

制备炭疽芽胞杆菌检测基因芯片的初步研究

马晓冬¹ 马文丽^{1*} 孙朝晖² 吕 梁¹ 郑文岭²

(¹ 第一军医大学分子生物学研究所 广州 510515)

(² 广州军区总医院肿瘤分子生物学研究所 广州 510010)

摘 要 建立制备炭疽芽胞杆菌检测基因芯片的技术,并探讨研制检测炭疽芽胞杆菌基因芯片的方法。酶切炭疽芽胞杆菌的毒素质粒和荚膜质粒,通过建立质粒 DNA 文库的方法获取探针,并打印在经过氨基化修饰的玻璃片上,制成用于炭疽芽胞杆菌检测的基因芯片。收集了 290 个阳性克隆探针,制备了检测炭疽芽胞杆菌的基因芯片。提取炭疽芽胞杆菌质粒 DNA 与基因芯片杂交,经 ScanArray Lite 芯片阅读仪扫描得到初步的杂交荧光图像。通过分析探针的杂交信号初步筛选出 273 个基因片段作为芯片下一步研究的探针。

关键词 炭疽芽胞杆菌,基因芯片,分子探针

中图分类号:Q785 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)03-0299-05

炭疽是由炭疽芽胞杆菌引起的人畜共患疾病。炭疽芽胞杆菌存在于感染动物及人的各个组织及排泄物中,其芽胞存在于受污染的土壤、水草、皮毛及其制品中,该菌及其芽胞常从呼吸道、消化道或破损的皮肤侵入人或动物体内,可迅速引起全身性的感染,常导致人或动物休克及死亡。然而,在自然界中还有许多类似炭疽的芽胞杆菌,如苏云金芽胞杆菌(*Bacillus thuringiensis*)、蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)等,这些细菌对人类没有致病性,非常广泛地存在于自然界中。它们在常规细菌学诊断上与炭疽芽胞杆菌有许多相似之处,容易混淆。因此,对于炭疽芽胞杆菌和其相似细菌进行快速、准确鉴定具有重要的意义。

目前检测炭疽芽胞杆菌的方法很多,包括分离培养技术、免疫学、核酸、分析化学和生物传感器等技术。从临床患者和病畜标本中分离炭疽芽胞杆菌是比较简便的,但从环境样品中分离和鉴定芽胞则相对较困难,主要是缺乏有效的富集方法。酶联免疫吸附(ELISA)检测多聚 D-谷氨酸荚膜抗体较敏感,但病例和对照抗荚膜抗体效价有一定交叉,使其特异性受到影响。近年来发展的各种核酸杂交方法和聚合酶链反应(PCR)方法可对其进行定性、半定量和定量检测,但核酸杂交虽有一定的特异性,但敏感性较低,而 PCR 操作容易造成交叉污染,假阳性、

假阴性结果经常出现,且存在操作较繁琐、检测的效率和自动化程度不高。因而发展更有效、更科学、更直接、简化的方法,用于炭疽杆菌的临床检测十分必要。最近发展迅速的生物高新技术——DNA 芯片技术为炭疽杆菌的鉴别诊断提供了一种高效、敏感、特异、经济、自动化的方法^[1]。本研究以炭疽芽胞杆菌毒素质粒 pX01 和荚膜质粒 pX02 为原材料,并使用限制性内切酶 *Sau3AI* 结合 AT 克隆方法扩增炭疽芽胞杆菌质粒的基因片段作为探针来制备炭疽检测芯片,以限制性显示技术标记炭疽芽胞杆菌质粒 DNA 与基因芯片进行了杂交分析,并对病原检测芯片的技术进行了初步研究,旨在为炭疽芽胞杆菌检测基因芯片的广泛运用打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

炭疽芽胞杆菌质粒 pX01 和 pX02 由兰州生物制品研究所提供。受体菌 TOP10 由本室保存。二甲基亚砜(DMSO)、甲酰胺购自上海生物工程有限公司; *Sau3AI*、pMD18-T vector、dNTP 及 PCR 试剂购自大连宝生物工程有限公司; 3S PCR 产物纯化试剂盒购自上海申能博彩生物科技有限公司; pMD18-T 载体上的鉴定/测序引物 SO100(5'-GTAAAACGACGGC-CAGT-3')、SO101(5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')及

