DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.09.039
第25卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 9
2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2003

文章编号:1000-5404(2003)09-0833-02

经验交流

采用PCR技术从高GC含量绿脓杆菌模板中扩增长片段外毒素A全基因

PCR amplification of long exotoxin A gene from GC-rich *Pseudomonas aeruginosa* genomic DNA

胡晓梅,饶贤才,黄建军,金晓琳,朱军民,胡福泉 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室、重庆市微生物工程重点实验室,重庆 400038)

从高GC含量的模板中用PCR方法扩增长片段DNA序列是相当困难的。本室通过对PCR反应体系和条件的优化,成功地从绿脓杆菌高GC含量的染色体模板中扩增到了1 966 bp的外毒素A(Pseudomoneas aeruginosa exotoxin A, PEA)全长结构基因,为实现PEA的高效表达奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 绿脓杆菌PA103菌株染色体DNA和PCR引物的制备

按常规方法提取绿脓杆菌PA103染色体DNA。参照Gray等公布的序列设计一对分别位于PEA结构基因两侧的引物。5′引物:5′-GAT CAG CCT CAT CCT TCA G-3′(Tm=66);3′引物:5′-GGT CGC GGC AGT TAC TT-3′(Tm=68)。引物经PAGE纯化。

1.2 反应体系的配制

5 μl DNA模板(0.5 μg),5 μl 10× PCR扩增缓冲液,5′引物及3′引物各2 μl(100 ng),10 mmol/L dNTP混合物1 μl,50%甘油5 μl,DMSO 2.5 μl,灭菌水27 μl,Taq DNA聚合酶0.5 μl(2.5 U),总体积50 μl。

1.3 热循环周期设定

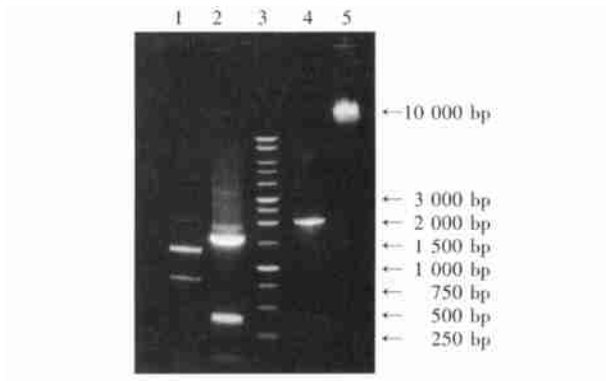
94 ℃变性4 min,接着进入循环,94 ℃变性1 min,58 ℃退火1 min,72 ℃延伸3 min,共循环30个周期。72 ℃终末延伸30 min。反应完毕取5 μl PCR产物于1%琼脂糖凝胶中电泳观察结果。

1.4 用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化PCR产物

用*Bam*HⅠ和*Bgl*Ⅱ分别酶切鉴定。将纯化的PCR产物与本室自行构建的T-载体进行连接,连接产物常规转化*E. Coli* DH10B的感受态细胞,选取阳性重组质粒DNA进行纯化,通过自动测序仪进行序列分析。

2 结果

以PA103染色体DNA为模板,PCR扩增获得1 966 bp的单一片段。用*Bam*HⅠ酶切PCR扩增片段后得到58 bp,378 bp和1 530 bp 3个片段,*Bgl*Ⅱ酶切后得到782 bp和1 184 bp 2个片段,符合已知的PEA结构基因的限制性酶切图谱,初步证明扩增得到的1 966 bp的片段是PEA的结构基因,见图1。扩增的PEA结构基因与本室自行构建的T-载体连接后,筛选到2个分子质量约为5 000 bp的质粒,用*Bam*HⅠ酶切鉴定,可切出1 530 bp的片段,用*Bgl*Ⅱ酶切可线性化,说明PEA结构基因已克隆于T-载体中。取重组质粒,以PCR引物作为测序引物进行自动测序分析,得到了克隆片段前710 bp的DNA序列,与Genbank中的序列一致。



