

## • 综述 •

## DGGE/TGGE 技术在微生物基因分类鉴定中的应用

冯佩英 综述 陆春 朱国兴 审校

**【摘要】** 变性梯度凝胶电泳/温度梯度凝胶电泳(DGGE/TGGE)是一种新的电泳技术,该技术具有分辨能力高、重复性好、操作简易和节省时间等特点。现就 DGGE/TGGE 技术原理及目前在微生物分类鉴定研究中的应用作一综述。

**【关键词】** 变性梯度凝胶电泳; 温度梯度凝胶电泳; 分类鉴定

分子生物学理论和技术的迅速发展给传统微生物分类鉴定带来了巨大的革新。人类可以从遗传进化的角度,在分子水平上对自然界的微生物进行分类和鉴定,使微生物的分类越来越科学和精确。其中以 DNA 指纹图谱为基础的微生物分型方法日新月异,它们包括变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, **DGGE**)、温度梯度凝胶电泳(temperature gradient gel electrophoresis, **TGGE**)、单链构象多态性分析(single strain conformation polymorphism, **SSCP**)、限制性片段长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, **RFLP**)、随机扩增 DNA 多态性分析(random amplified polymorphic DNA, **RAPD**)、扩增片段长度多态性分析(amplified fragment length polymorphism, **AFLP**)等。近年来, **DGGE/TGGE 技术在国外比较广泛地用于微生物种群多样性分析和微生物物种的鉴定中**,并已发展为成熟的商业性分子生物学技术。现就其在微生物基因分类与鉴定中的应用作一综述。

## DGGE/TGGE 技术原理

DGGE 的原理是:在碱基序列上存在差异的不同 DNA 双链解链时需要不同的变性剂浓度, DNA 双链一旦解链,其在聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速度将会急剧下降。因此,将 PCR 扩增得到的等长 DNA 片段加入到含有变性剂梯度的凝胶中进行电泳,序列不同的 DNA 片段就会在各自相应的变性剂浓度下变性,发生空间构型的变化,导致电泳速度的急剧下降,停留在与其相应的不同变性剂梯度位置,染色后可以在凝胶上呈现分开的条带。TGGE 的基本原理与 DGGE 相似,只是由变性剂形成的梯度被温度梯度所代替。双链 DNA 的溶解温度(melting temperature,  $T_m$ )值主要取决于 GC 含量的多少。当双链 DNA 分子的碱基序列发生单个碱基的微小变化即可引起  $T_m$  值发

生  $1.5^\circ\text{C}$  的改变。因此,  $T_m$  值可以作为一个特异性参数用于双链 DNA 分子的分离鉴定。根据这一特征, Riesner 和 Steger 于 1989 年首先提出了 TGGE 方法。片段电泳迁移率的不同可由仅仅一个碱基的改变引起,该碱基的改变可引起在不同温度条件下 DNA 双链的解链行为不同,从而达到在温度梯度电泳中分离的效果。

为取得好的分离效果,通常在 PCR 引物的 5' 末端连接上一段长度为 30~50 碱基富含 GC 的核苷酸序列,该序列被称为 GC 夹板。这样甚至可以分辨相差一个碱基的核酸序列。

根据 TGGE 温度梯度方向与电泳方向是否一致,可以进行两种模式的 TGGE:垂直 TGGE 和平行 TGGE。垂直 TGGE 的温度梯度方向与电泳方向垂直,用于测定待测双链 DNA 分子的  $T_m$  值,为 TGGE 水平电泳进行样品的精细分离提供合适的温度梯度,并判断双链 DNA 变性行为的可逆性。垂直 TGGE 电泳所选用的温度梯度跨度一般为  $50^\circ\text{C}$ 。目前, DNA 双链的变性行为可通过 Poland 软件进行预测(网址:<http://www.biophys.uni-duesseldorf.de/local/POLAND/poland.html>)。水平 TGGE 的温度梯度方向与电泳方向一致,一般采用优化后的电泳条件,可用于同时分析多个样品。水平 TGGE 电泳所需的温度梯度跨度约为  $10^\circ\text{C}$ 。同样,根据 DGGE 变性梯度方向与电泳方向是否一致,可将其分为两种形式的 DGGE:垂直 DGGE 和平行 DGGE。

DGGE/TGGE 技术的操作过程与常见的 SSCP 有些相似,但实验条件更易于控制,操作也更方便。基本操作步骤为:①电泳系统的安装;②样本制备;③聚丙烯酰胺凝胶灌制及上样;④ DGGE/TGGE 电泳及电泳后的染色。其中,聚丙烯酰胺凝胶的制备是实验成功的关键。

