

# 隐 - 荧光DNA扩增

刘自厚<sup>1</sup>, 刘亮伟<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>河南农业大学国际教育学院, 河南 郑州

<sup>2</sup>河南农业大学生命科学学院, 河南 郑州

<sup>3</sup>农业部农业酶工程重点实验室, 河南 郑州

收稿日期: 2023年3月1日; 录用日期: 2023年3月25日; 发布日期: 2023年3月31日

## 摘要

目的: 隐 - 荧光(Hf: hidden fluorescent) DNA通过带荧光素及10 nt之内淬灭基团的Hf引物扩增。方法: 本研究设计Hf\_Pf引物带有dT<sub>12</sub>\_Fam荧光素-dT<sub>16</sub>\_BHQ1淬灭基团, 扩增5851 bp HfDNA pET28a-xylanase, 探讨Hf\_Pf引物T<sub>m</sub> (退火温度)适合计算器、HfDNA扩增条件、T5 DNA酶(T5exo)切割产物检测、及T5exo酶切动力学。结果: Hf\_Pf T<sub>m</sub>计算器为Oligo、IDT, 经非等量引物PCR优化扩增HfDNA, 激光共聚焦定性检测HfDNA酶切产物Fam荧光、酶标仪定量检测荧光值19,683 a.u。根据HfDNA浓度 - 荧光值方程, T5exo酶促动力学参数K<sub>m</sub> 0.1 nM, 弥补解离常数K<sub>D</sub>不足。结论: 本研究扩增隐 - 荧光HfDNA, 提供了DNA酶学研究新材料。

## 关键词

隐 - 荧光DNA, 扩增, 荧光检测

# Amplification of Hidden Fluorescent DNA

Zihou Liu<sup>1</sup>, Liangwei Liu<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>International Education College of Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan

<sup>2</sup>Life Science College of Henan Agricultural University, Zhengzhou Henan

<sup>3</sup>The Key Laboratory of Enzyme Engineering of Agricultural Microbiology, Ministry of Agriculture, Zhengzhou Henan

Received: Mar. 1<sup>st</sup>, 2023; accepted: Mar. 25<sup>th</sup>, 2023; published: Mar. 31<sup>st</sup>, 2023

## Abstract

**Objective:** Hidden fluorescent (Hf) DNA substrates can be amplified by Hf primer that has a flu-

\*通讯作者。

文章引用: 刘自厚, 刘亮伟. 隐-荧光 DNA 扩增[J]. 微生物前沿, 2023, 12(1): 45-54.

DOI: 10.12677/amb.2023.121006

orescein and a quencher within 10 nt. Method: The study designed a 20 nt Hf\_Pf having the dT<sub>12</sub>\_Fam and the dT<sub>16</sub>\_BHQ1, amplified a 5851 bp HfDNA pET28a-xylanase, determined suitable analyzers for calculating primer Hf\_Pf T<sub>m</sub> (melting temperature), optimized PCR to amplify the HfDNA substrates, assayed HfDNA-T5exo digestion product fluorescence. Result: Suitable analyzers were Oligo and IDT, and un-equal PCR was optimized to amplify the HfDNA substrates. Instead of the HfDNA substrates, the HfDNA-T5exo digestion products exhibited dT<sub>12</sub>\_Fam fluorescence in quality under a laser scanning confocal microcopy and a 19,683 a.u fluorescence intensity in quantity under a microreader. According to HfDNA concentration-fluorescence intensity function, T5exo kinetics was determined to have a 0.1 nM K<sub>m</sub>, fulfilling in-adequate of dissociation constant K<sub>D</sub>. Conclusion: The study amplified HfDNA substrates, provided a new material for assaying DNase enzyme properties.