1:PCR产物经*Bgl*Ⅱ酶切;2:PCR产物经*Bam*HⅠ酶切;3:1 kb DNA Marker;4:PCR产物;5:PA103染色体DNA

图1 PCR产物及其酶切图谱

3 讨论

绿脓杆菌外毒素A结构基因(toxA)全长1 839个碱基,加上两端其它序列,PCR直接克隆的片段为1 966个碱基,绿脓杆菌外毒素A基因是一个难扩增序列,本实验室过去曾多次试图扩增该基因均遭失败。这次我们再次克隆该基因的过程中,认真分析了该基因的一级结构特征,发现PEA的一级序列GC含量高达65%[1]。高GC含量模板扩增中所面临的主要困难是模板中容易形成稳定的二级结构妨碍DNA聚合酶在模板上的推进,以及模板上可能存在多个非特异性的引物局部复性位点,导致非特异性扩增[2]。当然,后面一个问题并非仅仅存在于高GC含量模板中,在其它模板扩增中也有类似问题,但在高GC含量模板中,这一问题尤为突出。为了建立一种扩增高GC含量模板的有效方法,需要对引物以及能消除稳定二级结构的各种有机溶剂进行比较和选择。在PCR引物设计原则中要求引物中的GC含量适中,这使得我们的引物选择十分困难,以致本研究最终选择到的引物还是不甚理想,仍然有引物内局部多GC碱基堆积现象。这导致我们用经验公式Tm = 4(G+C)+2(A+T)推断引物Tm值的结果有很大的误差。如我们所用的

基金项目:全军"十五"医学科研青年基金资助项目(01Q108)
作者简介:胡晓梅(1970-),女,四川省岳池县人,博士研究生,讲师,主要从事细菌致病机制及分子生物学方面的研究。电话:(023)68752239
收稿日期:2002-03-14;修回日期:2002-06-30

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

这对引物，按经验公式Tm值分别为58及54，但按碱基相邻精确计算法它们的Tm值分别为66及68，分别相差8 ℃及14 ℃。在这样的情况下，如果按照经验公式推导的Tm值设置PCR循环的退火温度，十之八九是要失败的，这也许正是我们过去多次失败的原因。此外，我们在PCR扩增体系中加入了5%的甘油和5%的二甲亚砜(DMSO)也是实验成功的关键所在。据报道，反应中加入5%～20%的甘油有助于PCR反应的复性过程，尤其对GC含量高和二级结构多的靶序列以及扩增长片段更适用。而DMSO有变性DNA的作用，可促进横板的充分变性。应注意的是，DMSO和甘油并非对所有PCR均有益，因此，是否加这些试剂应根据具体情况而定，也需要操作者的探索。

关键词：高GC含量；绿脓杆菌模板；POCR扩增；外毒素A；长片段基因
中图法分类号：R394-33 文献标识码：B

参考文献：

[1] Shortrige V D, Pato M L, Vasil A I, *et al*. Physical mapping of virulence-associated genes in *Pseudomonas aeruginosa* by transverse alternating-field electrophoresis[J]. Infect Immun, 1991, 59(10): 3596－2603.
[2] 胡福泉. 现代基因操作技术[M]. 北京：人民军医出版社，2000. 129－131.