基金项目:国家自然科学基金(39880032);广州市重大科技攻关项目(99-Z-022-01)

* 通讯作者。Tel:86-20-61648210; Fax:86-20-61647755; E-mail:wenli@fimmu.com

作者简介:马晓冬(1975-),男,硕士研究生,河南安阳人,研究方向为 DNA 芯片技术及其临床应用研究。E-mail:mxd@fimmu.com

其他作者:王洪敏¹,石 嵘¹

收稿日期:2003-08-22,修回日期:2003-12-08

接头均由本室合成,组成接头的两个寡核苷酸分别为 SIP:5'-GATCCACACCAGCCAAACCA-3', SIR:5'-GGTTTGGCTGCTGTG-3', 标记 Cy5 的通用引物 U:5'-GTTTGGCTGCTGTGGATC-3' 购自 Amersham Pharmacia。

PixSys5500 基因芯片点样仪,购自美国 Cartesian 公司,紫外交联仪购自 BIO-RAD,ScanArray Lite 基因芯片扫描仪购自 GSI Lumoncis 公司。CMT-GAPS™ 氨基硅烷包被的玻璃片及芯片杂交盒购自 Corning。

1.2 芯片探针的制备

基因芯片探针的制备采用限制性内切酶 *Sau3AI* 酶切质粒 DNA,并结合 AT 克隆方法。主要步骤如下:用 *Sau3AI* 对炭疽芽胞杆菌毒素质粒 pX01 和荚膜质粒 pX02 进行酶切;Taq DNA 聚合酶将酶切后的片段补平后在其末端加 A;将补平加 A 的酶切产物与 pMD18-T vector 连接后转化感受态细胞 TOP10,并快速挑选阳性克隆;PCR 鉴定阳性克隆,选取大小在 250~1000bp 的 PCR 产物作为探针。

1.3 基因芯片的制备

将收集到的探针即 PCR 产物以异丙醇沉淀,溶于 50% DMSO,使 DNA 浓度均为 250ng/ μ L。基因芯片的打印方式设计为 30 \times 30 阵列,每行打印 10 个探针,每个探针打印 3 个点,如图 1 所示,其中 1~14 行为毒素质粒 pX01 的 DNA 探针,第 15 行依次为阳性对照(改造过的一段植物基因片段,含有 GATC 酶切位点并在荧光标记时加入到样品的检测体系中)、阴性对照(一段与炭疽质粒基因没有同源性的植物

基因片段)和空白对照(点样液 DMSO),第 16~30 行为荚膜质粒 pX02 的 DNA 探针。用基因芯片打印仪 PixSys5500 将探针打印在氨基修饰的玻璃片上。打印后的玻片置于水蒸气上约几秒钟进行再水化,然后将玻片立即放在热板上 100 $^{\circ}$ C 加热 2min,使其快速干燥,紫外交联仪中交联(80mJ/cm²)然后 80 $^{\circ}$ C 干烤 2h,即可用于杂交。

1.4 样品的限制性显示荧光标记

我们采用限制性显示(RD)技术标记样品^[2],在荧光标记过程中加入阳性对照即改造过的一段植物基因片段。具体过程如下:(1)使用限制性内切酶 *Sau3AI* 酶切炭疽芽胞杆菌毒素质粒 pX01 和荚膜质粒 pX02。(2)酶切片段加接头 SIP 和 SIR。(3)设计与酶切位点及接头的序列相匹配的通用引物。(4)使用 Cy5 标记的通用引物 U 扩增加接头的酶切 DNA 片段。(5)用 PCR 纯化试剂盒纯化 PCR 产物。

1.5 杂交及杂交后清洗

将玻片放入预杂交液(25% 甲酰胺、5 \times SSC、0.1% SDS、1% BSA)中 42 $^{\circ}$ C 温育 40min;分别用水、异丙醇清洗玻片,然后空气干燥。将荧光标记的样品 7 μ L 与等体积的 2 \times 杂交液(50% 甲酰胺、10 \times SSC、0.2% SDS)混合,95 $^{\circ}$ C 变性 5min,以 14000r/min 离心 2min。加 14 μ L 上述样品至芯片表面,盖上盖玻片(避免产生气泡);将芯片放入杂交盒内,置于水浴中杂交 12~16h。杂交后,立即从杂交盒中取出芯片并浸入清洗液中,先以 42 $^{\circ}$ C 预热的 2 \times SSC + 1% SDS 清洗 5min;再移入 0.1 \times SSC + 1% SDS 溶液中室温清洗 10min;最后移入 0.1 \times SSC 清洗 5min,重复 4 次,以去除 SDS;然后分别以丙酮、乙醇清洗一次。空气干燥后即可使用。

