

引文格式:

黄亚佳, 倪磊, 金帆, 等. 基于高通量显微成像及分析技术的 DNA 重排研究 [J]. 集成技术, 2019, 8(6): 31-38.

Huang YJ, Ni L, Jin F, et al. Measurement of DNA rearrangement by high-throughput microscopy imaging and analysis [J]. Journal of Integration Technology, 2019, 8(6): 31-38.

基于高通量显微成像及分析技术的 DNA 重排研究

黄亚佳^{1,2} 倪磊² 金帆² 杨光¹

¹(华中科技大学生命科学与技术学院 武汉 430074)

²(中国科学院深圳先进技术研究院 深圳 518055)

摘 要 直接的重复序列广泛地存在于真核和原核细胞基因组中, 并且与多种疾病 (如遗传性神经肌肉神经退行性疾病等) 相关, 因此定量重复序列的删除变得非常重要。结合高通量显微成像和分析技术, 该文设计了基于三色荧光报告系统的方法来定量重复序列删除的发生。结果显示, 在铜绿假单胞菌中, 重复序列的删除频率在 *recA* 基因缺失突变株中明显降低, 而 RadA 蛋白和 UvrD 蛋白的缺失则会提高重复序列的删除频率, 并且重复序列的删除与细菌的生长率和启动子等因素无关。该研究有助于加深对直接重复序列相关问题的理解, 并为直接重复序列删除定量提供了新的方法。

关键词 高通量; 显微成像和分析技术; DNA 重排; 重复序列删除

中图分类号 R 318.51 文献标志码 A doi: 10.12146/j.issn.2095-3135.20190814001

Measurement of DNA Rearrangement by High-Throughput Microscopy Imaging and Analysis

HUANG Yajia^{1,2} NI Lei² JIN Fan² YANG Guang¹

¹(College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

²(Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

Abstract Direct repeat sequences widely exist in eukaryotic and prokaryotic genomes, which involves in human diseases like hereditary neuromuscular neurodegenerative disease. Thus, it is of great importance to quantify the frequency of the deletion of direct repeat sequences. Using the high-throughput microscopy imaging and analysis technology, we designed a three-color fluorescent-based reporter system to quantify the frequency of the deletion of direct repeat sequences. We found that the frequency of the deletion of direct repeat sequences decreased in the *recA* mutant in *P. aeruginosa*, and the absence of RadA and UvrD increased the occurrence

收稿日期: 2019-08-14 修回日期: 2019-08-19

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31270150、21774039)

作者简介: 黄亚佳, 博士, 研究方向为合成生物学; 倪磊, 博士, 研究方向为生物被膜及其防治; 金帆, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为合成生物学及微生物社会学; 杨光 (通讯作者), 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为生物材料与生物大分子, E-mail: yang_sunny@yahoo.com。

frequency of the deletion of direct repeat sequences, but the frequency of the deletion of direct repeat sequences was independent of the following factors: fitness or promoter variants etc. This work can be helpful to the further understanding of the deletion of direct repeat sequences, which also provide a novel method to quantify the deletion of direct repeat sequences.

Keywords high-throughput; microscopy imaging and analysis technology; DNA rearrangement; deletion of repeat sequences

1 引 言

重组是真核和原核细胞修复脱氧核糖核酸 (DNA) 损伤的重要途径^[1-2]。重组包含两种: 保守的重组事件和非保守的重组事件^[3]。其中, 保守的重组事件通常是由重组蛋白 RecA 介导的, 如通常所说的同源重组; 而非保守的重组事件通常不依赖于 RecA, 如单链退火。重复片段是发生重组所必需的, 而重复片段常出现在基因组中, 这种重复片段的出现会造成重复片段的加倍或重复片段的删除^[4]。而重复 DNA 片段的删除包含几种可能的机制^[5-8]: 染色体交换、非平衡姊妹染色体交换、单链退火、复制滑移和非完全重组等。其中, 染色体交换、非平衡姊妹染色体交换依赖于重组蛋白 RecA, 单链退火、复制滑移和非完全重组则不依赖于 RecA。DNA 聚合酶的阻滞会导致复制机制催化的 DNA 重排, 而复制错误可能会对基因结构产生重要的影响, 因为这可能造成小同源片段的引入而扰乱基因组, 或者造成片段删除或重复序列的扩增。