（编辑 郭建秀）

经验交流

文章编号：1000-5404(2003)09-0834-01

锌干预对大鼠DNA、RNA合成的影响

Effects of Zn nutritional intervention on the synthesis of DNA and RNA in rats

刘海燕，孙梯业 （第三军医大学研究生管理大队，重庆 400038）

研究发现锌不仅参与上百种酶的合成与激活，并且直接参与生长发育，免疫遗传等功能[1,2]。它能影响细胞分裂、生长和再生，现已证明，缺锌可造成DNA、RNA聚合酶的活性降低，引起生长发育迟缓乃至停滞。有报道[3]表明，缺锌可使大鼠脑部DNA、RNA合成减少，游离谷氨酸浓度降低，而α-氨基丁酸增多。此外，锌也在一些激素的产生、分泌和生理效应的发挥中起一定的作用。本研究采用大鼠为实验对象，观察锌缺乏和补锌对大鼠生长发育的影响，为指导使用锌强化食品达到合理营养作用提供实验资料。

1 材料与方法

1.1 饲料准备

饲料按照AOAC标准料饲制备。设对照组、低锌组、中剂量锌组及高锌组、分别补充锌2 ppm，30 ppm及300 ppm。

1.2 动物饲养与分组

由第三军医大学动物实验中心提供56只初断乳Wistar雄性大鼠，体质量(61.9±2.7)g，随机分成4组，每组16只：低锌组、中剂量锌组、高锌组、对照组，大鼠单个置于全塑代谢笼中饲养，每日加饲食1次，自由饮水。动物饲养环境室温(23±1) ℃，室内相对湿度(45±5)%，饲养4周。

1.3 测定指标

除对照组外，其余3组大鼠首先进食低锌饲料，造成锌缺乏状态。在此基础上，低锌组继续给以低锌饲料，中锌及高锌组分别补充不同剂量锌饲料。对照组饲以正常饲料。每周测体质量、记录摄食量，清洗笼具底盘，观察各组大鼠的生活情况，大鼠各主要器官的DNA与蛋白质量，微量元素含量，肠粘膜透重性的改变，肠粘膜上皮细胞增殖情况等。

作者简介：刘海燕(1968－)，女，河南省郑州市人，硕士研究生，营养师，主要从事基础营养和临床营养方面的研究。联系电话：(023)68752291
收稿日期：2002-03-18；修回日期：2002-07-28

2 结果

实验发现大鼠缺锌引起的最突出的症状是食欲下降和摄食量下降及由此导致的生长迟缓。这种现象在进食低锌饲料后第5天即出现，尽管提高对照组的食物含锌量，未能显著改善大鼠的体质量，但补锌大鼠的体质量和食物转化率优于缺锌大鼠，大鼠的精神状态与体质量变化相似，缺锌大鼠神经代谢的改变，主要与缺锌造成大脑结构异常[4]及尿氮排出比例增加有关。

大鼠各主要脏器的营养状况中，受锌影响最大的是DNA含量，尤其是那些对锌敏感的器官(如空肠、肾、睾丸和脾等)。缺锌大鼠中所测得的显著低于各补锌组。

锌营养状况对大鼠小肠粘膜通透性的较大影响，进食低锌饲料7 d，发现小肠粘膜通透性显著增加，大剂量补锌1 d即可使肠粘膜对甘露醇和乳糖的通透性明显下降。

实验中用注射化疗药长春新碱的方法，使肠细胞分裂停止于分裂中期。计数处于分裂中期的细胞数，发现缺锌能够使上皮细胞的增殖减少，增殖率下降。可能是存在某种代偿机制，缺锌大鼠具有吸收能力的肠绒毛高度不变，其主要形态改变是隐窝加深，致使绒毛、隐窝的比例加大，各补锌组的粘膜形态保持正常。

3 讨论

锌被誉为生命之花。在动物体及生长发育中发挥重要作用。同时，锌作为体内酶辅助因子、辅助蛋白或蛋白的结构成分，在机体内执行着广泛的生物功能，包括DNA合成、序列辨认、转录调节、细胞骨架、膜的完整性及通透性，细胞凋亡和细胞能量代谢过程。锌是细胞生长、发育和分化所必需的元素，它参与胸腺嘧啶核苷激酶、DNA和RNA聚合酶等组成。当锌缺乏时，这些酶活性降低，^{3}H-TdR加入DNA减少。DNA、RNA含量降低。研究发现锌对机体代谢的影响是通过调节一系列

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