1.6 芯片扫描检测

用 ScanArray Lite 基因芯片扫描仪扫描并记录 DNA 微阵列中每个探针杂交信号的强度。

2 结果

2.1 基因芯片探针的制备与检测

将毒素质粒 pX01 和荚膜质粒 pX02 DNA 的限制性酶切产物克隆到 T 载体后,转化大肠杆菌,然后以 T 载体上的引物 SO100、SO101 进行 PCR 扩增鉴定,以 2% 的琼脂糖凝胶电泳,得到大小不等的片段,从电泳图可见大多数扩增条带单一清晰,大小多数在 250~1000bp 范围内,可选择作为基因芯片的探针(图 2)。

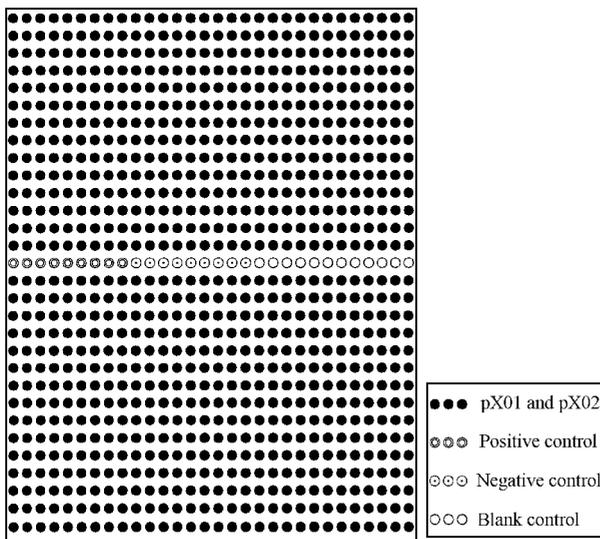


图 1 炭疽芽胞杆菌基因芯片的点阵图

Fig.1 The *Bacillus anthracis* DNA microarray layout

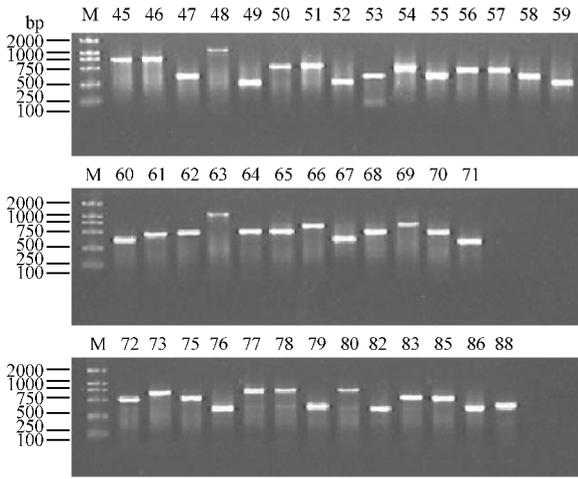


图2 克隆鉴定的琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.2 PCR of DNA fragments in pMD18-T vector from pX01 and pX02 of *Bacillus anthracis*

M. DNA Marker DL2000 ; 45 ~ 88. Positive white clones for probes collection.

2.2 芯片杂交结果

为检验按上述方法制作的炭疽芽胞杆菌检测芯片的质量,取炭疽芽胞杆菌的质粒 pX01 和 pX02,采用限制性显示荧光标记方法,对样品进行荧光标记。产物用 3S PCR 产物纯化试剂盒纯化后同芯片杂交,芯片的初步杂交结果如图 3,其中阳性对照呈现出明亮的荧光信号,而分布于不同位置的阴性对照植物基因和空白对照 DMSO 均无杂交信号。

