

## 毛细管电泳-激光诱导荧光检测分枝杆菌 脱氧核糖核酸限制性内切酶谱

黎源倩, 王国庆, 米建萍, 周颖, 曾红燕, 张朝武

(四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041)

**摘要**:建立了毛细管电泳分离-激光诱导荧光检测(CE-LIFD)分析分枝杆菌脱氧核糖核酸(DNA)限制性内切酶谱的新方法。用聚合酶链反应(PCR)扩增分枝杆菌 hsp65 基因的长度为 439 bp 的片段,该扩增片段经限制性内切酶 *BstE* II 和 *Hae* III 酶切后,分别用 CE-LIFD 装置和常规琼脂糖电泳(AGE)对比检测酶切片段。对 PCR 扩增片段的酶切样品的预处理和 CE 条件进行了优化,获得了 8 种分枝杆菌 DNA 的限制性内切酶谱图。DNA 片段相对迁移时间的相对标准偏差(RSD)  $\leq 3.6\%$ 。结果表明,CE 的分离效能明显高于 AGE,是研究 DNA 限制性内切酶谱的更有效的检测手段。

**关键词**:毛细管电泳;激光诱导荧光检测;限制性内切酶谱;分枝杆菌

中图分类号:O658 文献标识码:A 文章编号:1000-8713(2005)01-0103-05

## Restriction Enzyme Pattern Analysis of Mycobacteria DNA by Capillary Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detection

LI Yuanqian, WANG Guoqing, MI Jianping, ZHOU Ying, ZENG Hongyan, ZHANG Chaowu

(West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract**: A new method for rapidly detecting restriction enzyme pattern of mycobacterium deoxyribonucleic acid (DNA) by capillary electrophoresis with laser induced fluorescence detection (CE-LIFD) was developed. Polymerase chain reaction was used to amplify a 439 bp fragment of 65 000 ( $M_r$ ) heat shock protein gene (hsp65) of mycobacterium. After digesting the amplification products by *BstE* II and *Hae* III respectively, the patterns of enzyme cleaved products were detected by both CE-LIFD and agarose gel electrophoresis (AGE). The experimental parameters of CE were optimized. The restriction enzyme patterns of mycobacterium DNA can be detected under the optimum electrophoresis conditions: a coated capillary column with the length of 50 cm and 100  $\mu\text{m}$  i. d., electrophoresis buffer of 45 mmol/L TBE (trihydroxymethyl aminomethane (Tris)-boric acid-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)) and 11 kV running voltage. The restriction enzyme patterns for eight species of mycobacteria were studied. Relative standard deviations of the relative migration times of the DNA segments were less than 3.6%. Compared with AGE, CE is more outstanding in resolution and detection time, and it can be applied as a more effective means for DNA restriction enzyme pattern analysis.

**Key words**: capillary electrophoresis; laser induced fluorescence detection; restriction enzyme pattern; mycobacterium

以结核病为代表的分枝杆菌病已经对全人类的健康形成了极大的威胁,能否对其进行正确的诊断和治疗,主要取决于对分枝杆菌的分离和鉴定。传统的病原学鉴定方法是先进行细菌的分离和培养,然后再进行生化鉴定。由于分枝杆菌生长缓慢,该法耗时长,且生化检验项目多,因此不利于临床早期

诊断和治疗。

随着分子生物学技术的不断发展,聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)和 PCR-限制性内切酶谱分析(PCR-restriction enzyme pattern analysis, PRA)等在分枝杆菌中的分类和鉴定中逐步得到了应用。经典的 PRA 采用琼脂糖凝胶电泳

( agarose gel electrophoresis ,AGE ) ,在紫外光下观察电泳图谱 ,分辨率和灵敏度不够高。高效毛细管电泳( capillary electrophoresis ,CE )是近年来发展十分迅速的分离分析方法 ,与传统的电泳方法相比 ,具有分辨率高、分离速度快、样品用量少( nL 级 )、分析成本低等优点 ,特别是采用激光诱导荧光检测( LIFD )又使毛细管电泳法的灵敏度大为增加<sup>[1]</sup>。根据酶切后脱氧核糖核酸( DNA )片段多态性的差异 ,可分析基因组的同源性 ,并进行个体分类鉴定 ,在微生物研究领域有广阔的应用前景<sup>[2]</sup>。