## Keywords

Hidden Fluorescent DNA, Amplification, Fluorescence Assay

Copyright © 2023 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

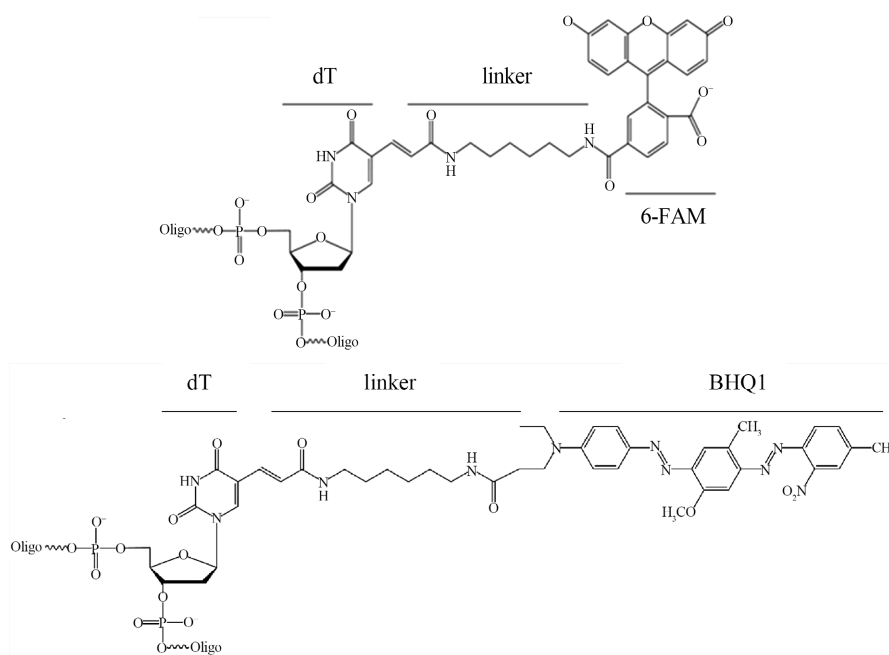
## 1. 引言

DNA 酶(DNase)性质检测涉及底物 double-stranded (ds) DNA 和产物核苷酸, 但是二者均无法显色, 所以 dsDNA 标记和产物检测成为关键。放射性同位素标记 dsDNA 最早用于 T5exo (T5 DNA 外切酶)和 VIII 型外切酶[1]-[6]。后来, 荧光染料 PicoGreen、SYBR Green I、BEBO 染色 dsDNA 用于 RecBCD 外切酶、T7 噬菌体 gene 6 外切酶和 DNA 聚合酶[7] [8] [9] [10]。而后, 荧光标记 ddNTP 用于 Sanger 终止法测序、分子标记探针用于荧光定量 PCR、拓扑异构酶[7] [8] [11] [12] [13]。但是, 同位素衰变导致误差[14], 荧光染料普遍染色 DNA 而不具有特异性, 而且荧光染料与 dsDNA 分子没有定量关系。PicoGreen 染色 2.7 kb dsDNA 检测 VIII 型外切酶, 需要荧光标记 25 bp dsDNA (探针引物与反向互补 ssDNA 退火)检测解离常数 K<sub>D</sub> [4]。但是, 荧光标记 ddNTP、探针引物、分子标记探针均不参与 dsDNA 扩增[8] [9] [11] [12] [13] [15] [16]。受 Cy5-ATP 标记 ds break 连接中间物荧光检测[17]和 PCR 高效制备 dsDNA 启发[18], 带荧光基团和 10 bp 之内淬灭基团的隐 - 荧光(Hf: hidden fluorescein) dsDNA 扩增成为可能。

本研究将“带荧光素和 10 nt 之内淬灭基团的引物”称为隐 - 荧光(Hf)引物, 但是这种目前只作为探针引物、还没有用于扩增 dsDNA 的报道。HfDNA 扩增需要以下条件: 1) Hf 引物能够扩增 dsDNA。dT 碱基 5 位通过 linker 标记荧光、淬灭基团(图 1), 3、4 位游离能够与模板链氢键匹配, Hf 引物理论上可以扩增 dsDNA。2) T<sub>m</sub> (退火温度)是 DNA 扩增关键, 需要确定 Hf 引物 T<sub>m</sub> 值的适用计算器。3) HfDNA 中 dT\_荧光素-dT\_淬灭基团间距 10 bp 之内, 理论上没有荧光, 经 T5exo 酶切分开 dT\_荧光素、dT\_淬灭基团, 理论上产生荧光。

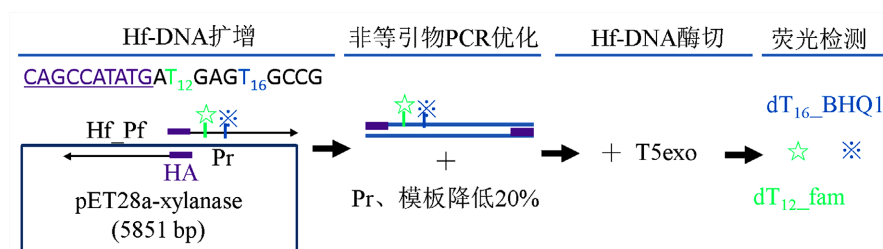
基于上述理论分析, 本研究设计 20 nt 正向隐 - 荧光引物 Hf\_Pf, 其 dT<sub>12</sub> 位荧光素 6-Fam (carbox-fluorescein) (dT<sub>12</sub>\_Fam 绿色荧光需要 495 nm 激发光、521 nm 发射光)、dT<sub>16</sub> 位淬灭基团 BHQ1 (Black Hole Quencher) (图 2), 与 22 nt 反向引物 Pr 协同扩增 5851 bp 的 HfDNA pET28a-xylanase (黑曲霉 GH11 木聚糖酶基因) [19]。从 DNAMAN、NEB (New England Biolab)、Oligo (上海生物工程公司)、IDT (Integrated DNA Technologies)中确定 T<sub>m</sub> 适合计算器。根据 Hf\_Pf/Pr T<sub>m</sub> 差值选用双退火 PCR 程序[20], HfDNA-T5exo

酶切产物经定性和定量检测, 进而计算 T5exo 酶促动力学, 为 DNA 酶研究提供新材料。



**Figure 1.** Structure of 6-Fam and BHQ1. dT: nucleotide, linker, 6-Fam: carboxyfluorescein, BHQ1: Black Hole Quencher

**图 1.** 6-Fam-dT 和 BHQ1-dT 结构式, dT: dT 碱基, linker: 连接臂, 6-Fam: Fam 荧光素, BHQ1: BHQ1 淬灭基团



**Figure 2.** Schematic model of hidden fluorescent HfDNA amplification. Hidden fluorescent primer Hf\_Pf has the dT<sub>12</sub>\_Fam fluoresin-the dT<sub>16</sub>\_BHQ1 quencher, Hf\_Pf primer has a 10 nt homology arm (HA) with the reverse primer Pr, the 5851 bp HfDNA was amplified by PCR, and was optimized to increase quantity by un-equal primer PC, T5 DNA exonuclease digestion of the HfDNA releases the dT<sub>12</sub>\_Fam from the dT<sub>16</sub>\_BHQ1, and releases fluorescence

**图 2.** 隐 - 荧光 HfDNA 扩增模式。隐 - 荧光引物 Hf\_Pf 带 dT<sub>12</sub>\_Fam 荧光素-dT<sub>16</sub>\_BHQ1 淬灭基团, Hf\_Pf 与反向引物 Pr 有 10 nt 同源(HA), PCR 扩增得到全长 5851 bp HfDNA, 经非等量引物 PCR 优化提高 HfDNA 扩增量, HfDNA 经 T5 DNA 酶切分离 dT<sub>12</sub>\_Fam 与 dT<sub>16</sub>\_BHQ1, 从而产生荧光