重复片段广泛地存在于真核和原核细胞中, 其重复序列的长度也由几个碱基对到几千个碱基对不等。例如, 人基因组中有 3% 的基因存在重复片段, 并且其中大部分重复序列存在于基因编码区^[9]。重复序列不仅能影响调控基因的表达^[10], 也能影响信使 RNA (核糖核酸) 的翻译^[11-12]。而重复序列的删除可能造成大片段

基因序列的缺失而引起相关的疾病, 如常见的染色体缺失引起的腭心面综合征^[13]、卡恩斯-塞尔综合征和进行性眼外肌瘫痪^[14]等。甚至重复序列的删除还能帮助筛选出具有更强耐药性的耐药金黄色葡萄球菌^[15]。因此, 研究重复序列的删除具有非常重要的意义, 而对重复序列删除频率的定量能进一步加深对重复序列的理解。

目前, 定量重复片段删除频率的方法包括物理方法、生物信息学方法和生物标记物筛选方法。其中, 物理方法, 即同位素标记或电镜观察等物理学方法^[16-19]。该方法虽然直接, 但很难获取进一步的发生概率等数据。生物信息学方法^[20-23], 即基因组测序及比对技术。该方法可以通过系谱构建、基因组测序比对和高密度多态性位点的确认等来估算同源重组频率, 研究人员可以搜寻到基因组上的重组发生热点以及获取重组频率的多态性信息等。生物标记物筛选方法^[24-25], 如通过抗性基因筛选等, 则多用于细菌中来定量同源重组。但源于菌斑计数的方法存在较高的误差, 限制了该方法在定量重组上的应用。

随着成像技术的发展, 显微镜技术在生物学研究中获得了广泛地应用, 近年来更是应用到了医学领域, 如荧光显微镜应用于颅内恶性肿瘤的切除以及自动化检测血液残留白细胞等^[26]。因此, 为了快速而准确地定量细菌基因组中重复序列删除的频率, 本文结合高通量显微成像和分析技术, 设计了一套三色荧光报告系统来精准地定量细菌基因组中重复序列删除的频率。

2 材料与方 法

2.1 实验材料

胰蛋白胨培养基(生工生物工程(上海)股份有限公司), 硫酸庆大霉素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 细菌电穿孔仪(伯乐生命医学产品(上海)有限公司), 生化培养箱(上海丙林电子科技有限公司), 立式摇床(德国 SUSS MicroTec 公司), A2 生物安全柜(赛默飞赛尔科技(中国)有限公司, 1300 系列), 激光共聚焦显微镜(奥林巴斯(中国)有限公司, FV1000)。

2.2 实验方法

2.2.1 细菌培养条件

大肠杆菌(*E. coli*)和铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*)使用胰蛋白胨培养基(LB)在 37 °C 条件下进行培养, 其中活化培养时间为 16~20 h, 实验培养时间为 20 h。使用的抗生素浓度如下: 大肠杆菌中庆大霉素终浓度为 15 µg/mL、羧苄青霉素终浓度为 100 µg/mL, 铜绿假单胞菌中庆大霉素终浓度为 30 µg/mL。具体实验流程如下: (1)将保存在 35% 甘油体系于 -80 °C 冰箱的目标菌种, 划线于 LB 琼脂板(或添加相应抗性)并加入需要的抗生素于 37 °C 培养 20~24 h; (2)刮取细菌重悬至 20 µL 的双蒸水中, 并取 2 µL 点板至相应的 LB 琼脂板上, 在 37 °C 继续培养 20 h; (3)培养完毕后用接种环刮取全部目标菌株并转移至 1 mL 10% 无菌(0.22 µm 滤膜过滤)蔗糖溶液中重悬, 并低速涡旋 15 s 后备用; (4)吸取 3~4 µL 菌液滴于 0.8 cm×0.8 cm 的 2% 限制性培养基(FAB)琼脂糖薄片上, 并将样品反压至玻璃表面, 最终安放至显微镜实验平台。