hsp65 基因存在于所有分枝杆菌中 ,编码一种相对分子质量为65 000的细胞壁抗原蛋白。该基因全长约1 300 bp。Telenti 等<sup>[3]</sup>设计引物扩增了该基因第 398 至第 836 碱基对之间的片段 ,并采用限制性内切酶对扩增片段进行酶解 ,经 AGE 分析其 DNA 片段长度 ,发现大多数分枝杆菌具有独特的内切酶图谱 ,可以用于分枝杆菌的鉴别。贺小玲等<sup>[4]</sup>采用 AGE 对临床标本中的分枝杆菌属进行了鉴定。本研究以分枝杆菌的 hsp65 为目的基因 ,采用一对引物扩增出该基因中长度为 439 bp 的特征片段 ,经限制性内切酶 *BstE* II 和 *Hae* III 酶切后 ,分别用 CE 和 AGE 分离酶切片段 ,对分枝杆菌进行分类鉴定 ,以建立快速、可靠的鉴定方法 ,对结核病的早期诊断及预防具有重要意义。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

毛细管电泳-激光诱导荧光检测装置( 自行组装 ,包括氦氖激光器( 543.5 nm ,JDS Uniphase ) ) ,参数控制和数据采集用本实验室编制的 Windows 软件。毛细管柱( 河北永年光导纤维厂 ) ,柱内表面的聚丙烯酰胺化学键合涂层由本实验室制备<sup>[5]</sup> ,涂渍后的毛细管内充 0.01 mol/L  $H_3PO_4$  保存。UNO 型 PCR 仪( 德国 Biometre 公司 )。柱式细菌 DNA 抽提试剂盒( 上海华舜生物工程有限公司 )。

草分枝杆菌( *Mycobacterium phlei* , *M. phlei* , CMCC( B )93318 )、蟾分枝杆菌( *M. xenopi* , CMCC( B )93316 )、偶发分枝杆菌( *M. fortuitum* , CMCC( B )93323 )、变黄分枝杆菌( *M. flavescens* , CMCC( B )93322 )、迪氏分枝杆菌( *M. diernhoferi* , CMCC( B )93320 )、结核分枝杆菌( *M. tuberculosis* , CMCC( B )93020 )和牛分枝杆菌( *M. bovis* , CMCC( B )93006 )标准参考菌株购自中国药品生物制品检定所。龟分枝杆菌脓肿亚种( *M. chelonae subsp. abscessus* )临床分离株由深圳市卫生防疫站提供。限制性内切酶 *BstE* II 和 *Hae* III( 上海生工生物工程

技术有限公司 ) ;Taq DNA 聚合酶 ,dNTPs( deoxyribonucleoside 5'-triphosphates ) ,pUC19DNA/*Msp* I( *Hpa* II ) Marker 23( 华美生物工程有限公司 ) ;引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。溴乙啶、甲基纤维素购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 分枝杆菌基因组 DNA 的提取和 PCR 扩增

在罗氏培养基上 ,取培养物 1 ~ 2 接种环 ,加灭菌重蒸水 1.5 mL ,研磨成混悬液 ,用 DNA 抽提试剂盒提取。PCR 反应液含有模板 DNA 2  $\mu$ L ,10  $\times$  缓冲液 5  $\mu$ L ,dNTPs 4  $\mu$ L ,引物 p1、p2 各 1  $\mu$ L ,灭菌高纯水 35.5  $\mu$ L ,Taq 酶( 3 U/ $\mu$ L ) 1.5  $\mu$ L ;总体积 50  $\mu$ L。PCR 反应条件为 :预变性 94  $^{\circ}$ C( 5 min ) ,变性 94  $^{\circ}$ C( 1 min ) ,退火 58  $^{\circ}$ C( 1 min ) ,延伸 72  $^{\circ}$ C( 1 min ) ,循环数 35 ,最后保持在 72  $^{\circ}$ C( 5 min )。

#### 1.2.2 限制性内切酶酶切

将 PCR 扩增产物分别用限制性内切酶 *BstE* II 和 *Hae* III 进行酶切。分别取 PCR 产物 20  $\mu$ L ,灭菌高纯水 23  $\mu$ L ,10  $\times$  酶缓冲液 5  $\mu$ L ,限制性内切酶( 10 U/ $\mu$ L ) 2  $\mu$ L。反应体系总体积为 50  $\mu$ L ,反应条件为 37  $^{\circ}$ C( 1 h )。