## 2. 方法与材料

### 2.1. 材料

Q5 DNA 聚合酶、T5 DNA 外切酶(T5exo)由 NEB (New England BioLabs, 中国)公司提供, Hf\_Pf 引物 (dT<sub>12</sub>\_6-Fam, dT<sub>16</sub>\_BHQ1)和常规引物 Pr 由上海生物工程公司合成(表 1)。Hf 引物稀释和保存与常规引物相同, 干粉在-20℃下保存 1 年, 荧光素不稳定需要避光保存。质粒 pET28a-xylanase 为本实验室构建[19]。

## 2.2. HfDNA 扩增

PCR 体系加入 54 ng pET28a-xylanase 质粒, 250  $\mu\text{mol}$  Hf\_Pf, 250  $\mu\text{mol}$  Pr 引物, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 1 U Q5 DNA 聚合酶, 1  $\times$  Q5 DNA 聚合酶缓冲液, 以水补足 50  $\mu\text{L}$  体系。PCR 程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 98 $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 双退火程序(69 $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s), 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 3 min 40 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增 dsDNA 用 Thermal Cycler Block 5020 热循环仪(Thermo Scientific, USA), 在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳(DYY-5 型电泳仪), EB 染色后在 302 nm 波长下照像, 电泳分析软件 Gel-Pro Analyzer 4.0 (Media Cybernetics, USA)。

非等量引物扩增 HfDNA: 引物 Hf\_Pf 与 Pr 有 10 bp 同源, 容易形成引物二聚体, 将 Hf\_Pf 和 Pr 引物量分别降低 20%, 探讨非等量引物对 HfDNA 扩增量影响。

酶切产物定性、定量分析、酶促动力学需要大量 HfDNA, 利用大量 - 高纯 - 高浓度 DNA 方法制备 HfDNA [21]。将 40 管(共 2000  $\mu\text{L}$ )PCR 产物经 CsCl-EB 超速离心后, 以 DNA 纯化柱回收 HfDNA。质粒 DNA、HfDNA 浓度用 Nanodrop 2000 检测(Thermo Scientific, USA)。

## 2.3. HfDNA 用于 T5exo 酶活性检测

T5exo 酶切反应: 加入 600 ng HfDNA, 2  $\mu\text{L}$  (10 U/ $\mu\text{L}$ ) T5exo、1  $\times$  T5exo buffer, 以水补足 10  $\mu\text{L}$  反应体系, 在 37 $^{\circ}\text{C}$  酶切 30 min, 每个反应设置 3 个平行, 阴性对照加入灭活的 T5exo (加入 10% SDS 经 70 $^{\circ}\text{C}$  孵育 30 min), 以水为空白对照。

酶切产物 dT<sub>12</sub>\_Fam 定量检测: HfDNA-T5exo 反应液以 H<sub>2</sub>O 补足 150  $\mu\text{L}$ , 加入黑色酶标板, 选择 520~550 nm 波段用 SpectraMax<sup>®</sup> i3x 酶标仪检测(Molecular Devices, Thermo Fisher Scientific, USA), 以动态方式(dynamics)每 90 s 采集一次数据, 采集 21 次荧光值平均值, 水为空白对照。

用 IBM SPSS Statistics 软件分析数据显著性, 依次选用“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,  $P < 0.05$ ), “选项”: 描述、方差齐性检验, 区分显著性差异。

酶切产物 Fam 定性检测: 从 HfDNA-T5exo 酶切产物中取出 5  $\mu\text{L}$  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, 用 A1R HD25 激光共聚焦显微镜在 488 nm 激光下检测(Nikon Corporation, Japan)。

## 2.4. HfDNA 用于 T5exo 酶促动力学

构建荧光值-HfDNA 浓度方程: 酶切体系如上, 只是 150  $\mu\text{L}$  体系分别加入 50、100、300、500 ng HfDNA, 加入黑色酶标板, 以 SpectraMax<sup>®</sup> i3x 酶标仪实时检测 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 荧光值, 以动态方式每 90 s 检测一次荧光值, 共采集 21 次数据平均值。

酶促动力学检测: 150  $\mu\text{L}$  反应体系分别加入 50、100、300、500 ng HfDNA, 1 U T5exo, 加入黑色酶标板。实时检测 37 $^{\circ}\text{C}$  反应 30 min 荧光值, 每个反应 3 次重复, 根据荧光值 - 时间变化趋势, 取前 7 min 反应数据线性拟合, 根据拟合方程计算各时刻荧光值, 从而减小荧光值波动的误差。根据标准曲线计算反应速度(nM/s), 与底物(nM)进行 Hill 方程拟合, 得到最大反应速度  $V_{\text{max}}$  和亲合常数  $K_{\text{m}}$ 。

## 3. 结果与分析

### 3.1. HfDNA 扩增

如图 2 所示, Hf\_Pf 引物带 dT<sub>12</sub>\_Fam 荧光素和 4 nt 之内 dT<sub>16</sub>\_BHQ1 淬灭基团, BHQ1 淬灭 10 nt 内

荧光, Hf\_Pf 引物理论上无荧光。以 Hf\_Pf 及 Pr 引物、质粒为模板通过反向 PCR 扩增 5851 bp 隐 - 荧光 HfDNA。HfDNA 中 dT<sub>12</sub>\_Fam 和 dT<sub>16</sub>\_BHQ1 间距 4 bp, HfDNA 理论上无荧光。经 T5exo 酶切后, dT<sub>12</sub>\_Fam 与 dT<sub>16</sub>\_BHQ1 分离, dT<sub>12</sub>\_Fam 理论上产生绿色荧光, 通过激光共聚焦显微镜和酶标仪定性、定量检测。

