

利用反向 PCR 方法扩增细菌热激蛋白 HSP60 基因*

蹇文婴 东秀珠**

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:利用 PCR 简并引物扩增出 HSP60 基因中一段约 600bp 的核心片段,将该核心片段标记为探针,与基因组 DNA 进行 Southern 杂交,选择出适宜的限制性内切酶,以便消化基因组 DNA 得到大小合适的、含有 HSP60 基因的酶切片段。将酶切片段自身环化后作为模板进行反向 PCR,引物的延伸方向自核心片段出发延环化分子向未知序列区进行,可扩增出核心区上下游的序列。应用该方法,扩增并测定了寓齿双歧杆菌(*Bifidobacterium denticolens*) DSM10105^T、奇异双歧杆菌(*Bifidobacterium inopinatum*) DSM10107^T 和阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*) ATCC14018^T 的 HSP60 全基因序列及青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*) JCM1275^T 98% 以上的 HSP60 全基因序列。结果表明,反向 PCR 方法可有效的扩增细菌 HSP60 基因。

关键词: 反向 PCR, 热激蛋白 HSP60, 双歧杆菌, 加德纳氏菌

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2002) 01-0056-06

HSP60 (Heat Shock Protein 60) 属于热激蛋白家族。热激蛋白广泛存在于真核生物细胞器及细菌中,其功能是帮助蛋白质肽链折叠成正确的构象。当有机体受到理化刺激时,热激蛋白的表达会进一步增强。由于热激蛋白的结构和功能保守,近年来,其分子序列常被用来研究生物的系统进化^[1-2]。HSP60 家族的所有成员,不论属于真核生物还是原核生物,其分子中均有两段、各八个氨基酸十分保守,分别是 GDGTTATV 和 AVKAPGFGD。Rusanganwa 根据该特点设计了一对简并 DNA 引物: 5'-GGNGAYGGNACNAC-NACNGCNACNGT3', 其中 N = A、T、C 或 G, Y = C 或 T; 5'-TCNCCRAANCCNG-GNGCYTTNACNGC-3', 其中 R = A 或 G。利用上述引物,通过 PCR 扩增、克隆、测序可以得到 HSP60 基因(共 1620bp 左右)中 250 ~ 840bp 处的核酸序列^[3]。如何从这段已知序列的核心区(core region)向上游和下游步移,是 HSP60 全基因克隆的中心问题。经典的方法是利用鸟枪法构建基因组 DNA 文库,再用核心区作为探针筛选该基因文库,便可得到含有核心区及其上下游序列的克隆。但该方法工作量大,效率也较低。

反向 PCR (Inverse PCR) 的基本原理如下^[4]: 用适宜的限制性内切酶消化基因组 DNA, 再将消化产生的片段自身环化; 以环化后的片段作为模板, 用一对与核心区两侧互补的引物进行 PCR, 引物的延伸方向是从核心区出发, 沿环状分子向两侧的未知序列区进行。将反向 PCR 产物进行克隆和测序, 就可得到核心区上下游的序列^[4-5]。

为了研究双歧杆菌(*Bifidobacterium*) 及加德纳氏菌(*Gardnerella*) 等有关细菌的系统进

* 国家自然科学基金资助项目(30070001)

** 通讯作者

作者简介: 蹇文婴(1975—), 女, 甘肃兰州人, 中国科学院微生物研究所 98 级硕士研究生。

收稿日期: 2001-02-14, 修回日期: 2001-05-20

化,本实验室在已获得 HSP60 基因核心区序列的基础上^[6],采用反向 PCR 对 3 株双歧杆菌和 1 株加德纳氏菌的 HSP60 基因全序列进行了扩增、克隆和序列测定,结果证明,该方法可有效地扩增细菌的 HSP60 全基因序列。

