

## 技术与方法

RNA-蛋白质印迹筛选 HBsAg 转录后  
调节因子表达克隆\*邓庆丽 黄志明<sup>1)</sup> 邵 静

黄志清

(中山大学孙逸仙纪念医院医学研究中心, 广州 510120)

(中山大学孙逸仙纪念医院消化内科, 广州 510120)

**摘要** RNA 结合蛋白是基因表达的重要调节因子. RNA-蛋白质印迹 (Northwestern blot) 是近年来国外建立的筛选这类因子的重要方法之一. 应用这一方法从肝细胞株 HepG2 cDNA 文库中成功筛选到乙型肝炎病毒表面抗原转录后调节片段相互作用蛋白表达克隆. 结果显示: 该蛋白与探针结合特异性强, 经三轮筛选后, 100% 克隆为阳性克隆; PCR 和 *EcoRI* 酶切初步鉴定, 编码该蛋白的 cDNA 长约 1 kb.

**关键词** RNA-蛋白质印迹, 乙型肝炎病毒表面抗原 (HbsAg), 转录后调节片段, PRE 相互作用蛋白

**学科分类号** Q78

RNA 结合蛋白是基因表达重要的调节因子<sup>[1]</sup>. 由于分离这些调节因子技术方面的问题使得研究其蛋白质结构和功能变得复杂化. 目前为止, 有两种方法用于分离这些调节因子. 一是根据紫外交联试验 (UV cross-linking) 的结果, 分离提纯相应的蛋白质, 进行氨基酸序列微量分析, 然后根据多肽序列合成相应的寡核苷酸探针, 最后进行文库筛选. 另一方法是直接筛选 cDNA 表达文库. 我们在研究乙型肝炎病毒表面抗原转录后调节片段 (posttranscriptional regulatory element, PRE) 的基础上, 参考国外资料, 用改良的 RNA-蛋白质印迹试验 (Northwestern blot) 从肝细胞株 HepG2 cDNA 文库中直接筛选乙型肝炎病毒表面抗原转录后调节因子表达克隆. 已成功地分离出一个表达特异性 PRE 相互作用蛋白 (PRE-interacting proteins, PIP) 的 cDNA 克隆. 这里我们详细介绍筛选方法和报告筛选的结果.

## 1 材料和方法

### 1.1 文库和菌株

肝细胞株 HepG2  $\lambda$ gt11 cDNA 文库 (美国 CLONTECH 公司) 由日本国立金泽大学癌研究所村上清史教授友好赠送, 宿主大肠杆菌 Y1090 由美国旧金山加州大学 Yen 博士友好赠送.

### 1.2 HBsAg PRE RNA 探针的合成及纯化

PRE RNA 探针转录质粒 (pT7PRE) 由

Huang<sup>[2]</sup>在美国工作期间构建. 简单地说, HBV PRE (核苷酸位点 1239~1805) 正向插入转录载体 pGEM7 上的 *Sma* I 位点, 在 T7 启动子控制下正向合成 PRE RNA. 合成 RNA 探针前, 用位于 PRE 插入位点下游的限制性内切酶 *Hind* III 将质粒 pT7PRE 线性化.

RNA 合成试剂盒 (Riboprobe kit) 购自 Promega 公司, 按说明书合成探针, 每次反应总体积为 50  $\mu$ L. [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP ( $1.11 \times 10^{14}$  Bq/mmol) 购自北京市亚辉生物医学工程公司. 注意反应液混匀时要避免剧烈振荡以及气泡产生, 防止 T7 RNA 聚合酶失活. 混匀后在 37℃ 水浴中孵育 2 h, 加 RQ1 DNase 1  $\mu$ L, 37℃ 水浴中再孵育 30 min 消化 DNA 模板.

合成的探针加入 50  $\mu$ L 1  $\times$  TE 使总体积达 100  $\mu$ L, 经酚、氯仿抽提后低速离心过葡聚糖 G50 柱, 滤过液用乙醇沉淀, -20℃ 保存. 杂交前离心. 沉淀物溶解于 MMK 缓冲液<sup>[3]</sup> (20 mmol/L MOPS [pH 7.4], 60 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>), 在加结合液之前, 在 45℃ 水浴中孵育 30 min.

