

荧光Cy5DNA扩增及酶切产物分离 - 检测

郑园霞¹, 张毅¹, 李雪刚¹, 刘亮伟^{1,2*}

¹河南农业大学, 生命科学学院, 河南 郑州

²农业部农业酶工程重点实验室, 河南 郑州

收稿日期: 2022年10月27日; 录用日期: 2022年12月22日; 发布日期: 2022年12月30日

摘要

dNTPs加入一定比例Cy5-dATP可以扩增荧光Cy5DNA, 用于T5外切酶(T5exo)类DNA酶检测, 关键是酶切产物分离 - 检测。[方法]本研究以1/1000 Cy5-dATP的dNTPs扩增5851 bp荧光Cy5DNA pET28a-xyn。基于纯化柱吸附DNA原理, 首先确定2倍P3缓冲液(2×P3)为纯化柱吸附DNA最小用量, 进而用纯化柱以2×P3分离Cy5DNA溶液、等量Cy5DNA经T5exo酶切反应液(Cy5DNA-T5exo), 分别得到洗脱液(含有Cy5DNA)和滤出液(含有酶切产物Cy5-dATP)。[结果]酶标仪定量检测显示, 含120 ng Cy5DNA洗脱液荧光值5824、滤出液0。含120 ng Cy5DNA-T5exo滤出液荧光值7573、洗脱液0。激光共聚焦显微镜定性检测显示, Cy5DNA洗脱液有荧光、滤出液无。Cy5DNA-T5exo滤出液有荧光、洗脱液无。定量和定性检测结果与纯化柱吸附DNA、滤出酶切产物原理和功能相同。进而分析了Cy5DNA浓度、Cy5-dATP浓度与荧光值的定量关系。[结论]荧光Cy5DNA成功扩增, 其酶切产物经纯化柱以2×P3成功分离, 为荧光DNA扩增和用于DNA酶活性检测奠定了基础。

关键词

荧光DNA扩增, 酶切产物, 纯化柱分离, 荧光检测

Amplification of Fluorescent Cy5DNA and Separation-Detection of Digestion Product

Yuanxia Zheng¹, Yi Zhang¹, Xuegang Li¹, Liangwei Liu^{1,2*}

¹School of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan

²The Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan

Received: Oct. 27th, 2022; accepted: Dec. 22nd, 2022; published: Dec. 30th, 2022

*通讯作者。

文章引用: 郑园霞, 张毅, 李雪刚, 刘亮伟. 荧光 Cy5DNA 扩增及酶切产物分离-检测[J]. 微生物前沿, 2022, 11(4): 241-250. DOI: 10.12677/amb.2022.114030

Abstract

[Objective] Amplified with dNTPs added with a specific ratio of fluorescent Cy5-dATP, fluorescent Cy5DNA can assay exonuclease such as T5 DNA exonuclease (T5exo), key is separation-detection of digestion product. **[Method]** Amplified with dNTPs added with 1/1000 Cy5-dATP, a 5851 bp fluorescent Cy5DNA pET28a-xyn served for T5exo digestion. Basing on DNA-absorbing principle of DNA-clean column, a 2-fold buffer P3 (2×P3) that of DNA solution was determined as the least quantity of a column to absorb DNA. Next, a DNA-clean column with 2×P3 served to separate a solution containing Cy5DNAs or equal amount of Cy5DNAs digested by T5exo to collect filtrate and elute, respectively. **[Result]** Assayed by a microreader SpectraMax® i3x, the filtrate and elute from 120 ng Cy5DNAs-T5exo solution had a fluorescence value of 7573 and 0, respectively. The elute and filtrate from 120 ng Cy5DNA solution had a fluorescence value of 5824 and 0, respectively. Assayed by a confocal microscope, the filtrate from Cy5DNA-T5exo solution exhibited Cy5-dATP fluorescence, while the elute did not. The elute from Cy5DNA solution exhibited Cy5 fluorescence, while the filtrate did not. Both the quantity and the quality assay were in agreement with the principle and usage of DNA-clean column. Additionally, correlation was analyzed for concentration of Cy5DNA and Cy5-dATP with fluorescence intensity. **[Conclusion]** Cy5DNA pET28a-xyn was amplified successfully, and its T5exo digestion product Cy5-dATP was separated by a DNA-clean column with a 2×P3 buffer. The study provided a basis for fluorescent DNA amplification and usage in assaying DNA-cutting enzyme.

Keywords

Fluorescent Cy5dna Amplification, Digestion Product, Column Separation, Fluorescence Detection

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

DNA 酶学性质涉及底物 DNA 和酶切产物核苷酸, 但是二者均难以检测, 所以 DNA 酶学性质研究的关键是酶切产物分离和检测。放射性标记 DNA 最早作为底物研究 DNA 酶活性, 经 DEAE-sephadex 吸附、NaCl-NaOAc/urea 缓冲液梯度洗脱, 通过检测酶切产物放射性探讨外切酶性质[1]-[6]。但是, 放射性标记 DNA 制备复杂而且危害健康[5] [6] [7]。此后, 荧光染料 PicoGreen、SYBR Green I、BEBO 用于 DNA 酶学性质研究[8] [9], 定量检测模板 DNA 拷贝数[8] [10] [11] [12]。但是, 荧光染料不能定量结合 DNA, 不是专一性染色酶分子底物, 所以特异性低。基于荧光淬灭 - 激发原理, 分子标记用于 DNA 多态性[13] [14]、定量 PCR [10] [11]、T4DNA 连接酶和 topoisomerase 酶学性质[15] [16]。特别是 Sanger 终止法测序使用荧光标记 ddNTPs [17] [18], 荧光素 Cy5-ATP 标记 double-stranded breaks 连接中间物用于激光共聚焦显微镜检测[19], 为荧光 DNA 扩增、用于酶学性质提供了新途径。

