文章编号:1000-5404(2005)04-0317-03

论著

# 细菌16S rDNA基因T碱基特异的PCR产物片段化

黄正根,刘 昕,高玉梅,蔡瑜娇,由莉越,罗勇军 (第三军医大学基础医学部分子遗传学教研室,重庆 400038)

**提 要:目的** 探讨细菌16S rDNA检测芯片杂交前的样本处理优化方法。**方法** 设计针对细菌16S rDNA基因全长的通用引物,通过PCR时掺入一定比例的dUTP替代dTTP,扩增长度为1.5 kb的片段,用尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG)消化处理掺入到双链上的dUTP后,再经浓氨水特异性断开DNA双链上原dUTP处的磷酸二酯键,然后用聚丙烯酰胺凝受胶电泳(PAGE)和琼脂糖电泳确认片段化的效果。**结果** 本实验选用的基因当dUTP与dTTP的比例在3:7~1:1时,都能够获得比较理想的片段化结果。**结论** 通过控制一定的dUTP掺入比例再经UDG及氨水处理能够得到稳定的片段化结果。

**关键词:** 尿嘧啶-DNA糖基化酶;16S rDNA;片段化;PCR;dUTP;dTTP

**中图法分类号:** Q75; Q781 **文献标识码:** A

# Thymidine-base-specific fragmentation of PCR amplicons of bacterial 16S rDNA

HUANG Zheng-gen, LIU Xin, GAO Yu-mei, CAI Yu-jiao, YOU Li-yue, LUO Yong-jun (Department of Molecular Genetics, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the optimized method for fragmentation of PCR amplicons of bacterial 16S rDNA gene. **Methods** The 16S rDNA gene of *Escherichia coli* (*E. coli*) was amplified by PCR. Proportionate deoxyuracil triphosphate (dUTP) was added into the DNA helix by PCR to replace deoxythymidine triphosphate (dTTP) partially. After purification, the products were digested with uracil-DNA glycosylase to remove all of the added dUTP. The phosphate backbone was deoxyuracil-base specific broken by using aqueous NH3. PAGE and agarose gel electrophoresis were used to estimate the outcomes of fragmentation. **Results** As for 16S rDNA gene in *E. coli*, a reproducible PCR amplicon fragmentation could be achievable when the proportion of dUTP/dTTP was between 3/7 and 1/1. **Conclusion** A reproducible fragmentation of 16Sr DNA amplicons is achievable by varying the concentration of dUTP in PCR and by treating amplicons with UDG and aqueous NH3.

**Key words:** uracil-DNA glycosylase; 16S rDNA; fragmentation; PCR; deoxyuracil triphosphate; deoxythymidine triphosphate

16S rDNA是核糖体16S小亚基(16S rRNA)的基因,长度约为1.5 kb,为细菌分类学研究中最常用的"分子钟",其序列包含10个可变区(variableregion)和与之相间的11个恒定区(constantregion),可变区因细菌而异,且变异程度与细菌的系统发育密切相关[1,2],基于细菌的16S rDNA的基因的特点,相关的诊断方法成为研究的热点,然而较长的16S rDNA扩增片段对杂交反应的特异性影响较大[3],部分16S rDNA基因的特异性又不够[4]。如果对16S rDNA的全长扩增产物再进行片段化则可能克服这两个问题。本研究采用简便可行的细菌16S rDNA扩增子的片段化,以期在后继的杂交检测中获得更加特异的信号。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌(ATCC25922)购自中国微生物保藏管理委员会普通微生物中心,针对大多数细菌的16S rDNA全长的通用引物(P1: 5′-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3′, P2: 5′-AAGGAGGTGATCCAGCC-3′)由上海基康生物技术有限公司合成,含dTTP的dNTP购自大连宝生物工程有限公司,*Taq*酶试剂盒(10×Buffer、$MgCl_2$、含dUTP的dNTP)购自上海Promega公司,PCR纯化试剂盒购自Omega,尿嘧啶-DNA糖基化酶(UDG)购自北京纽英伦生物技术有限公司,NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer(分光光度计,德国),丙烯酰胺及双甲叉丙烯酰胺(29:1)为德国Biomol公司进口分装,25%氨水及其它试剂均为国产分析纯。