### 1.3 RNA-蛋白质印迹

按常规方法将 cDNA 文库与宿主大肠杆菌

\* 国家自然科学基金资助项目 (39670653). <sup>1)</sup> 通讯联系人.

Tel: (020) 81882012-3415, E-mail: mrcbxb@gzsums.edu.cn

收稿日期: 1998-12-27, 修回日期: 1999-04-20

Y1090 混合, 37℃ 孵育 30 min 加软琼脂糖后铺在 42℃ 预热的 LB (含 Ampicillin 50 mg/L) 平板 (直径 15 cm) 上, 室温凝固后, 42℃ 孵育 3~4 h. 噬菌斑一旦出现即覆盖经 10 mmol/L IPTG 新鲜处理过的硝酸纤维素膜. 37℃ 过夜, 标记号后轻轻揭起滤膜并晾干.

结合前先将滤膜进行变性和复性处理. 6 mol/L 盐酸胍溶解于 1× 结合缓冲液 (20 mmol/L HEPES [pH 7.3], 40 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L DTT) 配成变性液. 按每张滤膜 10 ml 计算, 将滤膜浸泡在变性液中, 水平轻振荡 5 min, 除去一半液体, 补充等量的 1× 结合缓冲液, 再水平轻振荡 5 min, 重复上述步骤共 4 次. 最后一次除去所有液体, 加进新鲜的 1× 结合缓冲液, 水平轻振荡 5 min, 除去所有液体后, 加进预结合液 (1× 结合缓冲液+ 2.5% 低脂牛奶) 轻振荡 60 min, 除去预结合液, 用新鲜的 1× 结合缓冲液冲洗 2 次, 每次 5 min. 按每张膜 1 ml 计算配制结合液 (1× 结合缓冲液加鲑鱼精 DNA 10 mg/L, 酵母 tRNA 10 mg/L, <sup>32</sup>P 标记的 PRE RNA 探针每张膜计数率 ≥10<sup>6</sup>/min).

除去滤膜上多余的水 (防止干燥), 将滤膜装入杂交袋, 加进结合液并封口, 每个杂交袋放 8~10 张膜, 封口前注意除去气泡. 室温水平振荡 60 min. 按每张膜 20 ml 计算用 1× 结合缓冲液洗膜 4~5 次, 每次 10 min. 总洗涤时间不超过 1 h, 洗涤过程中应随时用同位素探测仪监测滤膜上的同位素强度, 如过强则应继续洗膜. 空气干燥滤膜, 加增感屏 X 光片于 -70℃ 自显影 24 h. 根据放射自显影的结果, 挑出可疑阳性的噬菌斑, 每个噬菌斑分别溶于 1 ml SM 缓冲液 (NaCl 5.8 g, MgSO<sub>4</sub> 2.0 g, 1 mol/L Tris-HCl [pH 7.5] 50 ml, 2.5% 明胶 4 ml, 加水至 1 L), 大约含噬菌体 1×10<sup>8</sup>~5×10<sup>8</sup> pfu/ml.

将可疑阳性的噬菌体按 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> 稀释, 每个克隆做三个稀释度, 按上述步骤进行第二轮筛选, 挑取阳性克隆, 再进行第三甚至第四轮筛选, 直至 100% 的克隆阳性.

#### 1.4 λDNA 的抽提纯化

参照 Asundi 等<sup>[4]</sup>介绍的方法. 粗 λDNA 再用蛋白酶 K 消化, 酚及氯仿抽提后乙醇沉淀, λDNA 溶于 1× TE 液.

#### 1.5 插入的 cDNA 长度鉴定

根据 λgt11 cDNA 文库的构建方法, 分别用限

制性内切酶 *EcoRI* 酶切和 PCR 法 (正向引物: 5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3'; 反向引物: 5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3') 初步鉴定插入的 cDNA 长度.

## 2 结果和讨论

### 2.1 如何制备高质量的 RNA 探针

Huang 等<sup>[2,5]</sup>在美国的前期工作显示, PRE 具有帮助 HBV S 基因的转录产物 (mRNA) 从细胞核向细胞浆转运的功能; 有两个分子质量约为 35 ku 和 45 ku 的宿主蛋白与 PRE 特异性结合. 目前, 与 PRE 特异性结合的这两个宿主蛋白性质未明. 为了筛选到准确的 HBsAg 转录后调节因子, 我们选择全长的 PRE (566 bp) 作为探针, 使探针更接近自然状态. 图 1 所示是试管内转录经纯化后的 RNA 探针. 条带致密度比较集中, 表明标记的 RNA 没有被降解, 而且显影 5 min 即可得到很强的条带, 表明标记的探针比活性很强, 探针的标记是成功的.