与荧光素 Cy5-ATP 类似, 荧光素 Cy5-dATP 在激发光 649 nm、发射光 675 nm 时显示红色荧光。dNTPs 中加入 Cy5-dATP 可以扩增荧光 Cy5DNA。根据目的 DNA 分子大小、DNA 链中 dA 碱基个数, 在 dNTPs 中加入一定比例 Cy5-dATP 可以在荧光 DNA 中加入定量荧光分子。这种荧光 Cy5DNA 扩增方便, 而且特异性修饰酶分子底物, 在酶学性质研究更加优越, 但是酶切产物分离 - 检测是关键。

酶切产物分离可以利用 DNA 纯化柱解决。其纯化原理是: DNA 溶液中加入 5 倍(×)体积 P3 缓冲液

调节溶液 pH 值和离子强度[20], 从而将 DNA 吸附在硅胶材料表面, 通过离心得到滤出液(含有 P3 及酶切产物)。而后纯化柱中央加入 30 μL TE 洗脱缓冲液, 改变硅胶材料 pH 值和离子强度, 从而将吸附 DNA 重新溶解在 TE 缓冲液中, 通过离心得到洗脱液(含有 DNA)。这种原理可以分离酶切产物和底物。

本研究基于上述设想, 以加入 1/1000 Cy5-dATP 的 dNTPs 扩增 5851 bp 荧光 Cy5DNA pET28a-xyn (xyn 为黑曲霉 GH11 木聚酶基因) [21], 用于 T5 DNA 外切酶(T5exo)酶切反应。首先探讨纯化柱截留 DNA 所需 P3 缓冲液的最小用量, 进而分离 Cy5DNA 溶液、Cy5DNA-T5exo 反应液, 分别得到洗脱液(含有 Cy5DNA) 和滤出液(含有酶切产物 Cy5-dATP), 通过酶标仪、激光共聚焦显微镜定量、定性检测, 为荧光 Cy5DNA 扩增、用于 DNA 酶学性质研究奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

Cy5-dATP (母液浓度 1 mM)来自于 Thermo Fisher Scientific, 高保真 Q5 DNA 聚合酶, dNTPs, T5 DNA 外切酶(T5exo)来自于 NEB, 正向引物 JFV2810 (CAGCCATATGATGAGTGCCG)、反向引物 JRV2812 (CATATGGCTGCCGCGCGGCACC, 下划线表示正、反向引物间有 10 bp 同源)、DNA 回收试剂盒来自于上海生物工程公司。5851 bp 质粒 pET28a-xyn (黑曲霉 GH11 木聚酶基因)由本实验室构建[21]。

2.2. 荧光 Cy5DNA 的扩增

5851 bp 线性 LDNA pET28a-xyn 扩增: 取 1 μL 10 ng/ μL pET28a-xyn 模板质粒, 25 μM 正向引物 JFV2810、2.5 μM JRV2812, 1U Q5 DNA 聚合酶, 1 μL 10 mM dNTP Mix (终浓度 200 μM), 10 μL Q5 DNA 聚合酶 buffer, 以水补足 50 μL 。以双退火程序扩增 LDNA [22]: 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 74 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 61 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 28 个循环, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增 60 管共 3000 μL PCR 产物, 利用大量 - 高纯 - 高浓度 DNA 的制备方法[23], 在 1.55 g/mL 氯化铯 0.2 mg/mL EB 溶液中经 76000 rpm 密度梯度离心 6 h 纯化并回收 LDNA, 用 Nanodrop 1000 检测浓度(Thermo scientific)。

荧光 Cy5DNA pET28a-xyn 扩增: 取 1000 ng LDNA pET28a-xyn (2.53×10^{-4} nmol)为模板, 以 25 μM JFV2810 扩增 F 链荧光 Cy5DNA, 1U Q5 DNA 聚合酶, 1 μL 10 mM dNTP Mix (终浓度 200 μM), 1 μL 10 μM Cy5-dATP (母液稀释 100 倍达到 10 μM), 10 μL Q5 DNA 聚合酶 buffer, 以水补足 50 μL 反应体系。因为 PCR 体系中有 1 μL 10 mM 的 dATP, 则 Cy5-dATP:dATP 比值为 1:1000。PCR 程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 74 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 18 个循环, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增 30 管共 1500 μL PCR 产物, 利用大量 - 高纯 - 高浓度 DNA 的制备方法[23], 纯化并回收 Cy5DNA, 用 Nanodrop 1000 检测浓度。

2.3. 纯化柱截留 DNA 所需 P3 缓冲液最小用量

检测纯化柱截留 DNA 所需 P3 缓冲液最小用量。按照纯化柱操作说明[20], 含 120 ng LDNA 的溶液, 调整体积为 100 μL , 分别加入溶液体积 1~5 倍(\times)的 P3 缓冲液, 混匀后加入纯化柱中央, 8000 g 离心 30 s 分离得到滤出液(含有核苷酸), 而后在柱中央加入 500 μL 洗涤缓冲液, 9000 g 离心 30 s, 并重复一次, 而后将纯化柱放入新 EP 管中, 柱中央加入 30 μL TE 缓冲液, 9000 g 离心 1 min 洗脱得到 25 μL DNA 洗脱液(含有 DNA)。用 Nanodrop 检测滤出液和洗脱液 DNA 含量和纯度指标, 而后电泳检测洗脱液和滤出液 DNA 条带。