Hf\_Pf Tm 值计算是扩增 HfDNA 的关键。分别用 DNAMAN、NEB、Oligo、IDT 计算 Hf\_Pf Tm 值, 根据能否扩增出 HfDNA 确定适合计算器。由表 1 可知, 引物 Hf\_Pf 与 Pr Tm 差值 11.3°C~16°C, 双退火程序才能扩增 HfDNA [20]。DNAMAN 计算 Tm 值分别为 63/78°C, PCR 无目的条带(图 3\_1)。NEB 计算 Tm 值分别为 66°C/79°C, 60°C/69°C PCR 无目的条带(图 3\_4)。说明 DNAMAN 和 NEB 不适合 Tm 计算。

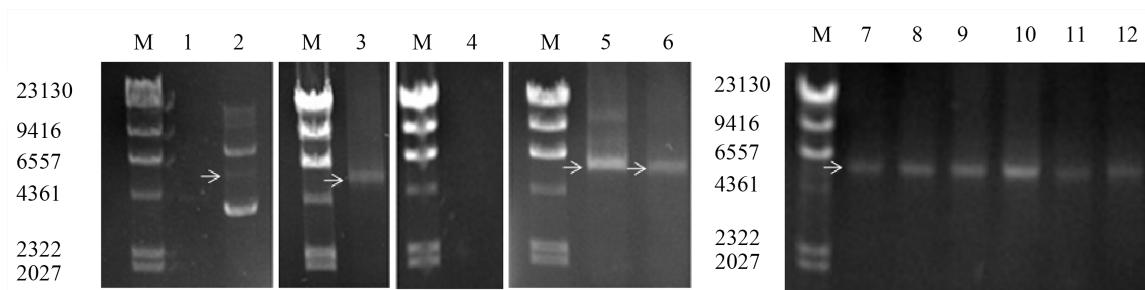
**Table 1.** Tm values calculated by four analyzers

**表 1.** 引物 Tm 四种计算值

	DNAMAN (°C)	Oligo (°C)	IDT (°C)	NEB (°C)
Hf_Pf: 5'-CAGCCATATGAT <sub>12-Fam</sub> GAG T <sub>16-BHQ1</sub> G C C G-3'	62.6	56.4 56, S 56.1, D	56	66
Pr: 5'-CATATGGCTGCCGCGCGCACC-3'	78.6	69	67.3	79

注: 隐 - 荧光引物 Hf\_Pf dT<sub>12</sub> 标记荧光素 6-Fam, dT<sub>16</sub> 标记淬灭基团 BHQ1, Hf\_Pf 与常规引物 Pr 10 nt 同源(下划线表示), DNAMAN: DNAMAN 计算器, Oligo (上海生物工程公司) (<https://www.sangon.com/baseCalculator>), IDT (Integrated DNA Technologies IDT DNA (<https://sg.idtdna.com/calc/analyzer>) (需注册), NEB (New England Biolab) (<http://tmcalculator.neb.com/#/main>)). 其中, S/D: 以 Fam 和 BHQ1 中的单一、双基团计算 Tm。

Oligo 计算 Tm 值分别为 56.4°C/69°C, 57°C/69°C PCR 扩增得到目的条带(图 3\_3)。IDT 计算 Tm 值分别为 56°C/67.3°C, 57°C/69°C PCR 扩增得到目的条带(图 3\_6)。说明 Oligo 和 IDT 适合计算 Tm。Oligo 计算 Tm 时考虑修饰基团(Fam 和 BHQ1)位置影响(位于引物 5'端、3'端、中间), 加入单一、两种基团时引物 Tm 分别为 56°C、56.1°C (表 1), 表明修饰基团降低引物 Tm 值 0.3°C~0.4°C。



**Figure 3.** Electrophoresis of HfDNAs. M:  $\lambda$ -DNA/HindIII marker, 1: no HfDNA from PCR using 63°C/78°C of DNAMAN, 2: plasmid pET28a-xylanase control, 3: HfDNA from PCR using 57°C/69°C of Oligo, 4: no HfDNA from PCR set by Tm 60°C/69°C, 5: HfDNA from optimized PCR, 6: HfDNA from PCR using 57°C/69°C of IDT. HfDNA from optimized PCR (lane 7-12). 7: with 200:250  $\mu$ mol primer Hf\_Pf/Pr (121 ng HfDNA), 8: with 250:250  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr (149 ng HfDNA), 9: with 200:250  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr (163 ng HfDNA), 10: with 200:250  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr and an 80% plasmid templates (213 ng HfDNA), 11-12: 200:300  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr (119 ng HfDNA)

**图 3.** HfDNA 电泳。M:  $\lambda$ -DNA/HindIII marker, 1: DNAMAN Tm 值 63°C/78°C 无 HfDNA 条带, 2: pET28a-xylanase 质粒对照, 3: Oligo Tm 值 57°C/69°C PCR 得到 HfDNA 条带, 4: NEB Tm 值 60°C/69°C PCR 无 HfDNA 条带, 5: PCR 优化 HfDNA 条带, 6: IDT 计算 Tm 值 57°C/69°C PCR 得到 HfDNA 条带。PCR 优化扩增 HfDNA (Lane: 7-12), 7: 200:250  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr (121 ng HfDNA), 8: 250:250  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr (149 ng HfDNA), 9: 200:250  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr (163 ng HfDNA), 10: 200:250  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr 及 80% 模板量(213 ng HfDNA), 11-12: 200:300  $\mu$ mol Hf\_Pf/Pr (119 ng HfDNA)