## TGGE 在微生物分类鉴定中的应用

1. 在病毒分类中的应用:乳头多瘤空泡病毒 JC 病毒(polyomavirus JC, JCV)可引起进行性多灶性脑

基金项目:广东省科技计划项目(2003C34205)

作者单位:510630 广州,中山大学附属第三医院皮肤性病科(冯佩英);400038 重庆,第三军医大学新桥医院(陆春、朱国兴)

白质病、多发性硬化等少见病。到目前为止,核酸序列分析可将 JCV 分为 5 个基因型。De-Santis 等<sup>[1]</sup>应用 DGGE 技术分析了 12 位来自不同国家的健康个体的尿液标本。5 株来自非洲的标本电泳出相同的带谱,为 3 型 JCV; 6 株欧洲的标本为 1 型 JCV; 1 株秘鲁的标本为 2 型 JCV。Riccardo 等认为如果扩大目的片段长度,有可能得出更多的病毒类型或亚型。

Matousek 等<sup>[2]</sup>利用 RT-PCR 扩增马铃薯病毒 Y 株分离株的 P1 基因 594bp 片段,后用 TGGE 进行电泳分析。他们发现 Nicola 分离株的整个 p1 cDNA 库的 TGGE 模式存在微小的核酸序列变异, Nicola p1/1 分离株与 Hungarian 分离株的克隆片段存在两处点突变差异。

最近有学者将 DGGE 技术应用于分析 RNA 病毒准种 (quasispecies) 的多样性<sup>[3]</sup>。所谓准种现象就是,在相对较短的时间内,因病原微生物核酸的突变,造成体内同时存在基因序列存在微小差别的种群。种群的各成员之间的差别程度一般不超过核苷酸总长度的 2%~5%, 这种差别不构成病原体不同的血清型或基因型。

2. 在细菌分类中的应用: 目前, DGGE/TGGE 技术已被广泛应用到微生物分子生态学研究上,用以确定自然环境中微生物群落的遗传多样性或分析富集微生物和微生物菌株的筛选,如高温热泉、湖泊、海洋、根围、土壤等。其原理是使用一对特异性引物 PCR 扩增微生物自然群体的 16S rRNA 基因,产生长度相同但序列有异的 DNA 片段的混合物,然后用 DGGE/TGGE 分离产物混合物。DGGE/TGGE 带谱中每条带可能代表一个不同的微生物物种,电泳带谱中条带的数量即反映了环境微生物菌落中优势类群的数量。为了得到更详细的信息,往往采用种或类群专一性探针与得到的条带进行杂交或建立细菌 16S rDNA 文库或将条带切割下来重新扩增后进行测序,从而进行系统发生发育分析。Cheung 等<sup>[4]</sup>用特异性引物 PCR 扩增被石油污染的土壤中分支杆菌属的 16S rRNA 基因,然后用 TGGE 分离产物混合物。TGGE 电泳的结果显示,严重污染的土壤中分支杆菌的多样性较轻度污染的土壤中的少。也有学者利用 PCR-TGGE 技术检测天然发酵的意大利香肠中乳酸菌属的种类,在他们检测的香肠中分离出 39 株乳酸菌属菌株,与传统的鉴定方法相比较,除了 5 株传统方法鉴定为 *L. curvatus* 的菌株被 PCR-TGGE 鉴定为 *L. sakei* 以外,其他的菌株两种方法鉴定结果均一致<sup>[5]</sup>。

通过对 DGGE/TGGE 条带测序得到的遗传信息,并结合已知的生理生化知识有助于发现新的微生物物种。1996 年,有学者成功地应用 DGGE 技术从一菌藻系共生体中分离纯化得到两个纯的菌种: *Desulfuribrio* sp 和 *Arcobacter* sp。与传统的以表观特征