#### 1.2.3 高效毛细管电泳-激光诱导荧光检测

调整好 CE-LIFD 装置的光路系统。在电泳分析前 ,将毛细管柱先填充 0.1% ( 质量分数 ) 甲基纤维素 ,再充入加有 DNA 内插荧光试剂溴乙啶的 0.5% ( 质量分数 ) 甲基纤维素 ,分离所用的缓冲溶液为 TBE 溶液( 45 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷-45 mmol/L 硼酸-10 mmol/L 乙二胺四乙酸 ,pH 8.5 )。分别取 pUC19DNA/*Msp* I ( *Hpa* II ) Marker 23、PCR 扩增产物、*BstE* II 酶切产物和 *Hae* III 酶切产物各 10  $\mu$ L ,加入内标 2  $\mu$ mol/L kiton red( 购自 Sigma 公司 ) 1  $\mu$ L ,以 10 kV  $\times$  15 s 电动进样 ,采用在 11 kV 恒压电泳模式 ,用激光诱导荧光检测 DNA 片段。每次电泳后用 0.01 mol/L  $H_3PO_4$  冲洗毛细管 5 min ,再进行下一次检测。

#### 1.2.4 琼脂糖凝胶电泳

分别取 PCR 扩增产物、*BstE* II 酶切产物和 *Hae* III 酶切产物各 10  $\mu$ L ,加 6  $\times$  上样缓冲液 2  $\mu$ L ,混匀 ,将样液加到 2% ( 质量分数 ) 的琼脂糖凝胶板( 含溴乙啶 ) 上 ,电泳场强为 8 ~ 10 V/cm ,电泳 70 min。取下凝胶 ,于凝胶成像仪上观察电泳图谱。

## 2 结果与讨论

### 2.1 DNA 样品的预处理

分枝杆菌基因组 DNA 提取后 ,该提取样品经 PCR 扩增后可以直接进行毛细管电泳检测 ,但 PCR

扩增片段的酶切样品直接用于电泳分析时灵敏度低,分离效果差。这是由于酶切样品浓度低、进样量极微,且含有  $MgCl_2$  等盐类可能干扰毛细管电泳,因此需对样品进行预处理。我们试验了 PCR 扩增纯化试剂盒、真空干燥、乙醇沉淀等几种处理方法,结果表明,采用乙醇沉淀酶切样品中的 DNA,在  $0\text{ }^\circ\text{C}$  下高速离心,去除上清液,用  $N_2$  吹干残留的乙醇,用电泳缓冲溶液定容后进行检测,处理方法简单,样品浓缩后能提高检测灵敏度。

### 2.2 毛细管电泳分离条件的选择

采用不同内径和长度的内壁处理过的 3 支石英毛细管柱(内径为  $75\text{ }\mu\text{m}$ ,有效长度分别为  $50\text{ cm}$  和  $65\text{ cm}$ ;内径为  $100\text{ }\mu\text{m}$ ,有效长度为  $50\text{ cm}$ )进行试验。结果表明,内径为  $100\text{ }\mu\text{m}$ ,有效长度为  $50\text{ cm}$  的毛细管用于分离 pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II) Marker 23 的 11 个 DNA 片段和分枝杆菌 PCR-限制性内切酶产物,灵敏度较高,分离效果较好。

分别采用  $10\text{ mmol/L}$  的硼酸盐溶液和 TBE 溶液( $\text{pH } 8.5$ )作为电泳缓冲溶液进行实验。结果表明,用 TBE 溶液作为电泳缓冲溶液分离 DNA 片段分辨率高,电泳峰形好。改变 TBE 缓冲溶液的浓度( $10\sim 60\text{ mmol/L}$ )进行试验,当电泳缓冲溶液的浓度偏低时,电渗流加快,有效淌度减小,CE 分辨率降低,DNA 片段的分离效果变差;当缓冲溶液的浓度偏高时,电流偏大,焦耳热效应使轴向扩散增加,分离效率也受到影响。本实验选用  $45\text{ mmol/L}$  TBE 溶液作为电泳缓冲溶液。