1 材料和方法

1.1 菌株

实验中的双歧杆菌和加德纳氏菌菌株及其 HSP60 核心区的 GenBank 序列号见表 1。

表 1 供试菌株及其 HSP60 核心区 GenBank 序列号
Table 1 Bacterial strains and HSP60 core region accession numbers

Bacterial strains	Suppliers	Accession No. of HSP60 core region sequences
<i>Bifidobacterium denticolens</i> DSM10105 ^T	DSMZ	AF240565
<i>Bifidobacterium inopinatum</i> DSM10107 ^T	DSMZ	AY004281
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> JCM1275 ^T	JCM	AF210319
<i>Gardnerella vaginalis</i> ATCC14018 ^T	ATCC	AF240579

1.2 Southern blot

利用不同的限制性内切酶消化基因组 DNA,以 HSP60 核心区的序列作为探针与酶切产物进行 Southern 杂交,根据杂交结果选择能够切出含有核心区且长度为 3 ~ 5kb 的酶切片段的限制性内切酶,利用此内切酶消化基因组 DNA 以产生反向 PCR 的模板片段。

首先,用 PCR 方法合成地高辛标记的 HSP60 核心区片段:用含有 HSP60 核心区的 pUCm-T 质粒作为模板,其浓度为 1ng/ μ L;正反向简并引物^[3]由上海生工公司合成,浓度皆为 2pmol/ μ L;dNTP 各 100pmol/ μ L;DIG-11-dUTP 120pmol/ μ L。PCR 扩增条件如下:94℃预变性 5min,随后进行 30 个循环:94℃,30s;55℃,30s;72℃,1min;72℃保温 10min。PCR 过程中,DIG-11-dUTP 代替 dTTP 掺入新合成的 DNA 链,形成地高辛标记的 HSP60 基因核心区片段。电泳检测 PCR 结果,PCR 产物不需进一步纯化,可直接作为探针使用。

菌株培养及 DNA 提取均按文献[7]进行。选择限制性内切酶对 DNA 消化,酶切及 DNA 片段的转移按文献[8]进行。限制性内切酶均由六合通公司提供;用地高辛标记系统(Boehringer Mannheim,德国)进行膜杂交和显色反应,按产品说明书进行操作。

1.3 基因组 DNA 的酶切

通过 Southern blot 确定合适的内切酶之后,用常规方法消化染色体 DNA。5 μ g DNA 用限制性内切酶消化完全后,用苯酚、氯仿各抽提一次,无水乙醇沉淀,溶于 20 μ L 无菌的去离子水中。电泳分离后与标准分子量比较估计其浓度。

1.4 酶切片段的自身环化

取大约 200ng 消化了的总 DNA 进行自身环化连接反应。体系中总 DNA 浓度约为 2ng/ μ L;T4 ligase(MBI Fermentas,上海生工公司代理)浓度为 0.08U/ μ L。连接反应在 10℃ ~ 12℃下进行 24 ~ 48h。

1.5 反向 PCR

将连接反应体系置 65℃水浴中 10min,终止连接反应。用 UNIQ-5 DNA 柱式回收试剂盒(上海生工公司)将 DNA 回收到 20 μ L 无菌的去离子水中。实验中所用引物及有关 PCR

条件见表 2。取 1 μ L 回收产物作为模板进行反向 PCR 反应,其中引物浓度各为 1 pmol/ μ L。反向 PCR 扩增条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,随后进行 30 个循环:94 $^{\circ}$ C, 30 s;复性温度(见表 2)下 30 s;72 $^{\circ}$ C 下延伸,延伸时间见表 2;完成循环后在 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。

1.6 反向 PCR 产物的克隆及测序

电泳分离反向 PCR 产物后,将其条带切胶后用 UNIQ-5 DNA 柱式回收试剂盒回收,与 pUCm-T 连接并转化大肠杆菌菌株 DH5 α ,操作按 pUCm-T 说明书及文献[8]进行。通过蓝白斑筛选及 PCR 筛选,选出阳性克隆进行测序。序列测定在六合通公司进行。测得序列在 GenBank 数据库中进行比较后,确定为 HSP60 基因片段。有时一次反向 PCR 不能获得 HSP60 全基因序列,须进行第二次反应。将两次获得的基因片段拼接得到的全序列录入 GenBank,各个序列分别是各自核心区的更新版本,序列号不变。