### 3.2. 非等量引物扩增 HfDNA

Oligo 和 IDT 虽然适合  $T_m$  值计算(57°C/69°C), 但是 Hf\_Pf 与 Pr 10 nt 同源导致 HfDNA 扩增量不足(表 1), 改变单侧引物量的非等量引物 PCR 才能提高 HfDNA 扩增量。由 Gel-pro analyzer 软件计算 Hf\_Pf/Pr 等量时 HfDNA 量 149 ng 为参照(图 3\_8, 表 2), Hf\_Pf 降低 20%, HfDNA 量减少 19% (图 3\_7)。Pr 提高 20% 时, HfDNA 量减少 20% (图 3\_11, 12)。Pr 降低 20% 时, HfDNA 量增加 9% (图 3\_9)。Pr 降低 20% 且模板量降低 20% 时 HfDNA 量增加 43% (图 3\_10, 5)。降低单侧引物量可以减少引物二聚体形成[22], 多余一侧引物与模板结合延伸得到目的 DNA。因为至少 3 次 PCR 循环才能产生目的 DNA, 并作为后续指数扩增的模板, 初始模板量过大会减少目的 DNA 扩增量。

**Table 2.** HfDNA amplified by un-equal PCR  
**表 2.** 非等量引物 PCR 扩增 HfDNA

PCR	Quantity of HfDNA/ng	Rate of control (%)
1.2Hf_Pf/Pr	121	81
Hf_Pf/Pr	149	100
Hf_Pf/0.8Pr	163	109
Hf_Pf/0.8Pr, 0.8 template	213	143
Hf_Pf/1.2Pr	119	80
Hf_Pf/1.2Pr	119	80

不带荧光 - 淬灭基团的同源引物, 降低任何单侧引物量 10% 均可提高 DNA 扩增量[20]。但是, Hf 引物却明显不同, 降低 Hf\_Pf 量均减少 HfDNA 扩增量, 与 Oligo 引入修饰基团降低  $T_m$  值一致, 说明修饰基团降低 Hf\_Pf 引物 - 模板亲和力, 所以 HfDNA 扩增时只能降低常规引物 20%。

PCR 优化后大量扩增 HfDNA, 将 40 管 2000  $\mu$ L PCR 产物经大批量 - 高纯度 - 高浓度纯化方法: CsCl-EB 超速离心-DNA 纯化柱回收。共得到 28,715 ng 纯化 HfDNA, 浓度 195.5 ng/ $\mu$ L, A260/280 可达 1.89, A260/230 可达 2.26。

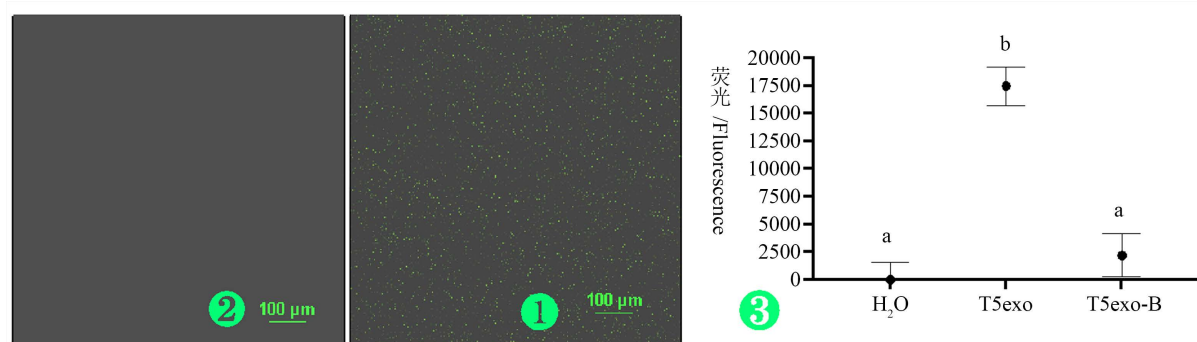
### 3.3. HfDNA-T5exo 酶切产物检测

Hf\_Pf 引物 dT<sub>12</sub>\_Fam 与 dT<sub>16</sub>\_BHQ1 间距 4 nt, HfDNA 中二者间距 4 bp, 所以理论上无荧光, 激光共聚焦显微镜检测证实无荧光(图 4\_2)。600 ng HfDNA 经 T5exo 酶切将 dT<sub>12</sub>\_Fam 基团与 dT<sub>16</sub>\_BHQ1 分开[15], 理论上产生荧光, 激光共聚焦显微镜在 488 nm 激发光下检测到 Fam 绿色荧光(图 4\_1)。

与定性检测不同, 酶标仪在 520~550 nm 波段可以定量检测荧光强度。600 ng HfDNA 酶切产物荧光值 19,683 a.u (图 4\_3), 阴性对照(T5exo-B)荧光值与水相同(图 4\_3)。HfDNA-T5exo 酶切产物产生 Fam 荧光, 表明 HfDNA 可以定性、定量检测 DNA 酶活性。

### 3.4. HfDNA 用于 T5exo 酶促动力学

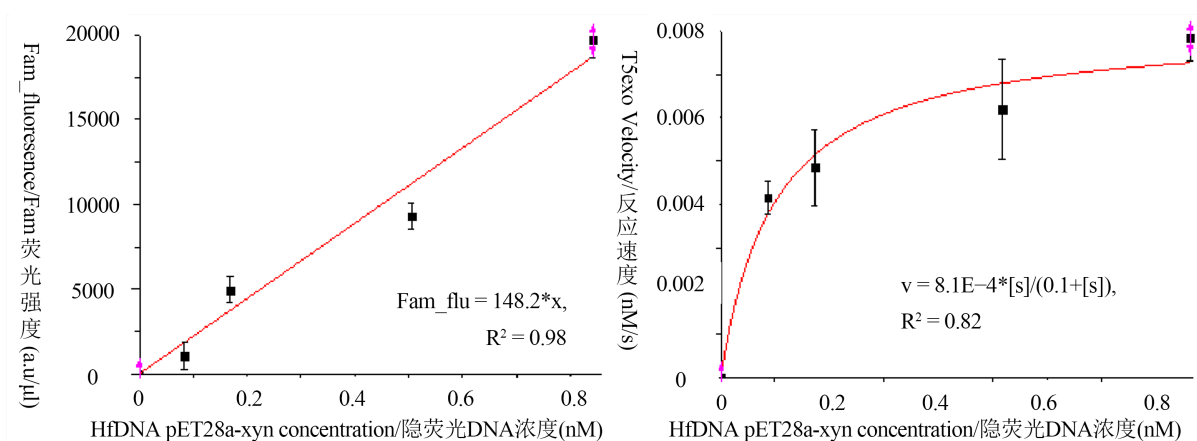
首先检测 50、100、300、500 ng HfDNA 完全降解产物荧光值, 得到 Fam 荧光值-HfDNA 浓度方程(图 5 左):  $dT_{12}\text{-Fam} = 22,225 \times \text{HfDNA}$  (Fam 指反应后荧光值, 反应体系中 HfDNA 浓度 nM,  $R^2 = 0.98$ )。根据方程, 600 ng HfDNA 酶切产物荧光值 19,683 a.u 相当于  $19,683 \div 22,225 = 0.89$  nM (图 4\_3)。600 ng HfDNA 理论浓度  $600 \text{ ng} \div (5,851 \text{ bp} \times 2 \times 330) \div (0.15 \mu\text{L} \div 1000) = 1.0$  nM, 表明荧光计算值与理论值相近。