2.4. 荧光 Cy5DNA 酶切反应纯化柱分离

Cy5DNA-T5exo 酶切反应: 10 μL 切割反应体系中加入 360 ng 荧光 Cy5DNA (9.3×10^{-5} nmol), 加入

1 μL T5exo (10 U), 1 \times T5exo buffer, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切反应 30 min。阴性对照与酶切反应相同, 只是加入 120 ng 荧光 Cy5DNA (3.1×10^{-5} nmol), 保温完成后加入 1 μL (10 U)热失活 T5exo (10% SDS 条件下 98 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min), 而后相同条件下定量检测反应液荧光值。

根据纯化柱截留 DNA 所需最小用量 2 \times P3, 将 Cy5DNA-T5exo 反应液调整为 100 μL 体积, 以 2 \times P3 (200 μL)柱分离, 并重复一次, 加水补足 600 μL 滤出液, 则每 200 μL 滤出液对应 120 ng Cy5DNA 酶切产物。柱中央加入 30 μL TE 洗脱液, 得到 25 μL 洗脱液加水补足 200 μL 。

含 120 ng 荧光 Cy5DNA 的溶液调整体积为 100 μL , 以 2 \times P3 柱分离得到 600 μL 滤出液、25 μL 洗脱液加水补足 200 μL 。酶切产物经过柱分离后得到 600 μL 滤出液, 每 200 μL 滤出液相当于 120 ng 荧光 Cy5DNA。

为探讨 P3 对荧光值影响, 直接以 P3 进行 2 \times P3 柱分离得到 600 μL 滤出液、25 μL 洗脱液, 加水补足 200 μL 。

2.5. 酶标仪检测 Cy5 荧光

分别将样品通过 2 \times P3 柱分离得到的 600 μL 滤出液、200 μL 洗脱液加入 200 μL 标准黑色酶标板, 以水作为空白对照。以 SpectraMax[®] i3x 酶标仪定量检测样品荧光值(Molecular Devices, Thermo Fisher Scientific), 因为 Cy5dATP 为红色荧光, 动态方式检测时激发光和发射光波长相差必须大于 24 nm, 所以选择 649 nm 激发光、675 nm 发射光检测, 每 30 s 采集一次数据, 共采集 21 次荧光值平均。

用 IBM SPSS Statistics 软件分析各样品荧光值数据显著性, 选用软件中“分析” \rightarrow “比较均值” \rightarrow “单因素 ANOVA”, “两两比较”, 选择“LSD (L)、Tukey s-b (K)和 Waller-Duncan”参数(Duncan's multiple range test, $P < 0.05$), 将各样品分为显著性差异的不同组。

检测 Cy5DNA 与荧光值定量关系时, 分别取含有 60、120、500 ng Cy5DNA 的溶液在 200 μL 体系中检测荧光值, 将荧光值与 Cy5DNA 浓度(nM)拟合得到线性回归方程, 可以通过荧光值计算底物 Cy5DNA 浓度(nM)。

检测 Cy5-dATP 与荧光值定量关系时, 分别取 0.1、0.2、0.4、0.5、0.7、0.9 (0.1~0.9) nM Cy5-dATP 检测荧光值, 将荧光值与 Cy5-dATP 浓度(nM)拟合得到线性回归方程, 可以通过荧光值计算酶切产物 Cy5-dATP 浓度(nM)。

2.6. 激光共聚焦显微镜检测 Cy5 荧光

定性检测样品荧光时, 先以 70%乙醇溶液超声处理 10 min 载玻片和盖玻片, 镊子取出玻片置于擦镜纸晾干。从酶标仪检测后的滤出液和洗脱液中, 分别取出 5 μL 样品滴加到载玻片上, 镊子夹住盖玻片倾斜覆盖液体, 避免气泡产生。以 A1R HD25 激光共聚焦显微镜(Nikon Corporation, Japan), 选择 638 nm 处检测 Cy5-dATP 样品荧光。

3. 结果与分析

3.1. 荧光 Cy5DNA 的扩增

荧光 Cy5DNA 扩增如图 1 (上)所示: 先以 pET21a-xyn 质粒为模板、dNTPs 为底物、JFV2810 和 JRV2812 为引物反向 PCR 扩增全长 5851 bp 线性 LDNA。而后以 LDNA 为模板、JFV2810 引物、加入 1/1000 Cy5-dATP 的 dNTPs 为底物扩增荧光 Cy5DNA。而后, Cy5DNA 经 T5exo 酶切, 经 DNA 纯化柱分离得到酶切产物, 进而经酶标仪、激光共聚焦显微镜检测。

对于 PCR 扩增产物, 经过大量 - 高纯 - 高浓度 DNA 制备, 分离纯化后共得到 74214 ng 浓度 111.1

ng/ μ L 的 LDNA, 分离纯化得到 39030 ng 浓度为 130.1 ng/ μ L 荧光 Cy5DNA, 电泳检测得到 5851 bp 的 LDNA (图 1 下 1、2) 和 Cy5DNA 条带(图 1 下 3、4)。