2 结果和讨论

2.1 限制性内切酶的选择

为了获得含有 HSP60 全基因且适合于 PCR 反应的 DNA 片段,须选择合适的限制性内切酶。其标准是,首先所选择的内切酶在核心区中不应有切点;其次是产生的酶切片段长度除核心区以外的部分不应超过 5 ~ 6 kb。通过用核心区作为探针和酶切片段进行 Southern 杂交,确定含核心区的酶切片段的大小并选择出适合于不同菌株 DNA 的限制性内切酶。

2.2 反向 PCR 扩增 HSP60 基因

以上述酶切的 DNA 环化产物为模板进行反向 PCR。连接酶切片段时,注意反应条件要有利于形成自身环化分子。反应体系中 DNA 的浓度一般为 1 ~ 2 ng/ μ L;反应温度为 10 $^{\circ}$ C ~ 12 $^{\circ}$ C,低于常规的连接温度 16 $^{\circ}$ C。本研究在 4 株细菌的 HSP60 基因核心区序列已完成的基础上^[6],设计了各自序列特异的反向 PCR 引物(表 2)。由于各个引物 GC 含量不同,因而其反向 PCR 的复性温度高低不一;另外由于酶切片段长度不同,反向 PCR 的延伸时间也有所不同。不同菌株的 HSP60 基因反向 PCR 扩增条件和结果列在表 2。进行反向 PCR 时,应该同时进行对照实验,即用被内切酶消化但未环化的染色体 DNA 作为模板,以便观察模板环化后新出现的 PCR 产物。对于菌株 DSM10107^T、JCM1275^T 和 ATCC14018^T,在第一次反向 PCR 得到的序列经过与核心序列拼接后,仍没有得到完整的 HSP60 基因序列,因而又以第二种内切酶的酶切 DNA 片段为模板,并利用在第一次反向 PCR 中得到的已知序列设计第二次反向 PCR 引物,或直接利用第一次反向 PCR 的引物,进行第二次反向 PCR,继续向上下游步移。

2.3 HSP60 全基因的测序结果

通过对双歧杆菌不同菌株和加德纳氏菌 DNA 酶切片段的 Southern 杂交,选择出了能够得到寓齿双歧杆菌、奇异双歧杆菌、青春双歧杆菌和加德纳氏菌 HSP60 全基因的内切酶,结果见表 2。对于寓齿双歧杆菌 DSM10105^T,利用 *Eco*RI 酶切基因组 DNA 后进行反向 PCR,便得到了含 HSP60 基因核心区的完整上下游的 3.4 kb 片段,结果见图 1。由于核心区上下游的序列未知,选择限制性内切酶均具有随机性,因而往往不能在第一次反向 PCR 中就得到所需的全基因序列。本实验对奇异双歧杆菌 DSM10107^T、青春双歧杆菌

JCM1275^T 和加德纳氏菌 ATCC14018^T 均选择了第二种限制性内切酶,分别是 *EcoRV*、*PvuII* 和 *DraI*(表 2)。

表 2 对于不同菌株所选择的限制性内切酶、反向 PCR 条件及扩增的 HSP60 基因长度^{*}

Table 2 Restriction enzymes, inverse PCR parameters and amplified HSP60 gene length of different strains