**Figure 4.** Assay of HfDNA-T5exo digestion product green dT<sub>12</sub>\_Fam fluorescence. Fluorescence dT<sub>12</sub>\_Fam of the HfDNA-T5exo digestion 20× observed by a laser scanning con-focal microscope ①, with the HfDNA pET28a-xylanase as the negative control ②. dT<sub>12</sub>\_Fam fluorescence intensity of the HfDNA-T5exo digestion assayed for 19,683 a.u by a Microplate Reader ③, with water as the blank control (H<sub>2</sub>O), and the negative control (T5exo-B). The groups a and b were significantly different (Duncan's multiple range test, P < 0.05)

**图 4.** HfDNA-T5exo 酶切产物 Fam 荧光检测。激光共聚焦显微镜检测 HfDNA-T5exo 酶切产物 dT<sub>12</sub>\_Fam 荧光 20× ①, HfDNA pET28a-xylanase 无荧光②。酶标仪定量检测 HfDNA-T5exo 酶切产物 Fam 荧光值 19,683 a.u ③, 阴性反应荧光值(T5exo-B)与水(H<sub>2</sub>O)相同, a 和 b 具有显著性差异(Duncan's multiple range test, P < 0.05)

为探讨 HfDNA 适用性, 检测 T5exo 酶切 HfDNA 酶促动力学。在 150 μL 体系下 37°C 30 min 酶切 50、100、300、500 ng 底物, 每 90 s 实时检测荧光值。取不同底物浓度下 6 min (6 × 90 s) 荧光值线性拟合避免误差[23], 则底物反应速率(nM/s) = 线性方程斜率 × 540 s ÷ 22,225 (标准曲线斜率) ÷ 540 s, 与 HfDNA 底物浓度拟合 Hill 方程(图 5 右), 得到 Vmax 为 8.1 × 10<sup>-4</sup> nM/s、亲合常数 Km 为 0.1 nM 值。则 1 min 内产生核苷酸 = 8.1 × 10<sup>-4</sup> nM/s × 60s = 0.486 nM, 接近于 1U 的 T5exo 定义(0.5 nM/min dsDNA 降解产物)。T5exo 酶切速率 = 8.1 × 10<sup>-4</sup> (nM/s) × 2 (dsDNA) = 16.2 × 10<sup>-4</sup> nM/s\*nt/U, 说明 T5exo 有较强持续外切活性。亲合常数 Km 为 0.1 nM, 弥补了 K<sub>D</sub> 值不足[1] [5], 结果表明 HfDNA 可以表征 DNA 酶活性。



**Figure 5.** Standard curve (left) and kinetics of T5 exonuclease digestion of HfDNA (right). The insert was change of dT<sub>12</sub>\_Fam fluorescence along with time of standard line using 20 U T5exo and kinetics using 1 U T5exo respectively

**图 5.** 标准曲线(左)和 T5exo 酶切 HfDNA 动力学(右)。插图分别是标准曲线时 20U T5exo-HfDNA 荧光值 - 时间线性拟合, 酶促动力学时 1U T5exo-HfDNA 荧光值 - 时间线性拟合

基于放射性标记 DNA 的 T5exo 转换常数 18 nt/s [1], 则 T5exo 浓度(说明书无浓度) = 16.2 × 10<sup>-4</sup>/18 = 0.9 × 10<sup>-4</sup> nM/U = 0.9 × 10<sup>-4</sup> × 291 (Aa) × 110 (Aa 分子量) ng/U = 2.9 ng/U, 又因为 1 U = 0.1 μL, 所以,

T5exo 浓度 = 29 ng/ $\mu$ L。T5exo 转换常数 18 nt/s, 接近于持续外切活性较高的 VIII 外切酶 Kcat 18.8/s [4], 高于  $\lambda$  外切酶( $\lambda$  exonuclease) Kcat 9.3/s [24]。