描述来鉴定菌种的方法相比较,应用 DGGE 技术直接从 16S rRNA 基因分析入手,进行遗传多样性筛选,既可省去大量的重复工作,又可提高鉴定的准确性。

胃肠道中的微生物大部分不能用现有的培养方法进行分离和鉴定或是不能培养,而且绝大多数微生物的生长需要厌氧环境。厌氧培养对于观察菌群的多态性及动态变化是非常有限的。因此,应用分子生物技术为研究肠道微生态提供了简便而快捷的方法。DGGE/TGGE 技术是近年来逐渐被应用于检测人类胃肠道主要细菌类群的多态性及其系统发生关系研究的生物技术之一。有学者<sup>[6]</sup>认为, PCR-DGGE/TGGE 是检测和鉴定人类胃肠道内分支杆菌属和乳酸杆菌属等菌群的一种非常有效的技术,并可用以监测患者在应用抗生素后胃肠道菌群的改变。Favier 等<sup>[7]</sup>应用 PCR-DGGE 技术通过观察两例新生儿 10 个多月粪样菌群的动态变化来了解婴幼儿胃肠菌群的情况。DGGE 电泳结果显示,两例新生儿出生第 1 天的粪样细菌只泳动出 1~2 条较为明显的条带。1 月后电泳出的明显条带最多为 6 条,随后,电泳的带谱逐渐变得复杂、多样。粪样细菌的 16S rDNA 片段经 PCR 扩增及克隆测序结果显示,大部分细菌属双歧杆菌属、瘤胃球菌属、肠道球菌属、梭菌属和肠杆菌属。而 Nielsen 等<sup>[8]</sup>则应用 PCR-DGGE 技术分析 4 位受试者结肠中双歧杆菌、乳酸杆菌及其他乳酸菌的分布。他们从升结肠、横结肠和降结肠 3 个不同部位钳取活组织样本,经 PCR-DGGE 分析后显示在结肠中双歧杆菌的分布是单一的,而乳酸杆菌的分布则随着个体的差异和部位的不同而呈现不同的变化。

Burton 等<sup>[9]</sup>通过 PCR-DGGE 技术分析了 19 例绝经前期妇女阴道内菌群的情况,并对其 16S rRNA 基因的 V2、V3 区进行核酸测序。结果显示,大部分受试者阴道分泌物中含 1~3 种主要的 DNA 片段,经测序后显示 79% 的片段与乳酸菌属有高度的相似性,而且,其中的 42% 为 *Lactobacillus iners*。作者在另一项研究中<sup>[10]</sup>应用了 Nugent 记分法、PCR、PCR-DGGE 及核酸测序等 4 种方法检测 20 位绝经前期妇女阴道内菌群的情况,结果发现 70% 受试者阴道内存在中级的细菌定植或患有细菌性阴道炎。各种检测方法相比较, Burton 等认为 PCR-DGGE 技术是一种简便的、非培养性的检测阴道菌群的好方法。

McBain 等<sup>[11]</sup>通过 PCR-DGGE 技术分析了 3 个受试者应用含葡萄糖盐的双氯苯双胍己烷漱口水后口腔菌群的变化。PCR-DGGE 结果显示,含葡萄糖盐的双氯苯双胍己烷漱口水能明显减少口腔专性厌氧菌、专性需氧菌及兼性厌氧菌的数量,对 *Prevotella* sp. 和 *Selenomonas infelix* 也有明显的抑制作用,但对链球菌和放射菌类的抑制却存在个体差异。

3. 在真菌分类中的应用: Hernan-Gomez 等<sup>[12]</sup>通过 PCR 扩增了 74 株酒酵母菌株的 18S rRNA, 经

TGGE 分析其扩增产物后发现部分酵母存在种内差异,因此, Hernan 等认为 TGGE 是一种有效的筛选不同基因型的酒酵母的方法。DGGE/TGGE 技术可以同时分析多个样本,特别适合监测环境中微生物在时间和空间上的动态变化。最近,有报道应用 PCR-TGGE 方法进行小麦根围真菌菌落的多样性及其在时间和空间上动态变化的研究。

4. 在其他生物分类中的应用: 蝉是许多人兽共患病的传播媒介和贮存宿主,它可以传播多种致病性病原体,如巴柔氏螺旋体、立克次体、埃里希体属、无形体属及野兔热弗朗西丝菌等等。Schabereiter-Gurtner 等<sup>[13]</sup>应用 PCR-DGGE 技术研究硬蝉体内共生菌的情况,在 5 只硬蝉体内分离出斑疹伤寒的病原体立克次体、巴尔通氏体属、巴柔氏螺旋体、葡萄球菌、红球菌属、假单胞菌属、Maraxella 以及棘阿米巴属和柯克斯立克次体属的共生菌 *Folsomia Candida* 等病原体。因此 Schabereiter-Gurtner 等认为,无论蝉体内的共生菌是在细胞内还是细胞外,能否在体外培养,只要结合 PCR-DGGE 技术就可以进行病原体的检测及鉴定。McAuliffe 等<sup>[14]</sup>最近运用 PCR-DGGE 区分 32 种支原体属的菌株,发现有 27 株(85%)菌株可以通过该方法进行区分。McAuliffe 等认为 PCR-DGGE 技术可以快速鉴定多种支原体属菌株,特别适应于那些没有特异性 PCR 检测方法或只能通过培养或血清学检测的支原体。