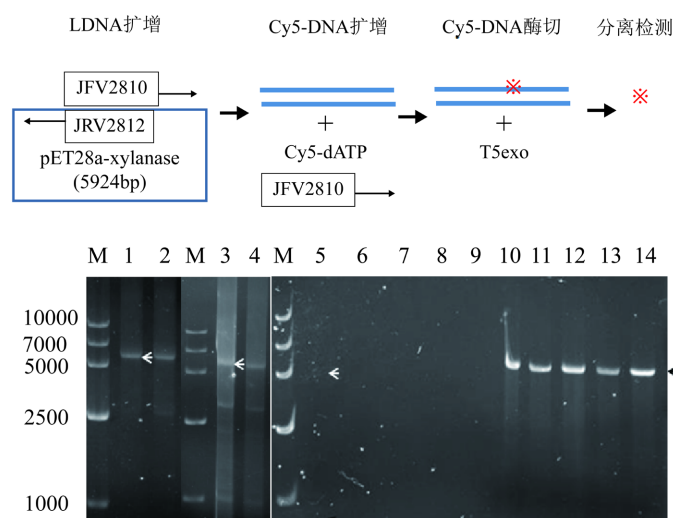


Figure 1. Amplification and electrophoresis of Cy5DNA. (up) LDNA and Cy5DNA were amplified, digested by T5 DNA Exonuclease, separated by DNA-clean column, and assayed by con-focal microscope and microplate reader. (down) Electrophoresis of Cy5DNA and LDNA recovered by DNA-clean column. M: DNA Marker VI, 1~2: linear DNA, 3~4: fluorescent Cy5DNA, 5~9: filtrate from column with 1~5 \times P3 buffer recovery of LDNA, 10~14: elution from column with 1~5 \times P3 buffer recovery of LDNA

图 1. Cy5DNA 扩增及电泳(上) Cy5DNA 扩增模式: 依次扩增线性 LDNA、荧光 Cy5DNA, 经 T5exo 酶切, 纯化柱分离、检测(下)纯化柱截留 DNA 电泳, M: DNA marker VI, 1~2: 线性 LDNA, 3~4: 荧光 Cy5DNA, 5~9: 1~5 \times P3 缓冲液柱回收 LDNA 的滤出液, 10~14: 1~5 \times P3 缓冲液柱回收 LDNA 的洗脱液

5851 bp LDNA 正链有 1374 个 dA (23.5%)、1388 个 dT (23.7%)、1583 个 dC、1506 个 dG 碱基, 在扩增荧光 Cy5DNA 时加入 1/1000 Cy5-dATP 的 dNTPs, 则每个荧光 Cy5DNA 分子中引入 1.374 分子 Cy5-dATP, 这种荧光分子是随机插入这 1374 个位置的, 引物位置除外。

3.2. 纯化柱截留 DNA 所需最少用量的 P3 缓冲液

基于 DNA 纯化柱回收 DNA 原理, 理论上 DNA-T5exo 酶切产物随 P3 缓冲液进入滤出液, 未酶切 DNA 截留在洗脱液。与纯化柱以 5 \times P3 回收 DNA 目的不同[19], 分离酶切产物时要减少 P3 的稀释作用, 所以要探讨截留 DNA 所需 P3 最少用量。取 LDNA 溶液调整为 100 μ L 体积, 分别加入 1、2、3、4、5 倍体积的 P3 (1~5 \times P3), 按照纯化柱说明书回收 LDNA [20], 分别得到滤出液和洗脱液, Nanodrop 检测 DNA 浓度, 分析 1~5 \times P3 用量截留 LDNA 效果, 从而得到截留 DNA P3 最小用量。

Nanodrop 检测 DNA 浓度表明, 纯化柱以 2 \times P3 回收 LDNA 时, 洗脱液 DNA 浓度为 6.8 ng/ μ L, A260/A230 指标为 1.94, 4 \times P3 洗脱液 A260/A230 指标 2.44, 均接近于核酸纯度指标 2 (表 1)。2 \times P3 滤出液有微量 DNA, 但其 A260/A230 纯度指标只有 0.28, A260 只有 0.03, 接近 3~4 \times P3 滤出液 DNA 浓度 (1.77~1.99 ng/ μ L), 3 \times P3 滤出液 A260 为负值, 5 \times P3 滤出液 DNA 浓度为负值, 说明滤出液 DNA 是碳水化合物污染的误差。所以, 2 \times P3 是纯化柱截留 LDNA、稀释酶切产物最小用量。

电泳检测显示, 2 \times P3 滤出液没有 DNA 条带(图 1, 6), 而 1 \times P3 滤出液有微量 DNA 条带(图 1, 5), 而且 1~5 \times P3 洗脱液 DNA 含量接近(图 1, 10~14)。与其它泳道不同, M 和 10 泳道边缘出现拖尾现象, 可能因为 5~9 泳道滤出液中带有清洗缓冲液, 其中异丙醇有展开剂作用。电泳检测与 Nanodrop 结果相同, 显示 2 \times P3 纯化柱是截留 DNA、分离酶切产物的最少用量。

Table 1. Column recovery of LDNA by 1~5×P3**表 1.** 1~5×P3 柱回收线性 DNA

处理: F 滤出液、 E 洗脱液 Item, F: filtration, E: elution.	浓度 Concentration (ng/μL)	纯度指标 A260/A280	纯度指标 A260/A230	核酸 A260
1 × F	4.8	1.99	0.94	0.10
2 × F	1.7	1.78	0.28	0.03
3 × F	1.9	1.81	-1.78	0.04
4 × F	1.3	1.90	0.19	0.10
5 × F	-0.7	-1.21	0.12	-0.01
1 × E	9.8	1.74	2.08	0.20
2 × E	6.8	1.44	1.94	0.14
3 × E	10.1	1.82	2.07	0.20
4 × E	6.7	1.92	2.44	0.13
5 × E	9.4	2.01	2.83	0.19