2.2.2 快速 XY 扫描成像

显微镜采用电动位移台实现水平方向的移动, 搭载的美国科学设备公司(ASI)的 MS2000 自动化 XY 台包含 RS232 和 USB 接口, 以及闭环随动系统可实现对 X 和 Y 轴的精确位置控

制^[27]。电脑通过串口 RS232 连接 MS2000 自动化台, 同时通过程序设置实现载物台的快速移动, 从而实现快速 XY 扫描成像。

2.2.3 高通量数据获取及分析

为了获取可靠的数据并降低实验误差, 本文采用高通量的方法采集数据并进行分析。绿色、红色和橙色三色荧光图像通过搭载的 sCMOS 相机(Zyla 4.2 Andor)的激光共聚焦显微镜(Olympus FV1000, 100 倍油镜)获得, 每个样品连续采集 400~600 不等的视野图像, 每个视野中包含 400~1 000 个细菌不等, 即每个样品包含的细菌数目 $1 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^5$ 个不等。获得的荧光数据通过图像处理软件(ImageJ)处理及 MatLab 数据分析并进行串光校正后获得最终的重组体比例。具体的串光校正过程如下: 即通过对特定的绿色、红色和橙色荧光蛋白进行纯化, 并标定其相关的荧光强度和其他接收通道的荧光强度(如在红光通道测定绿色荧光蛋白荧光强度), 并计算串光比。MatLab 算法中, 识别橙色荧光作为细菌的轮廓(图 1), 用于计算细菌的绿色荧光和红色荧光, 从而判定重复 DNA 序列是否删除。

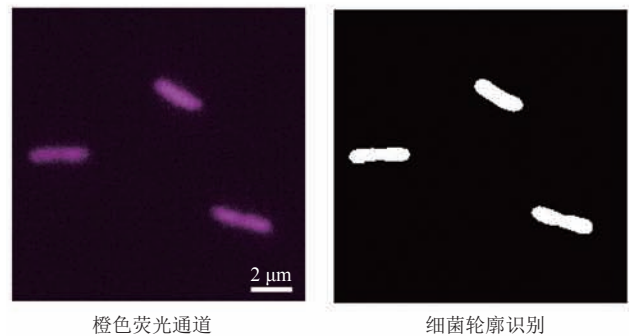


图 1 荧光标记细菌的识别

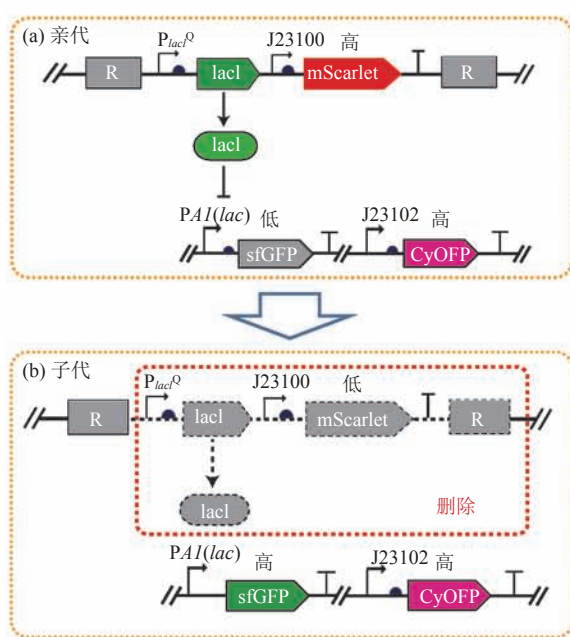
Fig. 1 Recognition of fluorescent-marked bacterial cells

3 实验结果

3.1 细菌 DNA 重排的判断

为了可以精确地测定细菌中同源重组发生的概率, 建立了三色荧光定量系统, 设计了如

图 2(a) 所示的基因回路, 包括重组单元和荧光报告单元两部分。其中, 重组单元包括一定长度的同源重组臂、LacI 蛋白表达基因 *lacI* 以及红色荧光蛋白 mScarletI; 而荧光报告单元则包括作为内标的橙色荧光蛋白 CyOFP1 和受 LacI 蛋白抑制的启动子 P_{A10403} 表达的绿色荧光蛋白 SfGFP。如图 2(b) 所示, 红色荧光蛋白消失且绿色荧光蛋白表达, 则表示重复 DNA 片段的删除。