作者简介:黄正根(1977-),男,四川省宜宾市人,硕士研究生,医师,主要从事芯片检测技术方面的研究。电话:(023)68753879

通讯作者:刘 昕,电话:(023)68753934

收稿日期:2004-07-03;修回日期:2004-11-20

### 1.2 方法

1.2.1 PCR反应中dUTP的掺入 分别按如下7种不同dUTP:dTTP比例(1:9、2:8、3:7、3.5:6.5、4:6、5:5、0:10)加入50 μl PCR反应体系,体系各成分如下:1.5 mmol/L $MgCl_2$,各比例组dUTP与dTTP总浓度为0.125 mmol/L,dATP、dGTP、dCTP均各为0.125 mmol/L,50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl,0.1% TritonX-100,上、下游引物各0.5 μmol/L,2 μl DNA模板(煮沸法制备的细菌基因组DNA)、1 μl *Taq*酶,空白管不加DNA模板;其余为灭菌双蒸水。PCR反应条件:94 ℃预变性5 min,35个循环(94 ℃, 30 s; 53 ℃, 30 s; 72 ℃, 90 s),72 ℃,8 min。0.8%普通琼脂糖电泳(SYBR Green Ⅰ染色)观察,有预期的1.5 kb左右的产物(结果未示出);以下处理不包括空白管。

1.2.2 PCR产物纯化 严格按PCR产物纯化试剂盒操作说明进行,最后用40 μl水洗脱;NanoDrop ND-1000紫外波长260 nm测其含量。

1.2.3 PCR产物的消化 50 μl反应体系包含以下成分:20 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT,UDG 1 μl(2 U),于37 ℃水浴,30 min彻底消化上述40 μl纯化后的PCR产物。

1.2.4 UDG消化产物纯化及磷酸骨架的断裂 用与上述相同的PCR产物纯化试剂盒操作,仅最后一步用30 μl的25%氨水洗脱;迅速将其放入60 ℃水浴10 min,4 ℃冰箱速冷3 min,94 ℃水浴10 min,打开离心管盖于85 ℃放置10 min;NanoDrop ND-1000紫外波长260 nm测其含量。

1.2.5 片段化产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离 将上述产物与DNA分子量Markers及PCR反应空白管与等体积的2× Buffer(95%甲酰胺,0.05%溴酚蓝)混匀,沸水浴10 min,于4 ℃速冷3 min,快速上样5 μl于预电泳30 min的15%的非变性PAGE,恒压4 V/cm,直到溴酚蓝接近凝胶底部。

1.2.6 PAGE胶的银染显色 10%的HAc(醋酸)中室温固定30 min→水洗2次;预处理:1 g/L $K_2Cr_2O_7$、0.000 2% $HNO_3$,5 min;水洗2次;银染:2 g/L $AgNO_3$,30 min;水洗2次;显色:30 g/L $Na_2CO_3$、0.075%甲醛,5~10 min;终止:10% HAc,5 min;水冲洗3次。

1.2.7 片段化产物琼脂糖电泳分离 上述加了上样缓冲液的产物,取3 μl与1 μl SYBR Green Ⅰ(100×工作液,深圳达科为)预染5 min后上样于预电泳20 min的2%的普通琼脂糖凝胶(Oxoid, England),恒压3 V/cm,电泳1 h。

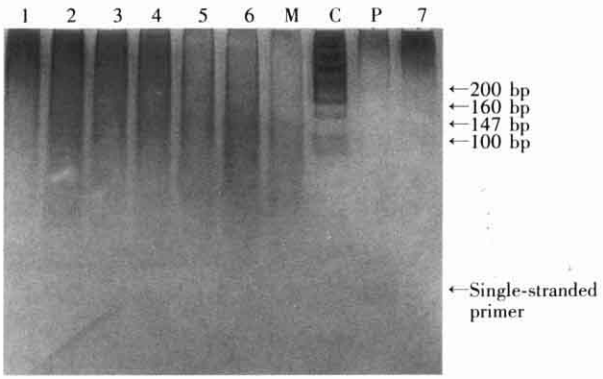
## 2 结果

### 2.1 不同比例dUTP/dTTP的PCR纯化效率

在NanoDrop上(主波长260 nm)测得吸光度值$D(260)$、$D(280)$及$D(260)/D(280)$,用以表示PCR纯化及氨水处理后的DNA含量及纯。结果表明,经两次PCR纯化试剂盒纯化后各比例组的产物均保留85%以上且纯度较好。