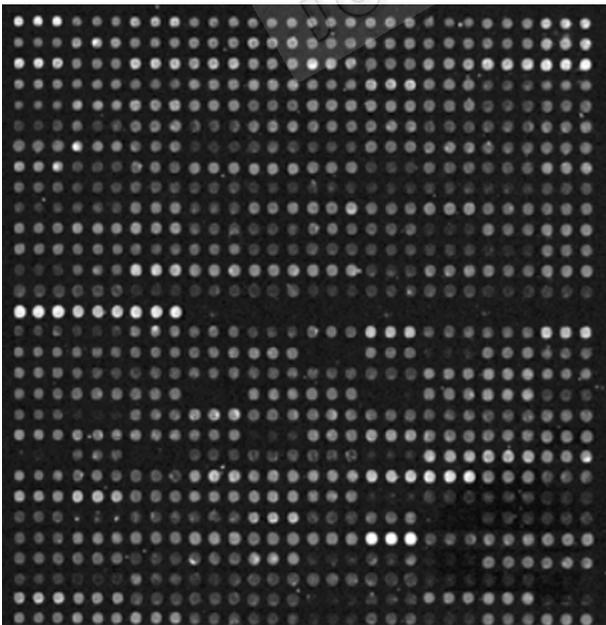


图3 炭疽芽胞杆菌质粒 DNA 与芯片杂交结果图

Fig.3 The hybridization results of sample *Bacillus anthracis* plasmids DNA with the DNA microarray

2.3 探针序列分析

通过芯片的初步杂交结果,我们从 290 个克隆探针中筛选出 273 个作为基因芯片探针,进而对探针进行序列测定并分析探针的性质(包括 T_m 值、GC 含量和探针长度等)与杂交信号强弱的关系。实验结果发现在相同的实验条件下,探针的 GC 含量在 30% ~ 50% 之间时(炭疽芽胞杆菌质粒 pX01 和 pX02 DNA 的平均 GC 含量分别为 32.5% 和 33.1%),长度较长的探针在芯片的固定效果较好,其杂交信号相对较强,信噪比高(图 4)。

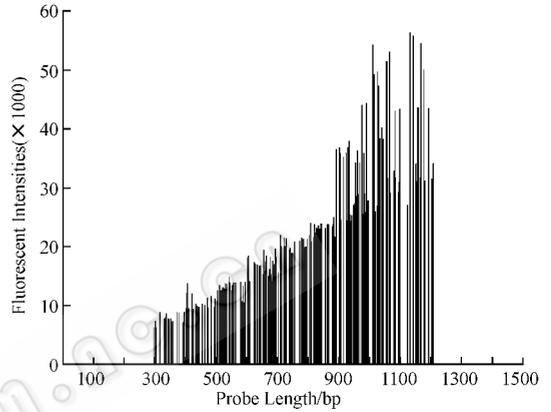


图4 基因芯片荧光信号强度和芯片探针长度的关系

Fig.4 The relational bar between fluorescent intensity and probe length

3 讨论

近几年基因诊断技术的发展,尤其是基于 PCR 技术的病原检测系统的应用,大大缩短了诊断时间,使那些不能培养或很难培养的微生物也得到快速诊断,但是还存在各种缺陷,如混合感染、耐药菌株,出现假阳性结果、假阴性结果等。用传统的基因诊断法较难解决,而基于分子杂交的基因芯片技术为这一问题的解决带来了一种高效、敏感、特异的方法^[3]。通过在芯片上集成大量的 DNA 探针来对样品进行平行检测;不仅可以应用许多不同的探针来检测同一靶分子,而且可以通过集成多种病原体的基因探针来对病原体进行快速的鉴别诊断和基因分型^[4]。根据上述原理,本研究中应用限制性酶切技术结合 AT 克隆方法制备了炭疽芽胞杆菌致病性质粒的基因芯片探针并进行了炭疽芽胞杆菌检测基因芯片的初步研究。由于扩增得到的基因片段的大小、GC 含量、 T_m 值及其结构等存在差异,因此本实验先对收集到的基因片段与炭疽菌种进行了杂交分析,验证打印的基因芯片的质量并初步筛选出适合检测的探针。