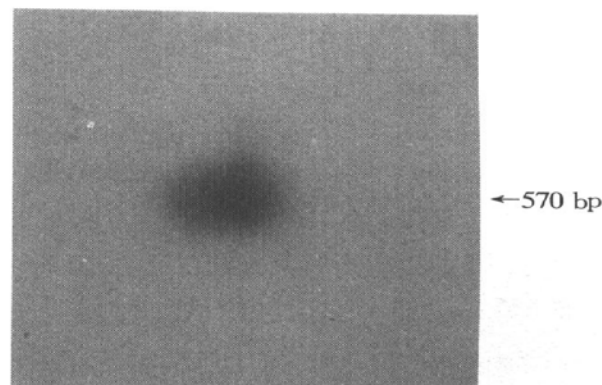


图 1 PRE RNA 探针示意图

用总量的 1% 点样在 1% 琼脂糖上电泳, 室温中 X 光片自显影 5 min. 探针长约 570 个碱基.

RNA 蛋白质印迹是 RNA 与蛋白质互相作用的试验. 由于在试管内转录的 RNA 会失去其原来的自然状态, 而在自然的条件下, RNA 与蛋白质结合的区域具有特殊的二级结构, 结合区内的某些位点以及所形成的茎 (stem-loop) 对所结合的蛋白质具有特异性. 考虑到这一关键因素, 我们参考 Banerjee 等<sup>[3]</sup>的方法, 对提纯后的 RNA 作了一些特殊处理, 即用 MMK 缓冲液溶解 RNA 探针, 在与蛋白质结合之前 45℃ 孵育 30 min. 这一处理的目的是让 RNA 探针在 MOPS 存在的条件下恢复自然状态, 形成其原有的二级结构以保证能正确地与相应的蛋白质特异性结合.

根据 Gatignol 等<sup>[6]</sup>的方法, 合成的 RNA 探针须经尿素胶提纯. 在本实验中我们曾尝试过变性胶分离提纯 RNA 探针, 结果发现用这一方法提纯的 RNA 探针量较少, 且步骤多较难操作. 之后, 我们改用过葡聚糖 G-50 柱的方法提纯, 结果显示这一方法提纯的 RNA 探针量充足, 适用于大规模的 cDNA 克隆筛选; 但在纯度上稍差于尿素变性胶, 在进行筛选时要严格控制 RNA-蛋白质结合的条件.

## 2.2 筛选条件的控制

RNA 蛋白质印迹是近年国外刚发展起来的方法, 还不十分成熟, 并非所有的 RNA 结合蛋白都可用这一方法分离到. 然而资料显示<sup>[7~10]</sup>, 应用 RNA 蛋白质印迹已成功筛选出几个 RNA 结合蛋白的 cDNA 克隆. 为使筛选获得成功, 必须根据实际情况作相应的改良. 在本次实验中我们进行了两次筛选, 每次筛选使用 15 cm 的 LB-Amp 平板 25 个, 约 25 万个克隆. 第一次筛选时, 我们参照 Gatignol 等<sup>[6]</sup>介绍的方法, 铺第一张膜后 6 h, 揭膜并铺上第二张膜, 37℃ 过夜. 结果发现, 第二张膜几乎看不到信号, 无法与第一张膜对照. 也许由于两张膜的信号都不够强, 我们无法找到阳性克隆. 第二次筛选时, 我们改为只铺一张膜过夜. 图 2 示三轮筛选的结果. 经第一轮筛选后, 我们挑选了 18 个可疑的阳性克隆, 其中第 7 号克隆的信号比较强 (图 2a 左, 箭头所示). 在进行第二轮筛选时, 仅其中的第 7 号克隆与 PRE RNA 探针特异性结合, 其余呈阴性 (图 2b). 对 7 号的阳性克隆进行第三轮筛选, 结果显示 100% 的克隆与 PRE 探针特异性结合 (图 2c), 而在第二轮呈阴性的第 3 号克隆作为阴性对照依然与 PRE RNA 探针不发生结合 (图 2d). 我们从第三轮筛选的第 7 号克隆中挑选其中三个重新种植用于抽提  $\lambda$ DNA, 用酶切和 PCR 的方法鉴定目的 cDNA 的大小. 如图 3 所示, 酶切和 PCR 结果均显示第 7 号阳性克隆的 cDNA 长约 1 kb.