3.3. P3 缓冲液不影响荧光值

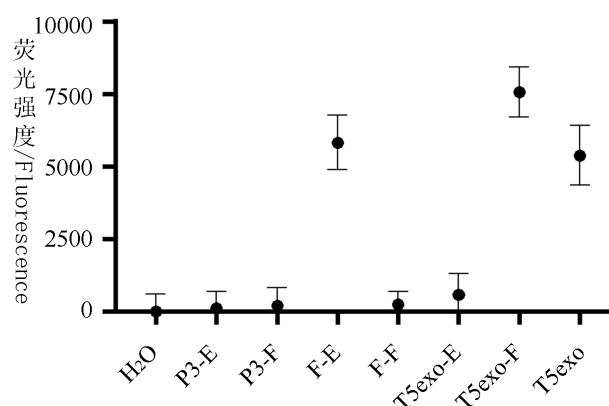


Figure. 2 Fluorescence value measured in quantity. H₂O: blank control water, P3-E: P3 elute, P3-F: P3 filtrate, F-E: elute from Cy5DNA solution, F-F: filtrate from Cy5DNA solution, T5exo-F: filtrate from Cy5DNA-T5exo digestion, T5exo-E: elute from Cy5DNA-T5exo digestion, T5exo: Cy5DNA-T5exo digestion, a (H₂O, P3-E, P3-F, F-F, T5exo-E), b (F-E, T5exo), c (T5exo-F): groups with significant difference to each other (Duncan's multiple range test, $P < 0.05$)

图 2. 定量检测荧光值。H₂O: 空白对照水, P3-E: 2×P3 经柱回收的洗脱液, P3-F: 2×P3 经柱回收的滤出液, F-E: Cy5DNA 溶液经柱回收的洗脱液, F-F: Cy5DNA 溶液经柱回收的滤出液, T5exo-F: T5exo-Cy5DNA 经 2×P3 柱回收滤出液, T5exo-E: T5exo-Cy5DNA 经 2×P3 柱回收洗脱液, T5exo: T5exo-Cy5DNA 反应液, a (H₂O、P3-E、P3-F、F-F、T5exo-E), b (F-E、T5exo), c (T5exo-F): 组间显著性差异(Duncan's multiple range test, $P < 0.05$)

纯化柱需要 2×P3 缓冲液截留 DNA、分离酶切产物, *i.e.*, 有 2×P3 通过纯化柱滤出到酶切产物中, 所以需要探讨 P3 对酶切产物荧光值的影响。以纯化柱单独分离 P3 分别得到洗脱液和滤出液, 酶标仪定量检测显示 P3 洗脱液、P3 滤出液、水空白对照的荧光值相同(图 2, a 组 P3-E、P3-F、H₂O), P3 洗脱液和 P3 滤出液荧光值为 0, 表明 P3 不影响酶切产物 Cy5-dATP 荧光值, 该结果与 P3 不含荧光物一致, 可以用于定量检测 Cy5-dATP。与无荧光相同的 a 组还包括 T5exo-Cy5DNA 经 2×P3 柱回收洗脱液、Cy5DNA 溶液经柱回收的滤出液。有显著荧光值的 b 组包括 Cy5DNA 溶液经柱回收的洗脱液、T5exo-Cy5DNA 反

应液, 明显高于 b 组荧光值的 c 组包括 T5exo-Cy5DNA 经 2×P3 柱回收滤出液。

3.4. Cy5DNA 荧光定性及定量检测

激光共聚焦显微镜定性检测 Cy5 荧光素显示, Cy5DNA 溶液有荧光(图 3, 左), 而未加入 Cy5-dATP 的 dNTPs 扩增 LDNA 无荧光(图 3, 中)、Cy5DNA-T5exo 反应物也有荧光(图 3, 右), 无法与 Cy5DNA 荧光区分开来。



Figure 3. Con-focal microscope 20×image of Cy5DNA (left), LDNA (middle), and Cy5DNA-T5exo digestion product (right)
图 3. 激光共聚焦显微镜检测 Cy5DNA (左)和 LDNA (中) Cy5DNA-T5exo 酶切产物(右)

Cy5DNA-T5exo 酶切反应液检测有荧光(图 3 右), 定量检测荧光值为 5387 ± 866 (图 2, b 组 T5exo), 接近 Cy5DNA 洗脱液荧光值(5824 ± 937), 阴性对照反应液荧光值为 3451 ± 782 。Cy5DNA 溶液和阴性对照中均有荧光值说明酶切产物无法与底物分离开来, 无法确定 T5exo 是否切割、以及 Cy5DNA 的切割程度如何。必须经纯化柱以 2×P3 分离酶切产物, 从而与底物 Cy5DNA 区分开来。

3.5. Cy5DNA-T5exo 酶切产物的柱分离、定量检测

Cy5DNA-T5exo 反应液经纯化柱以 2×P3 分离得到 600 μL 滤出液(酶切产物 Cy5-dATP)、200 μL 洗脱液。定量检测发现, 200 μL 滤出液(相当于 120 ng Cy5DNA 酶切产物)荧光值 7573 ± 1527 (图 2, c 组 T5exo-F), 其洗脱液荧光值 0, 与水空白对照相同, 结果与 T5exo 酶切 Cy5DNA 产生游离核苷酸一致[3] [24]。因为检测荧光值的各种设备所用检测单位不同, 只能用绝对单位 a.u 或数据表示[25]。