#### 4. 讨论

本研究以隐-荧光引物 Hf\_Pf 扩增带有 dT12\_Fam 和 dT16\_BHQ1 的 5851 bp HfDNA、经非等量引物 PCR 优化, HfDNA-T5exo 酶切产物定性、定量检测。据笔者所知, 还没有 Hf 引物扩增 HfDNA 的报道。5851 bp 长链 HfDNA 扩增基于: 1) 接近放射性标记 40 kb T7 噬菌体 DNA、2.7 kb 质粒 pUC19 DNA [1]、荧光染料 PicoGreen 染色 2.7 kb 线性 pUC19 DNA [4]。2) 5851 bp HfDNA 能够扩增, 则较短 HfDNA 更容易扩增。3) 针对 T5exo Kcat 18.1/s, 5851 bp HfDNA 底物更好显示 T5exo 持续外切活性。淬灭基团导致 5~7 nm 荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer: FRET)从而不激发荧光[25], 一个 DNA 螺旋 10 bp 间距 3.4 nm, 所以 Hf 引物需要荧光-淬灭基团间距 10 nt 之内, 间距 4 nt 的 dT<sub>12</sub>\_Fam 和 dT<sub>16</sub>\_BHQ1 的 Hf\_Pf 引物和 HfDNA 无荧光, T5exo 酶切分离 dT<sub>12</sub>\_Fam 和 dT<sub>16</sub>\_BHQ1 产生荧光, 经激光共聚焦和酶标仪定性和定量检测。化学反应连接荧光素-DNA 时出现连接效率问题[26] [27] [28], PCR 扩增得到每个 DNA 分子带一个隐-荧光分子, 淬灭基团 10 nt 之内引入第二个荧光基团可以增强荧光强度。

HfDNA 特异性问题。相比而言, 放射性同位素标记 dsDNA 制备复杂[1] [3] [4], 需要加入放射性标记的 <sup>3</sup>H、<sup>32</sup>P 原子, 利用胞内 dsDNA 系统合成, 而且放射性同位素危害人体健康。以 HfDNA 得到 T5exo 亲和常数  $K_m$  0.1 nM, 弥补了放射性同位素标记 dsDNA 无法检测  $K_m$  值的不足[1]。以酸可溶性(acid-soluble)方式检测酶切产物无法得到 T5exo 亲和常数  $K_m$  [1]。检测 VIII 型外切酶活性时[4], 通过 5' 端 dT\_Fam 荧光素标记 25 bp dsDNA (5'-[FluorT] AGAGCTTAATTGCTGAATCTGGTG-3' 退火反向互补 ssDNA), 只能得到 RecE564 解离常数  $K_D$  70 nM, 不同于 PicoGreen 染色 2.7 kb dsDNA 酶切底物,  $\lambda$  exonuclease 得到  $K_D$  161 nM。与本研究以 HfDNA 得到 T5exo  $K_m$  0.1 nM 相比, 相差近 3 个数量级, 说明  $K_D$  表示底物亲和力有较大误差, 因为 T5exo (Kcat 18.1/s)~1 s 即可完全降解分子标记 25 bp dsDNA, 无法表征酶切 2.7 kb pUC19 dsDNA 底物亲和力, 另外, 荧光染料 PicoGreen 对 ssDNA 和 dsDNA 均染色, ssDNA 与 dsDNA 结合的染料分子多少不一致, 而且不能定量 dsDNA 结合多少个染料分子。

荧光值单位问题。因为不同设备荧光单位不一致, 荧光值均以绝对单位表示(a.u: arbitrary unit) [26] [27] [28] [29]。Fam 荧光值-HfDNA 浓度标准曲线斜率 22,225 以 150  $\mu$ L 检测, 而 Cy5 荧光-Cy5DNA 标准曲线斜率 29,079 以 200  $\mu$ L 检测[30], 表明 200  $\mu$ L 检测体系 Cy5 比 150  $\mu$ L Fam 荧光强度高, 增大检测体系可以提高荧光检测准确度。基于相对荧光单位概念, Hf-DNA-Fam 荧光方程斜率 22,225 a.u 除以检测体系 150  $\mu$ L 得到 Fam 相对值荧光强度 148.2 a.u/ $\mu$ L。Cy5DNA-Cy5 荧光方程斜率 29,079 a.u 除以 200  $\mu$ L 检测体系得到 Cy5 相对值荧光强度 145.4 a.u/ $\mu$ L, 则二者相近。表明以检测体系的相对值荧光强度浓度标准曲线可以用于不同荧光素。将荧光值绝对单位 19,683 a.u 除以 HfDNA 浓度 195.5 ng/ $\mu$ L 得到相对荧光强度 100.7 a.u/(ng/ $\mu$ L), 可以排除 HfDNA 浓度的影响, 则荧光值之间平行性更好。与水作为空白对照相比, 阴性对照中 T5exo 变性影响荧光值释放, 从而显示水作为空白更合理。

Tm 值计算问题。DNAMAN、NEB 计算 Tm 值时与理论公式  $4 \times (G + C) + 2 \times (A + T)$ 、经验公式  $62.3 + 0.41 \times (GC\%)$  相同。长片段引物(megaprimer)构建重组质粒时[31] [32]、引物与模板匹配的 3' 端序列用于计算 Tm [32], 这些计算公式[33]根据氢键数目的多小、或 GC% 含量计算 Tm 值, 只能计算常规引物 Tm 值[34], 不适合计算 Hf 引物 Tm 值。Oligo 和 IDT 适合 Hf 引物 Tm 值计算, Hf 引物 Tm 值比前者低 6 $^{\circ}$ C~10 $^{\circ}$ C, 加入修饰基团后 Tm 值进一步降低 0.3 $^{\circ}$ C~0.4 $^{\circ}$ C。这是因为: 1) 荧光-淬灭基团通过较长 linker 连接 dT (图 1), 2) Oligo 和 IDT 用最近-邻(nearest-neighbor)方法得到碱基平均热力学参数计算 Tm 值[35]。Oligo 只



是平均考虑修饰基团的 5'、3'、及中间位置影响, 实际上修饰基团越近 3'端对  $T_m$  影响越大, 3) Q5 DNA 聚合酶融合了 Sso7d DNA 结合域, 提高 DNA 聚合速度、持续合成能力、DNA 保真度和稳定性[36]。

## 5. 结论

本研究以隐-荧光 Hf 引物扩增 5851 bp 的隐-荧光 HfDNA, Oligo 和 IDT 为适合计算器。Hf 引物能够扩增 HfDNA, HfDNA-T5exo 外切产物经激光共聚焦显微镜定性检测 Fam 荧光素, 并用酶标仪定量检测荧光值, 探讨了 T5exo 切割 HfDNA 的酶促动力学参数  $K_m$  为 0.1 nM, 弥补了文献  $K_D$  不足。结果表明 HfDNA 可以代替放射性标记 DNA、非特异性荧光染料, 为 DNA 酶学性质研究提供了新材料。

