与细胞生物学研究所,上海 200031)

提 要:目的 构建用于核糖核酸酶保护法的MD-2转录质粒并制备反义RNA探针。方法 PCR扩增目的片段,并定向亚克隆至pSP72质粒T7启动子下游的多克隆位点,以T7 RNA聚合酶转录合成反义RNA探针。结果 亚克隆插入的片段经测序、酶切鉴定,序列及方向完全正确,成功制备了用于的反义RNA探针。结论 成功地制备了用于核糖核酸酶保护法的MD-2转录模板和探针,为深入研究内毒素信号受体相关机制以及MD-2的基因表达创造了必要的条件。

MD-2与CD14、TLR4(Toll like receptor 4)共同形成内毒素的膜受体复合物,在内毒素跨膜信号转导中具有重要作用[1],研究其基因表达是深入探讨其功能的基础。核糖核酸酶保护实验(RNase protection assay,RPA)是检测基因表达的方法之一,与Northern blotting等其它检测RNA水平的方法相比,RPA在专一性、灵敏度和定量准确度等方面都具有明显的优势。而目前国内外尚未有用于RPA的MD-2模板构建的报道,为此我们率先构建了用于RPA的MD-2模板,为研究其基因表达创造必要的条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

①质粒pEFBOS-MD-2由日本Kensuke教授惠赠,pSP72购自Promega公司。②引物合成 上游引物5′-CAGAAGCTTGCATTTG-TAAAGCTTTGGAGA-3′,下游引物5′-AGAATTCTCAGTC TCTCCCT-TCAGAG-3′,上、下游引物的5′端分别加载有*Hind*Ⅲ及*Eco*RⅠ酶切位点。③试剂。RPA探针制备转录试剂盒为PharMingen公司产品。

### 1.2 pSP72-MD-2质粒的重组

以pEFBOS-MD-2质粒为模板,PCR扩增MD-2目的片段,*Eco*RⅠ和*Hind*Ⅲ双酶切纯化的PCR产物及pSP72质粒。回收两种酶切片段,以T4-DNA连接酶连接,连接产物转化到JM109感受态细胞中。提取pSP72-MD-2重组质粒。

### 1.3 酶切与PCR、测序鉴定

重组质粒双酶切产物与PCR产物同时上样电泳进行鉴定。将重组质粒送上海基康生物工程公司,以T7为引物测定插入片段的序列和方向。

### 1.4 MD-2反义RNA探针的合成

*Hind*Ⅲ单酶切pSP72-MD-2,形成用于RPA的MD-2模板,酚/氯仿纯化后,以DEPC处理水稀释至100 ng/μl的浓度。依据PharMingen公司T7 RNA聚合酶体外转录试剂盒说明书,以构建的MD-2模板合成MD-2反义探针。将20μl反应产物等分为两管,取一管加入无RNA酶的DNA酶2U消化DNA模板。1.5%琼脂糖电泳分析反转录产物。

## 2 结果

### 2.1 pSP72-MD-2模板构建

PCR产物亚克隆入pSP72相应的多克隆位点,以*Hind*Ⅲ单酶切重组质粒,形成可用于RPA的MD-2模板,流程见图1。

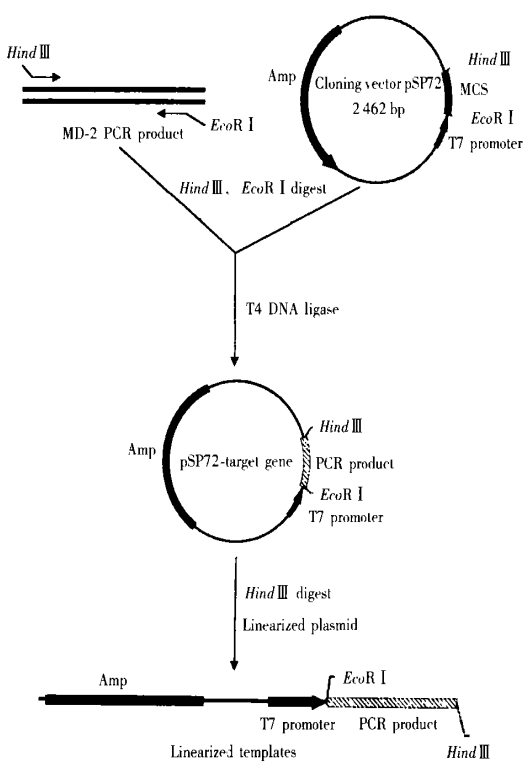



图1 模板构建流程图

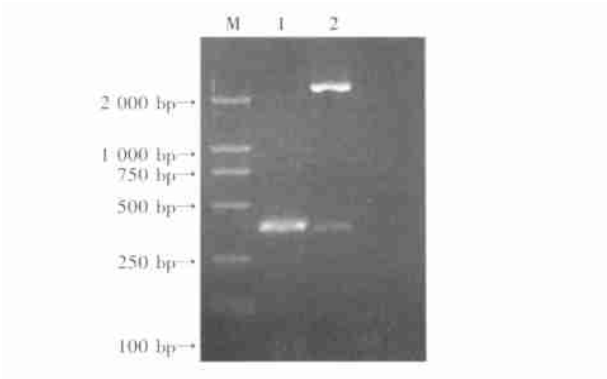
作者简介:陈永华(1969-),男,河南省西平县人,博士研究生,主治医师,主要从事创伤后内毒素血症发病机制方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68757444