如上所述, 本试验是 RNA 与蛋白质的相互作用, 如何控制好实验条件, 防止非特异性结合的发生是筛选成功的关键. 除了保持 RNA 探针的二级结构之外, 洗膜成了去除非特异性结合以确保筛选出特异性表达克隆的又一重要步骤. 由于筛选的膜较多, 往往不能使每张膜都洗得很充分, 容易出现假阳性信号, 防止这一情况出现的办法是: a. 要有足够量的洗液, 让每张膜都充分接触洗液. b. 不断地变换每张膜的位置, 尤其注意防止膜粘贴在一起. c. 洗膜的时间要适当. 一般来讲, 第一轮

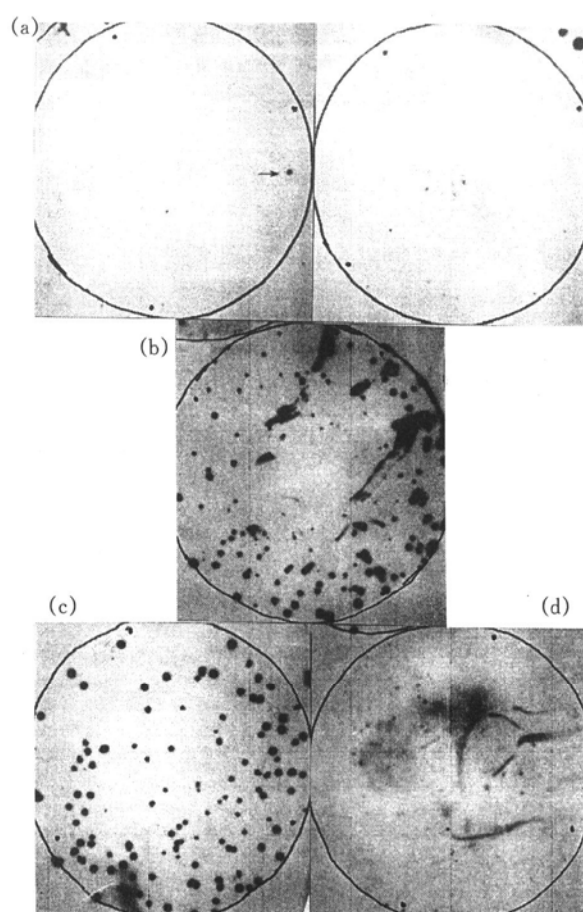


图 2 RNA-蛋白质印迹筛选 HBsAg PIP 表达克隆

(a) 第一轮筛选获得的可疑阳性克隆; (b) 第二轮筛选的第 7 号阳性克隆; (c) 第三轮筛选后的第 7 号阳性克隆; (d) 第三轮筛选后的第 3 号克隆.

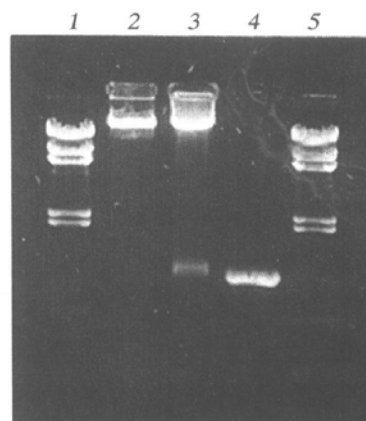


图 3 琼脂糖电泳检测 7 号阳性克隆 cDNA 大小

1, 5: *N-Hind* III DNA 分子质量标准; 2: 7 号阳性克隆  $\lambda$ DNA; 3: 7 号阳性克隆  $\lambda$ DNA / *Eco*RI; 4: 7 号阳性克隆 PCR 产物.