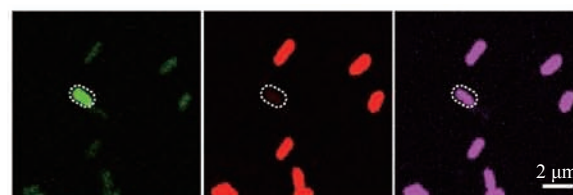
(a) 亲代基因型示意图; (b) 子代基因型示意图

图 2 重复序列删除检测单元示意图

Fig. 2 Diagram of the module for determining the deletion of repeat sequences

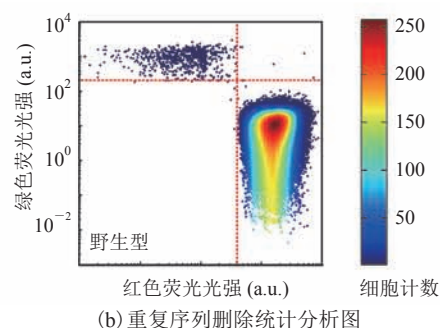
也就是说, 可以通过三色荧光蛋白表达的强弱来判定是否有重复 DNA 片段删除发生, 即原始状态下的绿色、红色和橙色荧光蛋白的表达强度分别为低、高和高, 而片段删除状态下的三色荧光蛋白表达强度分别为高、低和高(图 3(a))。因此, 通过 MatLab 算法计算得到了野生型单细菌的绿色和红色荧光光强, 并将所有统计到的细菌光强值作图(图 3(b))。图 3(b) 中左上区域的细菌拥有高表达的绿色荧光蛋白和低表达的红色荧光蛋白, 因此被认为发生了重复 DNA 片段的

删除。而图 3(b) 右下区域的细菌拥有高表达的红色荧光蛋白和低表达的绿色荧光蛋白, 因此被认为仍处于原始状态, 没有发生重复 DNA 片段的删除。



绿色荧光通道 红色荧光通道 橙色荧光通道

(a) 重复序列删除示意图



(b) 重复序列删除统计分析图

图 3 重复序列删除的判定及统计分析

Fig. 3 Determination and statistical analysis of deletion of repeat sequences

3.2 重组突变株的 DNA 重排定量

细菌重复 DNA 片段的删除来源于保守重组和非保守事件, 因此涉及到重组过程的相关蛋白是否对重复 DNA 片段的删除产生影响呢? 于是, 本文在野生型菌株的基础上对重组相关基因进行了敲除, 并用高通量显微成像及分析技术计算了重复 DNA 片段删除频率。如图 4 和表 1 所示, 相比于野生型, *RecA* 蛋白缺失突变株的重复 DNA 片段删除频率明显降低 ($P < 0.001$), 表明在当前条件下, DNA 序列重排是 *RecA* 依赖型的; 而相比于野生型, *RadA* 蛋白和 *UvrD* 蛋白缺失突变株的重复 DNA 片段删除频率均有不同程度的上升 (*radA*: $P < 0.05$, *uvrD*: $P < 0.01$)。而其他的, 如 *mutS*、*recF*、*recJ*、*recO*、*radA*、*recN*、*recQ*、*uvrD*、*sbcC* 等基因缺失突变株则无显著性差异。

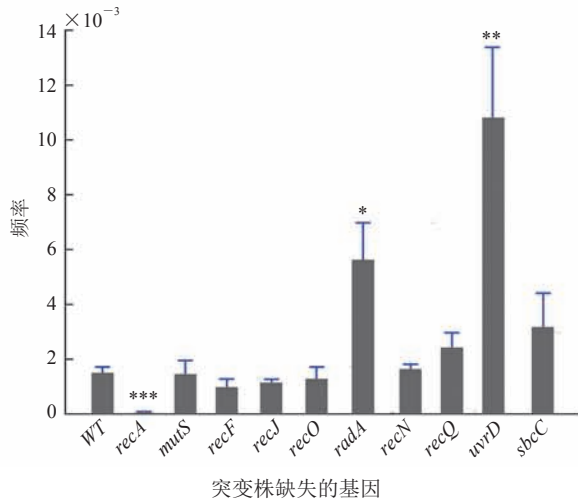


图 4 重组相关基因突变株的重复 DNA 片段删除的测定
(*** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