电泳电压对分枝杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物和酶切产物的迁移时间有显著的影响。改变电泳电压( $8\sim 15\text{ kV}$ ),考察本实验中所用 pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II)Marker 23 的 11 个 DNA 片段的分离情况。结果表明,随着电压的增加,Marker 的 DNA 片段的迁移时间不断减少,电泳分析的时间也减少,有利于提高分析速度;但是当电压太高时,331,404,489 和  $501\text{ bp}$  片段的电泳峰部分重叠,不能达到基线分离,故本实验选用的电泳电压为  $11\text{ kV}$ 。

综合考虑检测灵敏度和基线噪声,将光电倍增管的负高压设定为  $-1000\text{ V}$ 。由于分枝杆菌 DNA 经 PCR 扩增后的酶切产物浓度较低,如果进样电压太低和时间太短,往往不能检出小片段的 DNA,因此本实验选用进样电压为  $10\text{ kV}$ ,进样时间为  $15\text{ s}$ 。

根据上述实验结果,本实验选用的最佳电泳条件为:采用内径为  $100\text{ }\mu\text{m}$ 、有效长度为  $50\text{ cm}$  的内壁处理过的毛细管柱,以  $45\text{ mmol/L}$  TBE 溶液作为电泳缓冲溶液,分离电压为  $11\text{ kV}$ 。pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II)Marker 23 的 11 个 DNA 的片段,除

了  $110$  和  $111\text{ bp}$ ,  $489$  和  $501\text{ bp}$  不能分离外,其余片段均可完全分离,其电泳谱图见图 1。图 2 是龟分枝杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物在此条件下的毛细管电泳图。

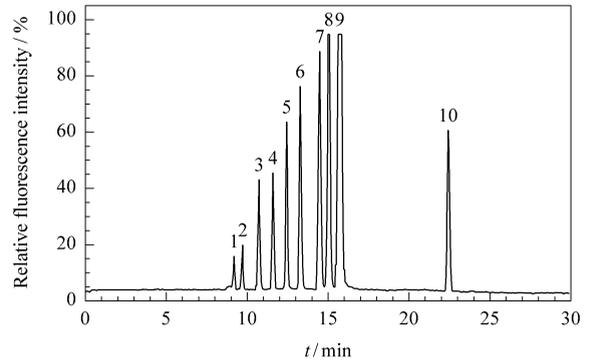


图 1 pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II) Marker 23 的毛细管电泳图

Fig.1 Capillary electropherogram of pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II) Marker 23

1-9. 34, 67, 110/111, 147, 190, 242, 331, 404, 489/501 bp; 10. internal standard.

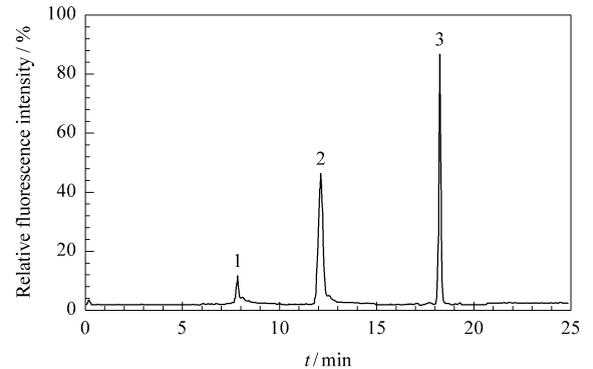


图 2 龟分枝杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物的毛细管电泳图  
Fig.2 Capillary electropherogram of the PCR product of *M. chelonae* subsp. *abscessus*

1. 76 bp; 2. 439 bp; 3. internal standard.