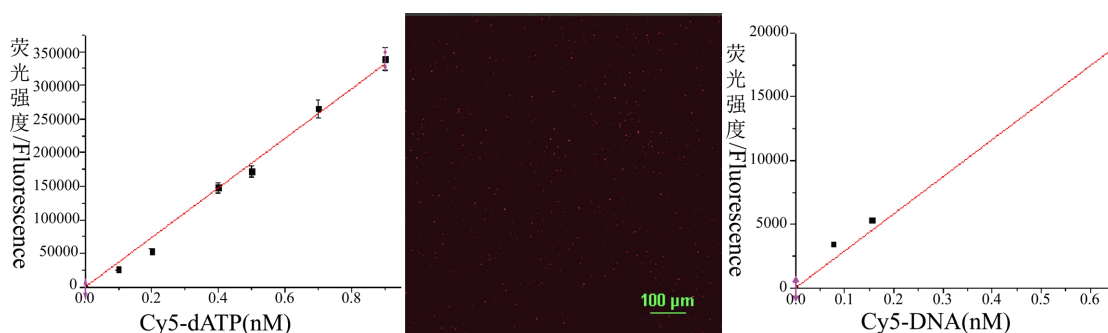


Figure 4. Fluorescence value relationship with Cy5DNA (left), Cy5DNA recovered after DNA-clean column (middle), and fluorescence value relationship with Cy5-dATP (right)
图 4. 荧光值与 Cy5-dATP 定量关系(左) Cy5DNA 柱回收洗脱液荧光(中)及荧光值与 Cy5DNA 定量关系(右)

分别取 0.1~0.9 nM Cy5-dATP 检测荧光值, Cy5-dATP 与荧光值定量关系方程: $y = 368957 \times x$ (y 为

荧光值, x 为 Cy5-dATP nM 浓度, R^2 为 0.996) (图 4, 左)。根据 Cy5-dATP 与荧光值定量关系方程, 滤出液荧光值 7573 ± 1527 相当于 Cy5DNA 浓度为 $7573 \div 368957 \div 1.374 \times (5851 \div 1374) \times 2 = 0.127$ nM, *i.e.*, 120 ng Cy5DNA 经 T5exo 酶切产物 Cy5-dATP 荧光值。结果说明 T5exo 完全切割 120 ng 荧光 Cy5DNA 产生了 Cy5-dATP 核苷酸, 并通过纯化柱以 2×P3 分离到了滤出液中。

含 120 ng Cy5DNA 的溶液经纯化柱以 2×P3 分离得到 600 μ L 滤出液、加水补足 200 μ L 洗脱液。定性检测发现 Cy5DNA 洗脱液有荧光基团(图 4, 中)。定量检测洗脱液荧光值 5824 ± 937 , 滤出液荧光值 0, 该结果与纯化柱截留 DNA 原理一致。

分别取含 60、120、500 ng Cy5DNA 的溶液检测荧光值, Cy5DNA 与荧光值定量关系为: $y = 29079 \times x$ (y , x 分别为荧光值和 Cy5DNA nM 浓度, R^2 为 0.992) (图 4, 右)。根据 Cy5DNA 荧光值定量关系方程(图 3, 右), 5824 ± 937 洗脱液荧光值相当于 $5824 \div 29079 \div 1.374 = 0.146$ nM Cy5DNA, 接近于 120 ng Cy5DNA 理论计算浓度 0.155 nM。因为 Cy5DNA 长度为 5851 bp, 正链中有 1374 个 dA 碱基, 每 1000 dATP 中加入 1.374 个荧光 Cy5-dATP (dNTPs 中加入 1/1000 的 Cy5-dATP 用于扩增 Cy5DNA, *i.e.*, 每个荧光 Cy5DNA 中有 1.374 个荧光 Cy5-dATP)。

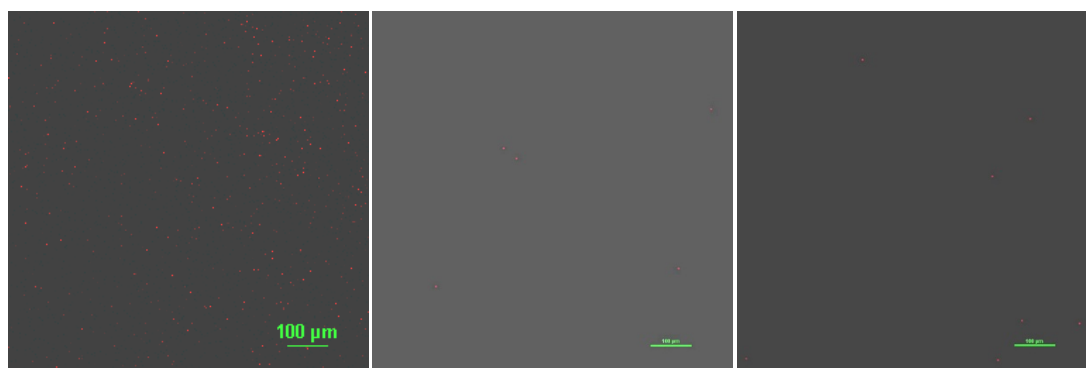


Figure 5. Con-focal microscope 20×image of T5exo filtration (left), Cy5DNA-T5exo elution (middle) and Cy5DNA filtration (right)

图 5. 激光共聚焦检测 Cy5DNA-T5exo 切割反应滤出液(左), 洗脱液(中), Cy5DNA 滤出液(右)

定量检测必须与定性检测结果保持一致, 定性检测显示 Cy5DNA-T5exo 滤出液有明显荧光(图 5, 左), 而 Cy5DNA 洗脱液有明显荧光(图 4 中)。所以说 2×P3 纯化柱分离了酶切产物 Cy5-dATP 与底物 Cy5DNA。检测发现 Cy5DNA-T5exo 洗脱液没有明显荧光, 但是有痕量荧光基团(图 5 中), 这种荧光在误差范围内, Cy5DNA 滤出液没有明显荧光, 但是也有痕量荧光基团(图 5 右), 这种荧光在误差范围内, 定量检测荧光值的差异显著性分析中与水、P3 滤出液、P3 洗脱液没有显著性差异(图 2, a 组)。