## 基金项目

国家自然科学基金面上项目(31771915)。

## 参考文献

- [1] Sayers, J.R. and Eckstein, F. (1990) Properties of Overexpressed Phage T5 D15 Exonuclease. Similarities with *Escherichia coli* DNA polymerase I 5'-3' Exonuclease. *The 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)
- [2] 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>
- [3] Joseph, J.W. and Kolodner, R. (1983) Exonuclease VIII of *Escherichia coli*. II. Mechanism of Action. *The 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)
- [4] 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>
- [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] 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>
- [8] Druml, B., Kaltenbrunner, M., Hochegger, R. and Cichna-Markl, M. (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>
- [9] 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>
- [10] 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>
- [11] 马纪, 黄国霞, 姚运乾, 等. 光谱法结合凝胶电泳和荧光显微镜研究蔡与 DNA 的相互作用及其应用[J]. 分析科学学报, 2022, 38(5): 582-590.
- [12] Wang, Z., Ouyang, H., Tesauro, C., et al. (2018) Real-Time Analysis of Cleavage and Religation Activity of Human Topoisomerase 1 Based on Ternary Fluorescence Resonance Energy Transfer DNA Substrate. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **643**, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.02.006>
- [13] Kristoffersen, E.L., Jorgensen, L.A., Franch, O., et al. (2015) Real-Time Investigation of Human Topoisomerase I Reaction Kinetics Using an Optical Sensor: A Fast Method for Drug Screening and Determination of Active Enzyme Concentrations. *Nanoscale*, **7**, 9825-9834. <https://doi.org/10.1039/C5NR01474C>
- [14] 柳苏月, 田晶晶, 朱龙佼, 等. 核酸外切酶III辅助的 DNA 钽离子配合物时间分辨荧光检测黄曲霉毒素 B1 [J]. 分析化学, 2021, 49(8): 1327-1334.
- [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 I. *Sensors*, **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] 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>
- [18] Saiki, R., Gelfand, D., Stoffel, S., *et al.* (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, **239**, 487-491. <https://doi.org/10.1126/science.2448875>
- [19] Yang, A., Cheng, J., Liu, M., Shangguan, Y. and Liu, L. (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>
- [20] 黄亚威, 杨昂, 上官云杰, 等. 双退火温度 PCR 扩增 DNA [J]. 微生物学报, 2017, 57(8): 1262-1269.
- [21] 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.
- [22] 上官云杰, 梁亚萍, 杨昂, 等. 同源引物的非等量 PCR [J]. 河南科学, 2018, 36(3): 326-333.
- [23] Jameson, E.E., Roof, R.A., Whorton, M.R., *et al.* (2005) Real-Time Detection of Basal and Stimulated G Protein GTPase Activity Using Fluorescent GTP Analogues. *Journal of Biological Chemistry*, **280**, 7712-7719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M413810200>
- [24] van Oijen, A.M., Glainey, P.C., Crampton, D.J., *et al.* (2003) Single-Molecule Kinetics of  $\lambda$  Exonuclease Reveal Base Dependence and Dynamic Disorder. *Science*, **301**, 1235-1238. <https://doi.org/10.1126/science.1084387>
- [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**, Article No. 1488. <https://doi.org/10.3390/s16091488>
- [26] Zhang, R., Kwok, R.T.K., Tang, B. and Liu, B. (2015) Hybridization Induced Fluorescence Turn-on of of AIEgen-Oligonucleotide Conjugates for Specific DNA Detection. *RSC Advances*, **5**, 28332-28337. <https://doi.org/10.1039/C5RA00322A>
- [27] Cheng, Y., Stakenborg, T., Dorpe, P.V., *et al.* (2011) Fluorescence near Gold Nanoparticles for DNA Sensing. *Analytical Chemistry*, **83**, 1307-1314. <https://doi.org/10.1021/ac102463c>
- [28] Dubertret, B., Calame, M. and Libchaber, A.J. (2001) Single-Mismatch Detection Using Gold-Quenched Fluorescent Oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, **19**, 365-370. <https://doi.org/10.1038/86762>
- [29] Liu, F., Yang, Y., Wan, X., *et al.* (2022) Space-Confinement-Enhanced Fluorescence Detection of DNA on Hydrogel Particles Array. *ACS Nano*, **16**, 6266-6273. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c00157>
- [30] 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.
- [31] Spiliotis, M. (2012) Inverse Fusion PCR Cloning. *PLOS ONE*, **7**, e35407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035407>
- [32] 韩来闯, 马闪闪, 刘亚娟, 等. 构建重组质粒的三步 PCR 方法[J]. 河南科学, 2015, 33(8): 1321-1325.
- [33] 刘猛, 刘亚娟, 徐文选, 等. 长片断引物反向 PCR 方法构建重复序列的重组质粒[J]. 河南科学, 2016, 34(4): 501-505.
- [34] Breslauer, K.J., Frank, R., Blöcker, H. and Marky, L.A. (1986) Predicting DNA Duplex Stability from the Base Sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 3746-3750. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.11.3746>
- [35] Allawi, H.T. and Santa, L.J. (1997) Thermodynamics and NMR of Internal G-T Mismatches in DNA. *Biochemistry*, **36**, 10581-10594. <https://doi.org/10.1021/bi962590c>
- [36] Takagi, M., Nishioka, M., Kakahara, H., *et al.* (1997) Characterization of DNA Polymerase from *Pyrococcus* sp. Strain KOD1 and Its Application to PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 4504-4510. <https://doi.org/10.1128/aem.63.11.4504-4510.1997>