除此之外, DGGE/TGGE 技术在检测基因的点突变、人类遗传病和肿瘤基因的研究、蛋白质分子结构和热稳定性研究等领域也得到广泛的应用。

#### DGGE/TGGE 技术的主要优缺点

DGGE/TGGE 技术具有以下特点<sup>[15]</sup>: (1) 分辨率高。温度梯度由微处理器控制,线性极为严格。2mm 的距离最大可对应 0.6℃ 的温度差,即使分子间的  $T_m$  差异极细微,也可以检测出来,能够 100% 检出只存在单碱基差异的突变个体。(2) 加样量小。1~5ng 的 DNA 或 RNA 上样量即可达到清晰的电泳分离效果。(3) 重复性好。电泳条件如温度、时间等易于控制,可保证电泳的重现性和结果的重复性。(4) 节约时间。小面积温度梯度板和小尺寸凝胶(7.4cm×8.2cm)只需要 2.5ml 凝胶溶液。电泳可在 30min 至 1h 内完成。(5) 操作简便、快速。BIO-RED 公司的 Dcode 普通突变检测系统最快在 2h 内可检测 64 个样品。

尽管 DGGE/TGGE 技术具有上面所提及的各种优点,但它也存在一定的局限性<sup>[15]</sup>。如 DGGE/TGGE 检测的 DNA 片段最适长度为 200~900bp,超出此范围的片段难以检测;PCR 扩增所需 G-C 碱基对含量至少达 40%;因 TGGE 仪器所允许的温度范围为 15~80℃,较大片段的  $T_m$  值会因接近 80℃ 而

增加检测的难度;如果电泳的条件不适宜,不能保证可以将有一定序列差异的 DNA 片段完全分开,从而会出现序列不同的 DNA 迁移在同一位置的现象。此外,在 DGGE/TGGE 检测的基础上往往需要结合杂交技术或核酸直接测序分析来得到更详尽的信息。

#### 展 望

自然界物种繁多,生物多样。人们在微生物、动植物及人类基因组研究中一直在努力寻找认识物种、开发新物种的方法。随着分子诊断技术的日益普及, DGGE/TGGE 技术将得到不断的完善和补充,将在自然群体的遗传变异、微生物的鉴定与监测、开发新物种等研究方面发挥重要作用。

#### 参 考 文 献

- 1 De-Santis R, Azzi A. Use of denaturing gradient gel electrophoresis for human polyomavirus JC sequence analysis. *J Virol Methods*, 2000, 85(1-2): 101-108.
- 2 Matousek J, Ptacek J, Dedic P, et al. Analysis of variability of P1 gene region of N strain of potato virus Y using temperature-gradient gel electrophoresis and DNA heteroduplex analysis. *Acta Virol*, 2000, 44(1): 41-46.
- 3 Harris KA, Teo CG. Diversity of hepatitis C virus quasispecies evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8(1): 62-73.
- 4 Cheung PY, Kinkle BK. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67(5): 2222-2229.
- 5 Cocolin L, Manzano M, Cantoni C, et al. Development of a rapid method for the identification of *Lactobacillus* spp. isolated from naturally fermented Italian sausages using a polymerase chain reaction-temperature gradient gel electrophoresis. *Lett Appl Microbiol*, 2000, 30(2): 126-129.
- 6 Tannock GW. Analysis of the intestinal microflora using molecular methods. *Eur J Clin Nutr*, 2002, 56 (Suppl 4): S44-S49.
- 7 Favier CF, Vaughan EE, De-Vos WM, et al. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(1): 219-226.
- 8 Nielsen DS, Moller PL, Rosenfeldt V, et al. Case study of the distribution of mucosa-associated *Bifidobacterium* species, *Lactobacillus* species, and other lactic acid bacteria in the human colon. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(12): 7545-7548.
- 9 Burton JP, Cadieux PA, Reid G. Improved understanding of the bacterial vaginal microbiota of women before and after probiotic instillation. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(1): 97-101.
- 10 Burton JP, Reid G. Evaluation of the bacterial vaginal flora of 20 postmenopausal women by direct (Nugent score) and molecular (polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis) techniques. *J* (下转第 100 页)

oxycholic acid, TDCA) 与 UDCA 共同孵育后可使诱导的 HepG2 细胞凋亡明显下降, UDCA 能显著抑制 TDCA 引起的细胞色素 C 的释放及其随后的 Caspase-9、3 蛋白酶活性的升高。稳定线粒体膜、阻止细胞色素 C 的释放及其随后的 Caspase-9、Caspase-3 活化是 UDCA 抗凋亡的主要机制<sup>[14]</sup>。