4. 讨论

放射性标记 DNA 制备过程复杂而且危害健康[1]-[6], 荧光染料 PicoGreen、SYBR Green I、BEB0 是非特异性荧光染料[8] [10] [11] [12], 不能定量确定一个 DNA 分子结合多少个荧光分子。这些染料对所有 DNA 染色, 不是专一性染色酶分子底物, 所以特异性不高。本研究 dNTPs 中加入 1/1000 Cy5-dATP 扩增 5851 bp 荧光 Cy5DNA pET28a-xyn。Cy5DNA 优势在于扩增方便、扩增量大、特异性高、灵敏度高, 而且可以在每个 DNA 分子定量加入荧光分子, 所以特异性高。酶学性质研究的关键是产物和底物分离, 根据纯化柱吸附 DNA 原理, 探讨了纯化柱截留 DNA 最小用量为 2×P3, 为荧光值定性和定量检测奠定基础。

dNTPs 中 Cy5-dATP 比例可以控制 Cy5DNA 荧光强度, 进而控制酶切产物荧光强度, 提高酶切产物检测灵敏度。5851 bp 线性 DNA pET21a-xyn 正链含有 1374 个 dA 碱基, dNTPs 加入 1/1000 Cy5-dATP,

则每个 Cy5DNA 带有 1.374 分子 Cy5-dATP。120 ng (3.1×10^{-5} nmol) 荧光 Cy5DNA 荧光值 5824 ± 937 ，其 T5exo 酶切产物滤出液荧光值提高 1.3 倍达到 7573 ± 1527 ，与正链 1374 个 dA 碱基中加入 1/1000 Cy5-dATP 一致。 3.1×10^{-5} nmol Cy5DNA 有等 nmol ($3.1 \times 10^{-5} \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23} = 18.7 \times 10^9$) 个 Cy5-dATP，相当于 1/1374 (13.6×10^6) 个全链标记荧光 Cy5DNA 分子。表明 DNA 双螺旋影响 Cy5 荧光的释放、检测，而酶切产物游离核苷酸有利于荧光释放、检测。这个结果与荧光 Cy5DNA 浓度、Cy5dATP 浓度与荧光值关系一致。如果扩增 1000 bp DNA，则需要 dNTPs 加入 1:100 的 Cy5-dATP 使每个 DNA 带 1 个荧光分子。与之相比，EB 染色检测 DNA 的最低限度为 10 ng，电泳酶切产物呈现大小不一的弥散条带，所以只能检测底物降解量。长度大小不一的 DNA 结合 EB 量也不相同，无法定量比较不同大小的 DNA。超螺旋 DNA 与线性 DNA 结合 EB 量也不相同。另外，EB 与 PicoGreen、SYBR Green I、BEB0 荧光染料一样不能定量结合 DNA。Nanodrop、分光光度计可以检测 DNA 浓度 A260 值，但是酶切反应是产物和底物混合物，无法区分产物和底物，同时无法区分 dsDNA 和 ssDNA。

荧光值定量酶切产物时用到标准曲线，结果显示 0.1 nM~0.9 nM Cy5-dATP 标准曲线合适，定量检测时发现大于 0.4 nM Cy5-dATP 有光漂白现象，小于 0.4 nM 则几乎没有漂白现象，*i.e.* 随检测时间增加荧光强度衰减现象，这与荧光分子数量有关，所以检测荧光时需要合适浓度。荧光定量检测时与溶液体积有关，选择酶标板最大 200 μ L 体积能最大限度减少误差。定量检测显示 Cy5DNA-T5exo 洗脱液和 Cy5DNA 滤出液与水空白、非荧光 DNA 对照相同，定性检测确认不含 DNA。但是二者有痕量荧光基团(图 5，中右)，说明纯化柱不能 100% 截留 Cy5DNA，也不能 100% 滤出 Cy5-dATP，显著性分析显示痕量残留在误差范围内(图 2，a 组 T5exo-E, F-F)。纯化柱分离和检测荧光时，样品间平行操作可以去除这种误差。

研究发现与 DNA 纯化柱不同，蛋白浓缩的超滤管(3 kDa 和 100 kDa)不能分离 Cy5DNA-T5exo 酶切产物，可能蛋白浓缩时不考虑小分子物质是否滤出或吸附膜上。另外，纯化柱吸附 200 bp 以下 DNA 效率较低[20]，如果酶切产物小于 200 bp，需要通过聚丙烯酰胺凝胶检测，垂直电泳提供聚丙烯酰胺的无氧环境。荧光 Cy5DNA 在酶学性质研究中特异性更高，但是每个样品都需要纯化柱分离荧光 Cy5DNA，探讨更方便的分离方法也是荧光 Cy5DNA 研究的发展方向。

5. 结论

本研究以 1/1000 Cy5dATP 加入 dNTPs 扩增 5851 bp 的荧光 Cy5DNA pET28a-xyn，其 T5exo 酶切产物通过纯化柱以 2 \times P3 有效分离，从而与底物 Cy5DNA 荧光分离开来。在荧光基团 Cy5 相应激发光 649 nm 和发射光 675 nm 波长下，通过激光共聚焦显微镜、酶标仪定性、定量检测酶切产物荧光值，进而分析了 Cy5DNA 浓度、dATP 浓度与荧光值的定量关系，为荧光 DNA 定量用于 DNA 酶学性质研究奠定了基础。