### 2.2 16S rDNA PCR产物片段化电泳结果

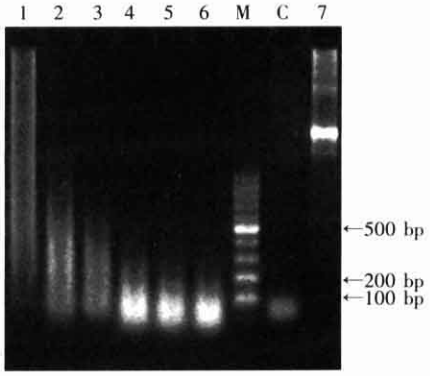
图1显示PCR片段化的聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)结果:从左至右依次为:1(0/10),2(1/9),3(2/8),4(3/7),5(3.5/6.5),6(4/6),7(5/5),pBR322 DNA/Msp Ⅰ Markers(华美生物工程公司),PCR空白管,PCR阳性对照。图2显示PCR产物片段化的琼脂糖凝胶电泳结果。从左至右依次为:1(1/9),2(2/8),3(3/7),4(3.5/6.5),5(4/6),6(5/5),100 bp DNA Ladder(华美生物工程公司),PCR空白管,7(0/10)。




1: Ratio = 0/10; 2: Ratio = 1/9; 3: Ratio = 2/8; 4: Ratio = 3/7; 5: Ratio = 3.5/6.5; 6: Ratio = 4/6; 7: Ratio = 5/5; M: pBR322 DNA/Msp I markers; P: PCR blank; C: Control (ratio: dUTP/dTTP)

**图1 片段化产物的15%聚丙烯酰胺凝胶电泳银染图像**

**Fig 1 Detection of fragmentation by PAGE**




1: Ratio = 1/9; 2: Ratio = 2/8; 3: Ratio = 3/7; 4: Ratio = 3.5/6.5; 5: Ratio = 4/6; 6: Ratio = 5/5; 7: Ratio = 0/10; M: 100bp DNA ladder; C: PCR blank (ratio: dUTP/dTTP)

**图2 片段化产物在2%琼脂糖凝胶上的分离结果**

**Fig 2 Detection of fragmentation by agarose electrophoresis**

## 3 讨论

16S rDNA的序列包含10个可变区(variableregion)和与之相间的11个恒定区(constantregion),其保守区及变异区特点在细菌分类鉴定中有着广泛的应用,较之23S rDNA等看家基因,它具有分子量大小适中,突变率小等优点[2,5]。但是以它为基础的临床病原菌的快速检测却仍然存在检测谱窄、特异性差等问题,要区别临床常见的病原菌,即使只鉴定到属的水平,仅仅一到两个变异区(200~300 bp)不能提供足够多的差异

信息[4,5]，而且特异性杂交检测的鉴别力也不是总能达到单核苷酸多态性(SNP)分析的水平。在碱基差异相同的情况下，参与杂交的片段长度越长则特异性越差[6]。因此为杂交检测提供尽可能多的差异信息以及提高杂交的特异性可能是可行的优化方案。为此需要研究行之有效的 PCR 产物的片段化。

目前最常用方法的是利用 DNase Ⅰ在有 $Mg^{2+}$ 的条件下随机在双链 DNA 的单链上产生缺口[7]，在有 $Mn^{2+}$ 的条件下随机断开双链 DNA。在我们的实验中发现 DNase Ⅰ活性很不稳定，极易受温度及靶 DNA 量及纯度的影响；不同批次的酶活性相差也很大，较难获得稳定的片段化结果。Tullius 等[8]介绍了一种羟自由基法，利用 $Fe^{2+}$ 催化 $H_2O_2$ 的还原反应产生羟自由基来依次切割 DNA 骨架，这种方法是非酶促的化学反应，对 DNA 链上的每一个磷酸二酯键都作同等切割，我们在实验中发现较难控制其反应的适宜程度，而且对末端有优先切割倾向。Miyazaki 等[9]应用大肠杆菌的内切酶 V(endonuclease V)在 PCR 掺入的 dUTP 下游 2～3 个碱基处随机切割 DNA 骨架，但是其酶不如 UDG 活性高且价格昂贵，在高浓度时还有副效应。