Fig. 4 Measurements of the deletion of repeat sequences in recombination related mutants (***) $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

表 1 重组突变株的重复 DNA 片段删除频率及其相对生长率

Table 1 Frequency of deletion of repeat DNA sequences and fitness in recombination related mutants

突变株 (基因型)	重复片段删除频率 (均值)	相对生长率
野生型	1.5×10^{-3}	1.00
recA	5.0×10^{-3}	0.79
mutS	1.5×10^{-3}	0.86
recF	9.9×10^{-4}	0.79
recJ	1.1×10^{-3}	0.87
recO	1.3×10^{-3}	0.85
radA	5.6×10^{-3}	0.83
recN	1.5×10^{-3}	0.91
recQ	2.4×10^{-3}	0.90
uvrD	1.1×10^{-2}	0.79
sbcC	3.2×10^{-3}	0.96

3.3 生长率对 DNA 重排定量的影响

重组相关蛋白的缺失会在一定程度上影响重复 DNA 片段的删除。为了验证重组相关蛋白的缺失与重复 DNA 片段的删除是否相关, 本文测定了重组相关蛋白突变株的生长率。如表 1 所示, 重组相关蛋白突变株的生长率相对野生型均有不同程度的下降, 但生长率与重复 DNA 片段

的删除频率没有相关性。同时, 本文还测试了相同菌株在不同温度即不同生长率下重复 DNA 片段的删除频率, 如图 5 所示。结果发现, 不同温度下的删除频率间无显著性差异。这表明, 生长率的变化不会影响重复 DNA 片段删除频率的定量。

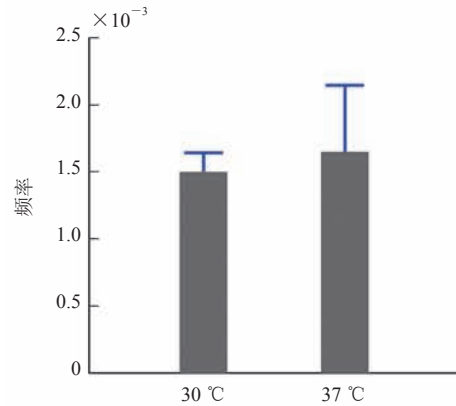


图 5 不同温度下突变株的重复 DNA 片段删除的测定

Fig. 5 Measurements of the deletion of repeat sequences under different temperatures

3.4 启动子对 DNA 重排定量的影响

有文献报道转录会影响重组事件的发生^[3]。因此, 本文测定了不同启动子条件下的细菌重复 DNA 删除的频率。图 6(a)显示, 启动子 J23100、J23106 和 J23109 的重复 DNA 删除频率与野生型间没有显著性差异, 而 J23105 和 J23112 则有略微地上升。总体来讲, 不同启动子对 DNA 的重排影响不大。同样地, 如图 6(b)所示, 在不同转录调节结合区启动子下, 测定了细菌重复 DNA 删除的频率也发现, 其重复 DNA 删除频率没有显著性差异。由此可见, 启动子并不会影响对 DNA 重排频率的定量。

4 讨论与分析

多色荧光蛋白定量结合高通量显微镜成像和分析技术使得对重复 DNA 片段删除的定量更加快速而准确, 前人在探究重复片段删除频率上也有过相应的方法, 如同位素标记及电镜观察