如何阻止肝细胞的过度凋亡, 将成为肝病研究领域新的热点, 如探索有效阻断 Fas 信号转导、caspase 蛋白酶及线粒体渗透性转换的方法等, 都是极富挑战性的课题。

### 结 语

在梗阻性黄疸肝损害的发生机制和发展变化中, 细胞凋亡扮演了重要角色。针对这一点的治疗方法可能在今后的临床工作中具有指导意义。但目前的研究工作仍未能阐明其详细和精确的过程, 尤其是初始时相及各条途径的相互关系和调节作用, 还需要大量的工作以明确很多细节, 为完善临床治疗奠定基础。

### 参 考 文 献

- 1 Kurosawa H, Que FG, Roberts LR, et al. Hepatocytes in the bile duct-ligated rat express Bcl-2. *Am J Physiol*, 1997, 272(6 Pt 1): G1587-G1593.
- 2 Iwata M, Harada K, Hiramatsu K, et al. Fas ligand expressing mononuclear cells around intrahepatic bile ducts co-express CD68 in primary biliary cirrhosis. *Liver*, 2000, 20(2): 129-135.
- 3 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 1998, 281(5381): 1322-1326.
- 4 Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, et al. Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterology*, 1999, 117(3): 669-677.

- 5 Li D, Sun J, Sun H, et al. Bile salt induces apoptosis of hepatocytes: the mechanism of hepatic function injury during obstructive jaundice. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*, 1998, 36(10): 624-626, 117.
- 6 Faubion WA, Guicciardi ME, Miyoshi H, et al. Toxic bile salts induce rodent hepatocyte apoptosis via direct activation of Fas. *J Clin Invest*, 1999, 103(1): 137-145.
- 7 Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease. *Am J Med*, 2000, 108(7): 567-574.
- 8 王剑明, 孙宏武, 邹倩, 等. 阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡及相关基因 bcl-2、bax 的表达. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(1): 32-33.
- 9 王剑明, 邹倩, 邹声泉. bcl-2 基因在阻塞性黄疸大鼠肝组织细胞凋亡中作用的研究. *世界华人消化杂志*, 1999, 7(12): 1035-1037.
- 10 Celli A, Que FG. Dysregulation of apoptosis in the cholangiopathies and cholangiocarcinoma. *Semin Liver Dis*, 1998, 18(2): 177-185.
- 11 Rodrigues CM, Fan G, Ma X, et al. A novel role for ursodeoxycholic acid in inhibiting apoptosis by modulating mitochondrial membrane perturbation. *J Clin Invest*, 1998, 101(12): 2790-2799.
- 12 Lieser MJ, Park J, Natori S, et al. Cholestasis confers resistance to the rat liver mitochondrial permeability transition. *Gastroenterology*, 1998, 115(3): 693-701.
- 13 Paumgartner G, Beuers U. Ursodeoxycholic acid in cholestatic liver disease: mechanisms of action and therapeutic use revisited. *Hepatology*, 2002, 36(3): 525-531.
- 14 谢青, 李光明, 周霞秋, 等. 牛磺酸熊脱氧胆酸对细胞色素 C 介导 HepG2 细胞凋亡的作用. *中华肝脏病杂志*, 2003, 11(5): 298-301.

(收稿日期: 2003-06-23)

(本文编辑: 杨庆华)

(上接第 97 页)

- Infect Dis, 2002, 186(12): 1770-1780.
- 11 McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, et al. Effects of a chlorhexidine gluconate-containing mouthwash on the vitality and antimicrobial susceptibility of in vitro oral bacterial ecosystems. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(8): 4770-4776.
  - 12 Hernan-Gomez S, Espinosa JC, Ubeda JF. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *FEMS Microbiol Lett*, 2000, 193(1): 45-50.
  - 13 Schabereiter-Gurtner C, Lubitz W, Rolleke S. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE

fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J Microbiol Methods*, 2003, 52(2): 251-260.

- 14 McAuliffe L, Ellis RJ, Ayling RD, et al. Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(10): 4844-4847.
- 15 Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, et al. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol*, 2002, 4(11): 634-643.

(收稿日期: 2004-04-16)

(本文编辑: 张卡琳)