### 2.3 DNA 片段相对迁移时间的重现性

DNA 片段迁移时间的重现性是基因分析中的重要指标之一。在 DNA 的毛细管电泳研究中,我们对所研究的 DNA 片段的迁移时间重现性进行了考察。在待测试样中加入荧光试剂 kiton red 作为内标物,采用相对迁移时间以消除进样时间和电场的不稳定对迁移时间的影响。根据标记物和试样中 DNA 片段的相对迁移时间,可以确定待测试样中 DNA 片段的大小。在本实验的条件下,所测 pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II) Marker 23 的 DNA 片段的相对迁移时间具有很好的重现性,其相对标准偏差( $RSD$ ) $\leq 1.67\%$ 。分别对草分枝杆菌和龟分枝杆菌脓肿亚种临床分离株的 *Bst*E II 酶切产物进行了 3 次重复测定,其 DNA 片段相对迁移时间的  $RSD\leq 3.6\%$ 。

### 2.4 CE-LIFD 分析

对 8 种分枝杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物、*BstE* II 酶切产物和 *Hae* III 酶切产物分别进行了 CE-LIFD 分析,其中草分枝杆菌、龟分枝杆菌脓肿亚种临床分离株和蟾分枝杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物的 *BstE* II 酶切产物和 *Hae* III 酶切产物的毛细管电泳谱图见图 3 ~ 8。

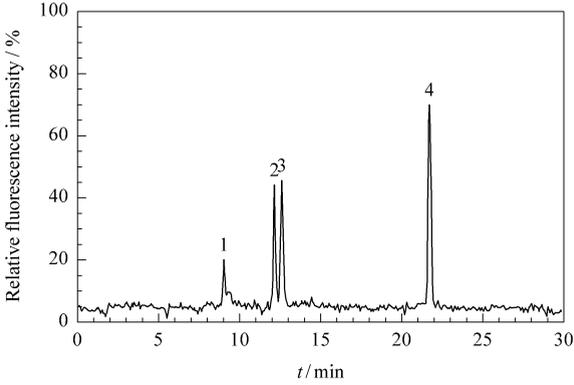


图 3 草分枝杆菌 *BstE* II 酶切产物的毛细管电泳图  
Fig.3 Capillary electropherogram of *M. phlei* DNA cleaved product by *BstE* II

1. 55 bp ; 2. 220 bp ; 3. 250 bp ; 4. internal standard.

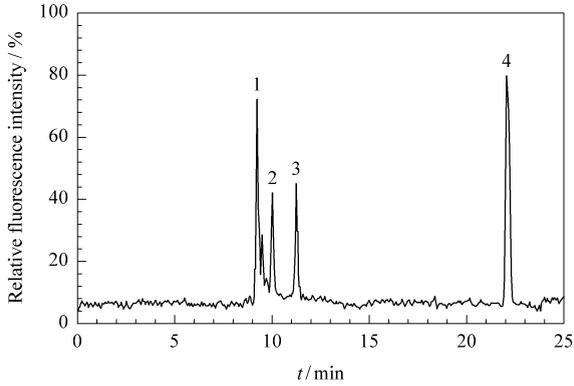


图 4 草分枝杆菌 *Hae* III 酶切产物的毛细管电泳图  
Fig.4 Capillary electropherogram of *M. phlei* DNA cleaved product by *Hae* III

1. 55 bp ; 2. 95 bp ; 3. 150 bp ; 4. internal standard.

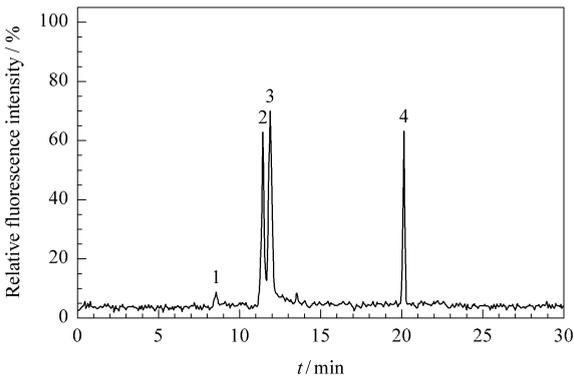


图 5 龟分枝杆菌脓肿亚种 *BstE* II 酶切产物的毛细管电泳图  
Fig.5 Capillary electropherogram of *M. chelonae subsp. abscessus* DNA cleaved product by *BstE* II

1. 50 bp ; 2. 190 bp ; 3. 215 bp ; 4. internal standard.