收稿日期:2003-04-16;修回日期:2003-06-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

### 2.2 pSP72-MD2 重组质粒酶切、PCR 和测序鉴定

以该重组质粒为模板，用 MD-2 的两条引物进行PCR 扩增，产物片段长度为366 bp（图2，Lane 1）；经 *Hind* Ⅲ和 *Eco*RⅠ 双酶切 pSP72-MD2 重组质粒，出现大小分别约为 2 400 bp 和 366 bp 两个片段（图2，Lane 2）。因目的片段是定向克隆至 pSP72 的 T7 启动子下游，以 T7 为引物，测定插入片段的序列与 PCR 扩增的片段序列完全相同。综上结果表明 pSP72-MD2 重组质粒构建成功。

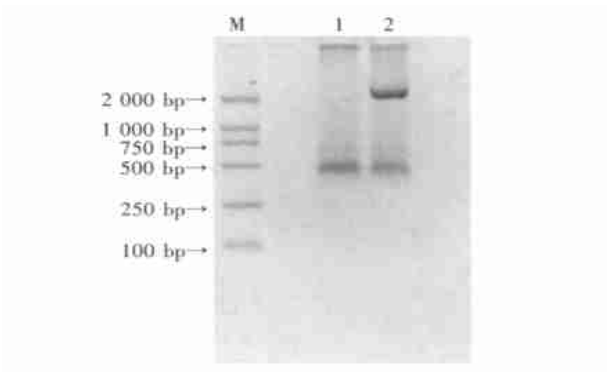



M：Marker；1：重组质粒酶切鉴定；2：重组质粒的 PCR 产物

图 2 酶切及 **PCR** 鉴定重组质粒

### 2.3 反义 RNA 探针的鉴定

合成的反义 RNA 探针中仍含有 DNA 模板，将其均分为两部分，其中的一个反应管内加入 DNA 酶以消化 DNA 模板，另一管内则不加。结果显示，加入 DNA 酶可消化质粒 DNA，而新合成的反义 RNA 探针则不被消化，显示为在 500 bp 与 250 bp 之间仍存有与目的片段大小相同的条带，说明反义 RNA 探针合成成功，结果见图3。




M：Marker；1：DNA 酶消化后反义 RNA 探针；2：未加入 DNA 酶显示为模板 DNA 及反义 RNA

图3 成反义 **RNA** 探针的鉴定

## 3 讨论

对于基因表达变化的检测方法常用的有半定量 RT-PCR、荧光定量 PCR、Northern 及 RPA 等。常规 RT-PCR 用以定量或半定量检测 mRNA 是最敏感的方法，但是由于在操作过程中受到的影响因素较多，其稳定性及重复性并不尽如人意；荧光定量 PCR 方法设计虽然巧妙，但需要昂贵的荧光定量 PCR 仪，并非所有的实验室都可应用；Northern 检测是一种较好的方法，但是其敏感性并不高，对一些低丰度表达基因的检测受到一定的限制。

而核糖核酸酶保护法有以下优点：①灵敏度高。首先其对于微量的 mRNA，如小至 0.1 pg 的 mRNA 即可进行定量检测，而 Northern 所能检测的 RNA 的量则是它的 100 至 1 000 倍。灵敏度仅稍低于 RT-PCR。②特异性强。RPA 所使用的探针为单链 RNA，与待检测的 mRNA 的杂交结合特异性强，可以避免探针之间的相互结合，杂交出来的条带清晰，背景极低[2]。③稳定性及重复性好。RNA-RNA 杂交体较之 DNA-DNA 杂交体有更高的温度动态稳定性，使得实验可以在更为严格的条件下完成。④信息含量丰富。RPA 最大的优点便是可以在同一次实验过程中，使用多探针模板组，同时对多个基因进行检测，这样可以在完全相同的实验条件下，检测到同一个样品标本内相关的不同基因表达变化的规律，并可对它们进行比较，我们所构建的还有与 MD-2 相关的 TLR4、CD14 及内参照基因 L32 模板[3]。

在构建用于 RPA 的模板过程中最重要的要将目的片段的方向正确地插入载体 T7 RNA 聚合酶位点的下游，以确保合成出来的 RNA 为反义链，在后续的杂交反应中才可与提取的总 RNA 中的 mRNA 反应，所以在设计插入子的引物时要将引入的酶切位点的方向与载体相配。

关键词：RNA 探针；核糖核酸酶保护法

中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

## 参考文献：

[1] Miyake K. Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2[J]. Int Immunopharmacol, 2003, 3(1): 119—128.

[2] Lim W S, Edwards J F, Boyd N K, *et al*. Simultaneous quantitation of equine cytokine mRNAs using a multi-probe ribonuclease protection assay [J]. Vet Immunol Immunopathol, 2003, 91(1): 45—51.

[3] Chen Y H, Jiang J X, Li C L, *et al*. Novel multi-probe RNase protection assay set for detection of endotoxin associated receptors gene expression[J]. Chin J Traumatol, 2003, 6(3): 174—178.

（编辑 栾 嘉）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net