本实验通过在 PCR 体系中用 dUTP 替代部分 dTTP，使得 dUTP 与 dTTP 以一定比例掺入，即使 PCR 的扩增效率不同，也并不影响产物中 dUTP/dTTP 比例[9]；再将此产物纯化后经尿嘧啶-DNA 糖基化酶(UDG)彻底消化，完全移除 dUTP，原来的完整双链 DNA 就发生了 T 位点特异的碱基缺失。但是此时的磷酸骨架尚完整；再次过柱纯化，用 25% 的浓氨水洗脱，60 ℃水浴，此碱性环境下裸露的磷酸骨架从碱基缺失的位点断开，在高温下变性成为长度不一(理论上为正态分布)的单链 DNA 片段，开盖让氨水中氨气在高温下挥发，即剩下 DNA 片段。虽然此片段化也不是在任意碱基位点进行切割，而且同时会产生少量较长和较短的片段，但是对于杂交检测，只要长度适宜就能完全合乎要求；具体的适宜长度需要进一步的杂交结果验证。此方法还应注意以下几个问题：①实验中 dUTP 的掺入率不仅与 PCR 反应体系中的 dUTP/dTTP 比例相关，还受 *Taq* 酶特性的影响[10]，比如大连宝生物的高保真 *Taq* 酶(TaKaRa Ex *Taq*™)就不能掺入上述 dUTP(结果未示出)；即理论上 PCR 当中的 dUTP/dTTP 比例并不一定是 PCR 产物中 dUTP/dTTP 比例；因此，应该尽量选用对 dUTP 及 dTTP 掺入效率相当的 *Taq* 酶，同时加大 dUTP/dTTP 的初始反应浓度，以免在反应进行过程中 dUTP/dTTP 比例发生较大变化。②除了 dUTP 的实际掺入率外，靶基因的 G + C 含量也是影响片段化最终长度的一个重要因素[8]，但是由于细菌 16S rDNA 基因的 G + C 含量相差不大，理论上片段化后长度的差别也不大。③本实验目的旨在寻求一个稳定的片段化方法，它的重现性好，比其它方法简便易行，各 dUTP/dTTP 比例的杂交效果有待于进一步验证。④如果是功能蛋白表达基因，只需要做 dUTP/dTTP 比例的变动，使之产物片段在 50 bp 左右，是 DNA 改组(DNA shuffling)前的比较理想的片段化长度[11]。

**参考文献：**


[1] Peplies J, Glockner F O, Amann R. Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(3): 1397 - 1407.

[2] 焦振泉，刘秀梅，孟昭赫. 16Sr RNA 序列同源性分析与细菌系统分类鉴定[J]. 国外医学卫生学分册，1998，25(1)：12 - 16.

[3] 翟俊辉，郭兆彪，宋亚军，等. 16Sr DNA 基因芯片检测临床常见感染性细菌[J]. 临床检验杂志，2002，20(3)：133 - 136.

[4] Wilson K H, Wilson W J, Radosevich J L, *et al*. High-density microarray of small-subunit ribosomal DNA probes[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(5): 2535 - 2541.

[5] Song Y, Liu C, McTeague M, *et al*. Rapid identification of Gram-positive anaerobic coccal species originally classified in the genus Peptostreptococcus by multiplex PCR assays using genus- and species-specific primers[J]. Microbiology, 2003, 149(Pt7): 1719 - 1727.

[6] von Wintzingerode F, Bocker S, Schlotelburg C, *et al*. Base-specific fragmentation of amplified 16S rRNA genes analyzed by mass spectrometry: a tool for rapid bacterial identification[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(10): 7039 - 7044.

[7] Sambrook J, Russell D W. 黄培堂 译. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京：科学技术出版社，2002. 1323 - 1330.

[8] Tullius T D, Dombroski B A. Hydroxyl radical "footprinting": high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986, 83(15): 5469 - 5473.

[9] Miyazaki K. Random DNA fragmentation with endonuclease V: application to DNA shuffling[J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(24): e139.

[10] Sluppaug G, Alseth I, Eftedal I, *et al*. Low incorporation of dUMP by some thermostable DNA polymerases may limit their use in PCR amplifications [J]. Anal Biochem, 1993, 211(1): 164 - 169.

[11] Stemmer W P. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly-*in vitro* recombination for molecular evolution[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(22): 10747 - 10751.


(编辑　栾　嘉)