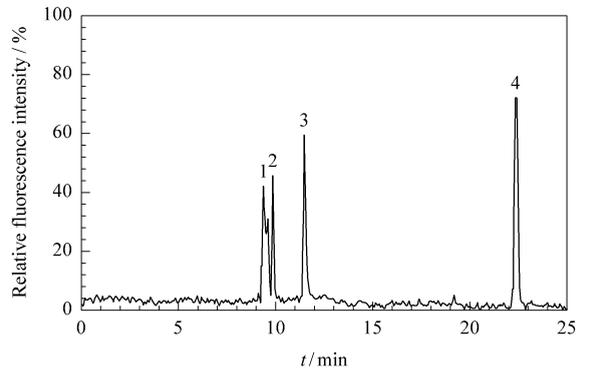


图 6 龟分枝杆菌脓肿亚种 *Hae* III 酶切产物的毛细管电泳图  
Fig.6 Capillary electropherogram of *M. chelonae subsp. abscessus* DNA cleaved product by *Hae* III

1. 55 bp ; 2. 80 bp ; 3. 150 bp ; 4. internal standard.

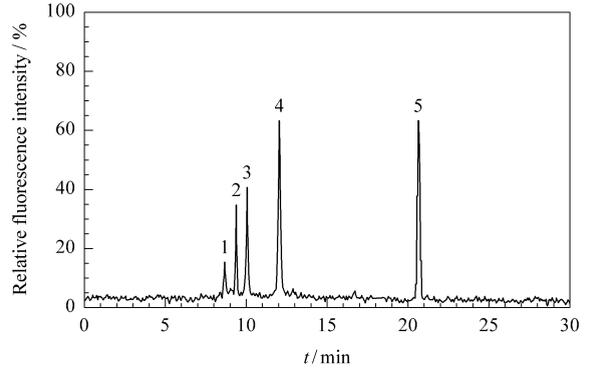


图 7 蟾分枝杆菌 *BstE* II 酶切产物的毛细管电泳图  
Fig.7 Capillary electropherogram of *M. xenopi* DNA cleaved product by *BstE* II

1. 50 bp ; 2. 85 bp ; 3. 110 bp ; 4. 210 bp ; 5. internal standard.

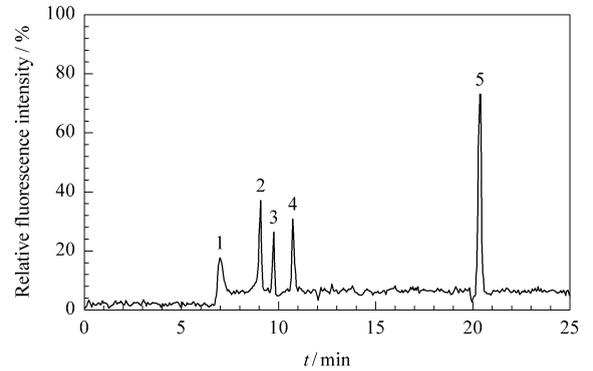


图 8 蟾分枝杆菌 *Hae* III 酶切产物的毛细管电泳图  
Fig.8 Capillary electropherogram of *M. xenopi* DNA cleaved product by *Hae* III

1. unknown ; 2. 85 bp ; 3. 115 bp ; 4. 167 bp ; 5. internal standard.

### 2.5 与 AGE 方法的比较

同时对草分枝杆菌、龟分枝杆菌脓肿亚种临床分离株和蟾分枝杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物、*BstE* II 酶切产物和 *Hae* III 酶切产物进行了 AGE 分离,其谱图见图 9 ~ 11,其中 pUC19DNA/*Msp* I (*Hpa* II) Marker 23 的片段从下至上同图 1 中 1 ~ 9 所示。

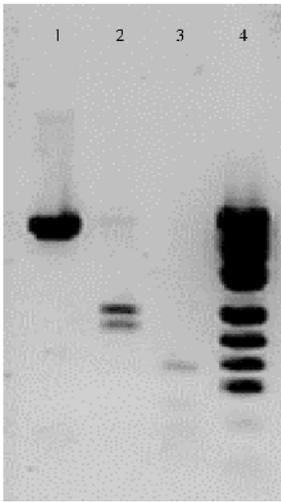


图 9 草分枝杆菌的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.9 Agarose gel electropherogram of *M. phlei*