筛选时不要洗得太久, 否则阳性信号太少, 可能丢失筛选到阳性克隆的机会, 但洗得太短, 阳性信号太多, 又会增加下一轮筛选的工作量. 根据我们的

经验,在第一轮筛选时,洗到每张膜的信号刚好接近背景信号时即应停止,而在第二、三轮筛选时,为了防止非特异性的结合,洗膜的时间和次数要足够。

目前,我们正在分析第7号阳性克隆的cDNA序列,由于HBsAg PIP是一个未知的蛋白质,下一步我们将进行蛋白质的表达和功能分析。

### 参 考 文 献

- 1 Draper D E. Protein-RNA recognition. *Annu Rev Biochem*, 1995, **64**: 593~ 620
- 2 Huang Z M, Zang W Q, Yen T S. Cellular proteins that bind to the Hepatitis B Virus posttranscriptional regulatory element. *Virology*, 1996, **217**: 573~ 581
- 3 Banerjee R, Echeverri A, Dasgupta A. Poliovirus encoded 2C polypeptide specifically binds to the 3'-terminal sequences of viral negative-strand RNA. *J Virol*, 1997, **71** (12): 9570~ 9578
- 4 Asundi V, Tyler B, Dreher K. Detection of large cDNA inserts within crude  $\lambda$ gt11 lysates: a rapid and sensitive method. *BioTechniques*, 1990, **9** (5): 578~ 580
- 5 Huang Z M, Yen T S. Hepatitis B Virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm. *J Virol*, 1994, **68** (5): 3193~ 3199
- 6 Gagnon A, Jeang K T. Expression cloning of genes encoding RNA-binding proteins. *Methods in Molecular Genetics*, 1994, **4**: 18~ 28
- 7 Gagnon A, Buckler-white A, Berkhout B, *et al.* Characterization of a human TAR RNA-binding protein that activates the HIV-1 LTR. *Science*, 1991, **251** (5001): 1597~ 1600
- 8 Constantoulakis P, Campbell M, Felber B K, *et al.* Inhibition of Rev-mediated HIV-1 expression by an RNA binding protein encoded by the interferon-inducible 9~ 27 gene. *Science*, 1993, **259** (5009): 1314~ 1318
- 9 Johnston D St, Brown N H, Gall J G, *et al.* A conserved double-stranded RNA-binding protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992,

**89** (22): 10979~ 10983

- 10 Wilson S A, Brown E C, Kingsman A J, *et al.* Trip: a novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I. *Nucleic Acids Res*, 1998, **26** (15): 3460~ 3467

**Isolation of Expression Clones of Genes Encoding HBsAg Posttranscriptional Regulatory Proteins with Northwestern Blot.** DENG Qing-Li, HUANG Zhi-Ming, SHAO Jing (Medical Research Center, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China); HUANG Zhi-Qing (Laboratory of Gastroenterology, Sun Yat-sen Memorial Hospital of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China).

**Abstract** Northwestern Blot has been used for isolation of cDNAs encoding proteins interacting with HBsAg posttranscriptional regulatory element (PRE). One expression cDNA clone which showed specially binding to PRE was isolated from  $\lambda$ gt11 cDNA expression library prepared with human hepatoma cell line HepG2. The size of this PRE-interacting protein (PIP) clone was identified to be about 1 kb by PCR and digestion with restriction endonuclease *EcoR* I. The results showed that Northwestern blot with some modifications is a useful method for isolation of expression clones of genes encoding RNA-binding proteins.

**Key words** Northwestern blot, hepatitis B virus surface antigen, posttranscriptional regulatory element, PRE-interacting proteins

## 利用 RNO 脱色反应检测类囊体中的单线态氧\*

徐志防<sup>1)</sup> 罗广华 王爱国 陈贻竹

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

**摘要** 光敏剂 RB 在光照射下与 O<sub>2</sub> 反应产生<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 与组氨酸或咪唑反应的中间产物使 RNO 发生氧化, 导致 RNO 在 440 nm 处吸光度减小, 此即为 RNO 脱色反应. RNO 脱色反应随着光照时间的增加而增大, 表明 RB 受

\* 国家自然科学基金 (39670072) 和广东省自然科学基金 (960471) 资助项目.

<sup>1)</sup> 通讯联系人. Tel: (020) 87705626-406; E-mail: xuzf@scib.ac.cn

收稿日期: 1998-12-21, 修回日期: 1999-04-20