Bacterial strain	Restriction enzyme	Forward primer		Reverse primer	
DSM10105 ^T	(1) <i>EcoRI</i>	F425 5'-TCCAGTCAGCAGGACATCGTTCA-3'		R79 5'-CGAGCCAGAGGTCACGTTCTTCA-3'	
DSM10107 ^T	(1) <i>PvuII</i>	F423 5'-TTCCAGCCAGCAGGATATTGTTTACA-3'		R51 5'-CCTCAGCCCTTCATGGACCAGAGACT-3'	
	(2) <i>EcoRV</i>	F423 5'-TTCCAGCCAGCAGGATATTGTTTACA-3'		R51 5'-CCTCAGCCCTTCATGGACCAGAGACT-3'	
JCM1275 ^T	(1) <i>PstI</i>	F510 5'-CGAGGCTCTGCCGACCCTGATT-3'		R124 5'-GCTGCGACGAGTTCTTGACGAT-3'	
	(2) <i>PvuII</i>	F955 5'-CTGCCGACCCTGATTCTGAACAACAT-3'		R218 GCTTCGTCGTCATATGCAATCATCTTTG-3'	
ATCC14018 ^T	(1) <i>EcoRV</i>	F472 5'-GGTAAGGCCATTGCTCATT-3'		R46 5'-CATTCTTAAGCCTTCGCTG-3'	
	(2) <i>DraI</i>	F1803 5'-CGAGGAGGGTTTGCTTCCAGGCGGTG-3'		R123 5'-CTTCCAGCTTCTTGACGTGCATGAC-3'	
Bacterial strains	Restriction enzyme	Annealing temperature /℃	Extension Time /min	IPCR Products Size /kb	Sequencing results of IPCR products
DSM10105 ^T	* (1) <i>EcoRI</i>	58.2	3.0	3.0	Complete upstream and downstream flanking HSP60 gene core region
DSM10107 ^T	(1) <i>PvuII</i>	57.9	3.5	3.5	Complete upstream flanking HSP60 gene core region and downstream till position 1264bp
	(2) <i>EcoRV</i>	57.9	5.0	5.5	Complete downstream flanking HSP60 gene core region
JCM1275 ^T	(1) <i>PstI</i>	61.6	3.0	3.2	Complete upstream flanking HSP60 core region and downstream till position 1102bp
	(2) <i>PvuII</i>	58.7	5.0	4.2	From position 769bp to 1597bp of HSP60 gene
ATCC14018 ^T	(1) <i>EcoRV</i>	51.1	1.0	1.5	Complete upstream flanking HSP60 core region and downstream till position 1377bp
	(2) <i>DraI</i>	55.9	1.0	1.1	Complete downstream of HSP60 gene from position 1215bp

* (1)&(2) The complete HSP60 gene sequences were obtained by running inverse PCR procedures for twice.

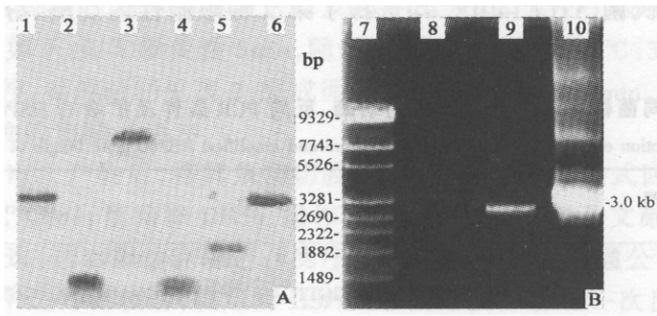


图1 离齿双歧杆菌 DSM10105^T 的 Southern blot 及反向 PCR 产物的电泳图

Fig.1 Southern Blot and inverse PCR of *B. denticolens* DSM10105^T

A. Southern blot; B. Inverse PCR products gel electrophoresis.

1-5. Genome DNA digested with *EcoRI*, *EcoRV*, *PvuII*, *EcoRV* + *PvuII*, *PstI*; 6. pUCm-T with HSP60 core region sequence digested with *EcoRI*; 7. DNA standard (λ DNA/pUC Mix, MBI); 8. Inverse PCR result of genome DNA digested with *EcoRI*; 9. Inverse PCR result of genome DNA digested with *EcoRI* and self-circularized, the 3.0kb band is the desired inverse PCR product; 10. PCR product of pUCm with 3.0kb fragment.