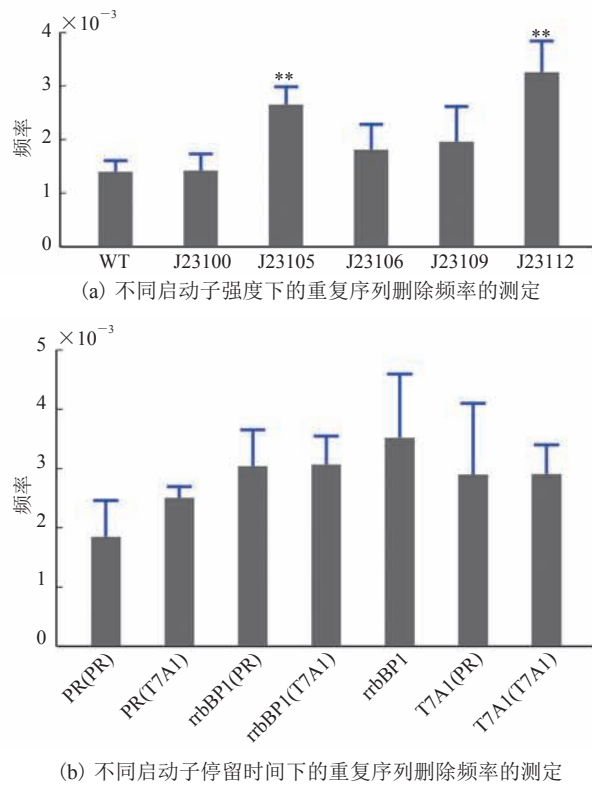


图6 不同启动子条件下突变株的重复DNA片段删除的测定 (** $P < 0.01$)

Fig. 6 Measurements of the deletion of repeat sequences under different promoters (** $P < 0.01$)

法^[17-19]。该方法可以观测到具体的重复序列或者同源序列交换的物理过程，但无法对其进行精准的定量。再比如基于基因组测序对比的生物信息学方法^[28-29]，该方法通量高，但是多用于高数据量的真核细胞基因组，并且相应的算法繁杂并且假阳性率高。而常见的生物标记法^[30-31]，虽然可以通过检测抗性基因的表达来判定重组或重排过程，但其测量误差往往较大。而本文设计的荧光报告基因的方法不仅快速易操作，而且测量精度更高。

当然，本文方法也有待利用荧光报告基因的方法进一步地探究其他的基因结构对重复DNA片段删除定量的影响。值得一提的是，转录影响重组事件的发生在本文设计的实验中没有被发现，因此需要进一步探索。当然，该方法在其他

相关领域也有一定的应用前景，如利用此定量方法可以探究不同生理条件、不同信号分子、不同基因组结构甚至不同外部刺激信号对重复DNA片段删除频率定量的影响。本文对基本的方法学进行了介绍，主要聚焦于显微成像技术的应用及其相关分析技术，后续需要对该方法进行进一步的生物学表征和分析，包括对重复片段删除的发生概率的计算及其进一步的生物学意义和应用开发等。

5 结论

随着显微成像技术的发展，高通量显微镜成像和分析技术在生物学中的优势越来越明显。

本文设计了一种细菌体内定量重复DNA片段删除的方法，并用此方法测定了铜绿假单胞菌中重复DNA片段删除的发生频率。结果发现，铜绿假单胞菌中的重复DNA片段删除频率在RecA蛋白缺失突变株中会明显降低，并且RadA蛋白和UvrD蛋白的缺失均在一定程度上提高了重复DNA片段的删除频率，而细菌的生长率和启动子的变化并不会影响重复DNA片段删除频率的定量。

参考文献

- [1] Ceccaldi R, Rondinelli B, D'Andrea AD. Repair pathway choices and consequences at the double-strand break [J]. Trends in Cell Biology, 2016, 26(1): 52-64.
- [2] Kowalczykowski S. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA repair [J]. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2015, 7(11): a016410.
- [3] Klein HL. Genetic control of intrachromosomal recombination [J]. Bioessays, 1995, 17(2): 147-159.
- [4] Kuzminov A. Homologous recombination-