基金项目

国家自然科学基金：基于同源/非同源结构置换的木聚糖酶 - 葡聚糖酶结构元件功能解析(31771915)。

参考文献

- [1] Joseph, J.W. and Kolodner, R. (1983) Exonuclease VIII of *Escherichia coli* II. Mechanism of Action. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 10418-10424. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44473-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44473-5)
- [2] Joseph, J.W. and Kolodner, R. (1983) Exonuclease VIII of *Escherichia coli* I. Purification and Physical Properties. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 10411-10417. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44472-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44472-3)
- [3] Sayers, J. and Eckstein, F. (1990) Properties of Overexpressed Phage T5 D15 Exonuclease Similarities with *Escherichia coli* DNA Polymerase I 5'-3' Exonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 18311-18317. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)44753-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)44753-3)
- [4] Ma, X., Hong, Y., Han, W., *et al.* (2011) Single-Stranded DNA Binding Activity of XPBI, but Not XPBII, from *Sulfolobus tokodaii* Causes Double-Stranded DNA Melting. *Extremophiles*, **15**, 67-76.

- <https://doi.org/10.1007/s00792-010-0338-z>
- [5] Richardson, C.C. (1966) The 5'-Terminal Nucleotides of T7 Bacteriophage Deoxyribonucleic Acid. *Journal of Molecular Biology*, **15**, 49-61. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(66\)80208-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(66)80208-5)
- [6] Richardson, C.C., Inman, R.B. and Kornberg, A. (1964) Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid, XVIII the Repair of Partially Single-Stranded DNA Templates by DNA Polymerase. *Journal of Molecular Biology*, **9**, 46-69. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(64\)80090-5](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(64)80090-5)
- [7] 刘静波. 临床医学与研究中的放射性同位素——用测定还是用测定[J]. 国际放射医学核医学杂志, 1990, 14(1): 45-46.
- [8] Tolun, G. and Myers, R.S. (2003) A Real-Time DNase Assay (ReDA) Based on PicoGreen Fluorescence. *Nucleic Acids Research*, **31**, e111. <https://doi.org/10.1093/nar/gng111>
- [9] Zhang, J., Xing, X., Herr, A.B. and Bell, C.E. (2009) Crystal Structure of E. coli RecE Protein Reveals a Toroidal Tetramer for Processing Double-Stranded DNA Breaks. *Structure*, **17**, 690-702. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.03.008>
- [10] Druml, B., Kaltenbrunner, M., Hochegger, R., et al. (2016) A Novel Reference Real-Time PCR Assay for the Relative Quantification of (Game) Meat Species in Raw and Heat-Processed Food. *Food Control*, **70**, 392-400. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.05.055>
- [11] Carr, A.C. and Moore, S.D. (2012) Robust Quantification of Polymerase Chain Reactions Using Global Fitting. *PLOS ONE*, **7**, e37640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037640>
- [12] Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., et al. (2006) The Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, **27**, 95-125. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- [13] 王楷宸, Linda van der Graaf, 陆承平, 等. 猪链球菌荧光 DNA 扩增片段长度多态性检测方法的建立[J]. 中国兽医学报, 2012, 32(10): 1498-1501.
- [14] 李倩倩, 赵福杰, 丁庆文, 等. 猪萨佩罗病毒实时荧光定量检测方法的建立[J]. 西北农林科技大学学报自然科学版, 2021, 49(11): 10-16.
- [15] Marcussen, L.B., Jepsen, M.L., Kristoffersen, E.L., et al. (2013) DNA-Based Sensor for Real-Time Measurement of the Enzymatic Activity of Human Topoisomerase. *Sensors (Basel)*, **13**, 4017-4028. <https://doi.org/10.3390/s130404017>
- [16] Zhao, B., Tong, Z.X., Zhao, G.J., et al. (2014) Effects of 2'-O-methyl Nucleotide on Ligation Capability of T4 DNA Ligase. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **46**, 727-737. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmu058>
- [17] 姚亭秀. 四代 DNA 测序技术简述[J]. 生物学通报, 2017, 52(2): 5-8.
- [18] 宋沁馨, 周国华. 用 Cy5-ddNTP 结合修饰引物延伸测定人类 3 种 SNP[J]. 中国药科大学学报, 2006, 37(6): 569-572.
- [19] Li, X., Jin, J., Wang, M., et al. (2022) Abortive Ligation Intermediate Blocks Seamless Repair of Double-Stranded Breaks. *International Journal of Biological Macromolecules*, **209**, 1498-1503. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.04.098>
- [20] Sangon Biotech (2021) Diamond, DiaSpin PCR Product Purification Kit. User Manual, V 1.0. 12-15.
- [21] Yang, A., Cheng, J., Liu, M., et al. (2018) Sandwich Fusion of CBM9_2 to Enhance Xylanase Thermostability and Activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, **117**, 586-591. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.199>
- [22] 黄亚威, 贺添艳, 杨昂, 等. 双退火温度 PCR 扩增 DNA[J]. 微生物学报, 2017, 57(8): 1262-1269.
- [23] 邵玉强, 金家铖, 李雪刚, 刘亮伟. 大量-高纯-高浓度 DNA 的制备[J]. 微生物前沿, 2022, 11(2): 67-74. <https://doi.org/10.12677/amb.2022.112008>
- [24] Wang, H., Li, Z., Jia, R., et al. (2017) ExoCET Exonuclease *in Vitro* Assembly Combined with RecET Recombination for Highly Efficient Direct DNA Cloning from Complex Genomes. *Nucleic Acids Research*, **46**, e28. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1249>
- [25] Bajar, B.T., Wang, E.S., Zhang, S., Lin, M.Z. and Chu, J. (2016) A Guide to Fluorescent Protein FRET Pairs. *Sensors*, **16**, 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>