我们参照 Southern 杂交中含 HSP60 核心区的酶切片段大小来判断含有 HSP60 基因的反向 PCR 产物,通过一次或两次反向 PCR,获得了离齿双歧杆菌 DSM10105^T、奇异双歧杆菌 DSM10107^T 和阴道加德纳氏菌 ATCC14018^T 的 HSP60 全基因序列及青春双歧杆菌 JCM1275^T 98% 以上的 HSP60 全基因序列,长度分别为 1611bp、1614bp、1623bp 和 1597bp。其 GenBank 的序列号与其核心序列相同(表 1)。序列分析结果表明,3 株双歧杆菌和 1 株加德纳氏菌的 HSP60 基因(GroEL)均未和 HSP10 基因(GroES)连锁。

2.4 克隆 HSP60 基因的意义

HSP60 蛋白家族的成员广泛存在于各种生物中,近年来的研究表明 HSP60 蛋白是多种病原菌中主要的免疫抗原,这些病原菌包括麻风杆菌、伯氏立克次氏体、梅毒密螺旋体、嗜肺军团菌、布氏疏螺旋体等。另外,由于细菌与人体的 HSP60 具有同源性,而且 HSP60 有极强的免疫原性,细菌的 HSP60 会引起人类的自身免疫病^[3]。所以,克隆 HSP60 基因除可用于生物系统学研究外,还可为感染性疾病的预防、诊断、治疗及自身免疫病机制的研究提供手段。HSP60 具有分子伴侣的功能,克隆其基因并表达重组蛋白有助于研究其功能;另外,反向 PCR 方法也为其它已知中间序列基因的全序列分析提供了方便的手段。

参 考 文 献

- [1] Gupta R S. *Mol Microbiol*, 1995, 15(1): 1-11.
- [2] Viale A M, Arakaki A K, Soncini F C, et al. *Int J Sys Bacteriol*, 1994, 44(3): 527-533.
- [3] Rusanganwa E, Singh B, Gupta R S. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1992, 1130, 90-94.
- [4] Ochman H, Gerber A S, Hartl D L. *Genetics*, 1988, 120, 621-625.
- [5] 杨瑞馥, 吴卫星, 林万明. 未知序列的扩增. 见: 林万明主编. PCR 技术操作和应用指南. 北京: 人民军医出版社, 1995. 68-78.
- [6] Jian W, Zhu L, Dong X. *Int J Sys Evolution Microbiol*, 2001, 51(5): 1633-1638.

- [7] Dong X, Xin Y, Jian W, et al. *Int J Sys Evolution Microbiol*, 2000, **50**, 119 ~ 125.
- [8] Sambrook J, Frisch E F, Maniatis T 著(金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992.

Amplification of Bacterial Heat Shock Protein 60 Gene Using Inverse PCR Method *

Jian Wenying Dong Xiuzhu

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China*)

Abstract: A method is presented for rapid *in vitro* amplification of DNA sequences of bacterial HSP60 gene. In our previous work, using degenerate oligonucleotide primers for conserved regions of HSP60 gene, a 600bp fragment was amplified by PCR, cloned and sequenced. An inverse PCR method, with the primers oriented in the reversed direction of the usual orientation, is used to amplify the DNA sequences that flank the 600bp known region. The feasibility of this method is shown by amplifying the complete HSP60 gene sequences of 4 bacterial strains, namely *Bifidobacterium denticolens*, *Bifidobacterium inopinatum*, *Bifidobacterium adolescentis* and *Gardnerella vaginalis*.

Key words: Inverse PCR, Heat Shock Protein 60 Gene, Bifidobacteria, Gardnerella

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (30070001)