- experimental systems, analysis, and significance [J]. *EcoSal Plus*, 2011, 4(2): 10.1128/ecosalplus.7.2.6.
- [5] Lovett ST, Gluckman TJ, Simon PJ, et al. Recombination between repeats in *Escherichia coli* by a *recA*-independent, proximity-sensitive mechanism [J]. *Molecular and General Genetics: MGG*, 1994, 245(3): 294-300.
- [6] Goldfless SJ, Morag AS, Belisle KA, et al. DNA repeat rearrangements mediated by DnaK-dependent replication fork repair [J]. *Molecular Cell*, 2006, 21(5): 595-604.
- [7] Lovett ST. Encoded errors: mutations and rearrangements mediated by misalignment at repetitive DNA sequences [J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 52(5): 1243-1253.
- [8] Michel B. Replication fork arrest and DNA recombination [J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(4): 173-178.
- [9] Kim K, Bang S, Yoo DA, et al. De novo emergence and potential function of human-specific tandem repeats in brain-related loci [J]. *Human Genetics*, 2019, 138(6): 661-672.
- [10] Vences MD, Legendre M, Caldara M, et al. Unstable tandem repeats in promoters confer transcriptional evolvability [J]. *Science*, 2009, 324(5931): 1213-1216.
- [11] Kawakami K, Watanabe G. Identification and functional analysis of single nucleotide polymorphism in the tandem repeat sequence of thymidylate synthase gene [J]. *Cancer Research*, 2003, 63(18): 6004-6007.
- [12] Kawakami K, Salonga D, Park JM, et al. Different lengths of a polymorphic repeat sequence in the thymidylate synthase gene affect translational efficiency but not its gene expression [J]. *Clinical Cancer Research*, 2001, 7(12): 4096-4101.
- [13] Edelmann L, Pandita RK, Morrow BE. Low-copy repeats mediate the common 3-Mb deletion in patients with velo-cardio-facial syndrome [J]. *The American Journal of Human Genetics*, 1999, 64(4): 1076-1086.
- [14] Schon E, Rizzuto R, Moraes CT, et al. A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA [J]. *Science*, 1989, 244(4902): 346-349.
- [15] Madoff LC, Michel JL, Gong EW, et al. Group B streptococci escape host immunity by deletion of tandem repeat elements of the alpha C protein [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(9): 4131-4136.
- [16] Stahl FW, McMilin KD, Stahl MM. An enhancing role for DNA synthesis in formation of bacteriophage lambda recombinants [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1972, 69(12): 3598-3601.
- [17] Meselson M, Weigle JJ. Chromosome breakage accompanying genetic recombination in bacteriophage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1961, 47(6): 857-868.
- [18] Fishel RA, James AA, Kolodner R. *recA*-independent general genetic recombination of plasmids [J]. *Nature*, 1981, 294(5837): 184-186.
- [19] Kolodner R. Genetic recombination of bacterial plasmid DNA: electron microscopic analysis of *in vitro* intramolecular recombination [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(8): 4847-4851.
- [20] Duret L, Arndt PF. The impact of recombination on nucleotide substitutions in the human genome [J].

- PLoS Genetics, 2008, 4 (5): e1000071.
- [21] Marttinen P, Hanage WP, Croucher NJ, et al. Detection of recombination events in bacterial genomes from large population samples [J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 40(1): e6.
- [22] González-Torres P, Rodríguez-Mateos F, Antón J, et al. Impact of homologous recombination on the evolution of prokaryotic core genomes [J]. *mBio*, 2019, 10(1): e02494-18.
- [23] Sekulovic O, Garrett EM, Bourgeois J, et al. Genome-wide detection of conservative site-specific recombination in bacteria [J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(4): e1007332.
- [24] Bi X, Liu LF. *recA*-independent and *recA*-dependent intramolecular plasmid recombination: differential homology requirement and distance effect [J]. *Journal of Molecular Biology*, 1994, 235(2): 414-423.
- [25] Ithurbide S, Bentchikou E, Coste G, et al. Single strand annealing plays a major role in *recA*-independent recombination between repeated sequences in the radioresistant deinococcus radiodurans bacterium [J]. *PLoS Genetics*, 2015, 11(10): e1005636.
- [26] 孙连杰, 董军, 高峰, 等. 荧光显微镜在颅内恶性肿瘤切除术中的应用 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2019, 24(4): 197-199.
- [27] 夏爱国. 自适应集成显微系统及微流控在细菌研究中的应用 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2018.
- [28] Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, et al. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions [J]. *Science*, 2011, 331(6016): 430-434.
- [29] Kosakovsky Pond SL, Posada D, Gravenor MB, et al. Automated phylogenetic detection of recombination using a genetic algorithm [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, 23(10): 1891-1901.
- [30] Rodríguez-Beltrán J, Tourret J, Tenaillon O, et al. High recombinant frequency in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, 32(7): 1708-1716.
- [31] López E, Blázquez J. Effect of subinhibitory concentrations of antibiotics on intrachromosomal homologous recombination in *Escherichia coli* [J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(8): 3411-3415.