1. PCR product : 439 bp ; 2. *BstE* II product : 250 bp , 220 bp ; 3. *Hae* III product : 150 bp , 80 bp ; 4. marker.

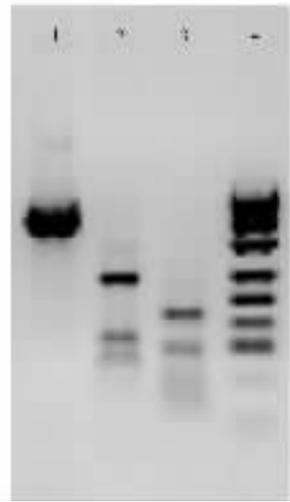


图 11 蟾分枝杆菌的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.11 Agarose gel electropherogram of *M. xenopi*

1. PCR product : 439 bp ; 2. *BstE* II product : 220 bp , 120 bp , 85 bp ; 3. *Hae* III product : 170 bp , 110 bp , 75 bp ; 4. marker.

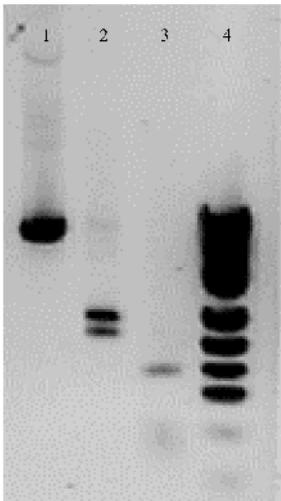


图 10 龟分枝杆菌脓肿亚种的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.10 Agarose gel electropherogram of *M. chelonae* subsp. *abscessus*

1. PCR product : 439 bp ; 2. *BstE* II product : 230 bp , 200 bp ; 3. *Hae* III product : 150 bp , 65 bp ; 4. marker.

通过对 CE 和 AGE 谱图的比较可知,用这两种方法得到的分枝杆菌 DNA 的限制性酶切谱图具有可比性。两种方法得到的分枝杆菌 DNA 的 PCR 扩增产物的片段是一致的,限制性酶切谱图的指纹条带形状基本相同,但是对酶切后的 DNA 片段大小确定有一定的差异,有时可能相差 10 ~ 15 bp,其原因可能是两种方法对 DNA 片段的鉴别能力不完全相同所致。虽然 AGE 是分离 DNA 片段的常用手段,但限于凝胶的长度(一般不超过 15 cm)和施加的电泳电压低,某些大小相近的片段不能较好地分离,因此根据所用的标记物和限制性酶切谱图确定 DNA 片段大小时,误差较大。CE 中所用的毛细管

通常为数十厘米,同时采用了上万伏的电压,能更有效地分离差异较小的片段,并能在较短的时间内完成分析。本实验中,在试样中加入内标物,采用相对迁移时间消除了进样时间和电场不稳定的影响,在确定试样中 DNA 片段时更为准确,对于 AGE 不能检出的小片段也能鉴定,能有效地用于分枝杆菌基因的限制性酶切谱图分析。

### 3 结论

本文以分枝杆菌的 DNA 为研究对象,采用 CE-LIFD 检测了多种分枝杆菌 hsp65 基因 PCR 产物的限制性内切酶产物的特征电泳谱图,建立了分枝杆菌的快速、可靠的鉴定方法。本方法能在 24 min 内完成 PCR 产物酶切片段的分离,得到不同分枝杆菌各自特异的 DNA 酶切谱图,可用于分枝杆菌的种属鉴别研究。

### 参考文献:

- [1] Stebbins M A , Schar C R , Peterson C B , Sepaniak M J. J Chromatogr B , 1997 , 697 : 181
- [2] Armstrong D W , Schneiderheinze J M. Anal Chem , 2000 , 72 : 4 474
- [3] Telenti A , Marchesi F , Frank B , Balz M , Bally F , Bottger E C , Bodmer T. J Clin Microbiol , 1993 , 31 : 175
- [4] He Xiaoling , Pan Huike , Zhou Xin , Mei Guohua , Lü Min , Lu Minxiang , Liu Fang. Chinese Journal of Microbiology and Immunology (贺小玲,潘慧可,周新,梅国华,吕民,鲁敏翔,刘芳.中华微生物学与免疫学杂志), 1998 , 18(4) : 318
- [5] Li Y Q , White J , Stokes D , Sayler G , Sepaniak M. Biotechnol Prog , 2001 , 17(2) : 348