基因芯片制备的前提条件是需要较大量的探针基因片段,本研究采用的限制性内切酶为 *Sau3A I*,可特异地识别碱基序列 GATC,理论上每 256 个碱基序列中就应该存在有一个这样的酶切位点,所获得探针的基因信息量大。此外,该方法收集的探针在炭疽芽胞杆菌质粒中分布较广,探针的广泛分布能提高对靶分子检测的特异性,大大降低假阳性发生的几率^[5]。我们对所获得的 273 个大小为 250 ~ 1000bp 的基因片段进行了序列测定及序列的同源性分析,其结果证明上述基因片段均属于炭疽芽胞杆菌质粒 pX01 和 pX02。

此外,杂交信号的强弱还与探针序列的长短、GC 含量、 T_m 值、探针的浓度等有关^[6]。炭疽芽胞杆菌质粒 pX01 和 pX02DNA 的平均 GC 含量分别为 32.5% 和 33.1%,我们通过对强弱不等的阳性杂交信号进行序列比较分析,发现在相同的实验条件下,GC 含量在 30% ~ 50% 之间,长度较长的探针在芯片的固定效果较好,其杂交信号相对较强,信噪比高。但是长度较长的探针其特异性必然会降低,而长度较短的探针特异性好,但杂交信号相对较弱。如何取得两者之间的最优化还有待于进一步的实验验证。通过芯片杂交实验,我们初步筛选出 273 个荧光探针,其信号较强,点的均匀度较好。进而分析探针的序列得知这些探针在质粒 pX01 和 pX02 中分布较广,其中分别有 3 个片段是属于 *pagA* 基因、2 个片段属于 *lef* 基因、2 个片段在 *Cap* 区域上(*pagA*、*lef* 基因是质粒 pX01 的特异性基因,其序列高度保守,*Cap* 区域包含 *CapB*、*CapA*、*CapC* 基因,是炭疽芽胞杆菌产生荚膜的基因,其序列也有高度保守性^[7,8])。特异性的基因芯片探针有利于提高检测的特异性,探针的广泛分布对靶分子的检测也具有重要意义。目前,我们正分别使用不同的炭疽菌种、与炭疽同源性较高菌种(包括苏云金杆菌、蜡样芽胞杆菌等)和一些人体内常见菌种与制备的炭疽检测芯片杂交,以期在相同的实验条件下对检测的芯片探针进行优化,增加其特异性和可靠性(有关研究待发表)。

炭疽芽胞杆菌的质粒 pX01 和 pX02 在自然界中存在水平转移的现象,并且炭疽菌株在实验室中经过“加工”后,也可突变,丢失任何一个质粒就会成为

减毒株或无毒株。减毒疫苗株多为 pX01 + /pX02 - 或 pX01 - /pX02 +,而大部分的 *pasteur* 株为 pX01 - /pX02 + (少数两种质粒都有),*sterne* 株为 pX01 + /pX02 -。自然界中也发现了 pX01 + /pX02 - 突变株,尚未发现 pX01 - /pX02 + 突变株。由于这些减毒株或无毒株的存在,我们在检测炭疽芽胞杆菌时一定要同时设计针对两种质粒基因检测的方法。因此,本实验分别以两种质粒的 DNA 为原材料收集基因芯片探针,这样可以帮助我们在检测时区分强毒株、减毒株和疫苗菌株。同时检测染色体上的一些基因和 DNA 片段,如 *ropB* 基因、*sap* 基因、*urrA* 基因等也有利于区分炭疽芽胞杆菌近源株。

致谢 兰州生物制品研究所王秉翔主任提供了炭疽芽胞杆菌的质粒 pX01 和 pX02,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 靳连群,李君文,王升启,等. 基因芯片技术检测环境中常见致病菌的初步研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2003, 23 (1): 74 - 78.
- [2] 马文丽,郑文岭,李凌,等. DNA 芯片技术的方法与应用. 广州: 广东科技出版社, 2002: 48 - 52.
- [3] Ravi K, Sean J Y, Shrikant M, et al. Microarray results: how accurate are they? *Bioinformatics*, 2002, 18 (1): 22 - 32.
- [4] Wang D, Coscoy L, Zylberberg M, et al. Microarray-based detection and genotyping of viral pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 (24): 15687 - 15692.
- [5] Pan W, Lin J, Le C T. How many replicates of arrays are required to detect gene expression changes in microarray experiments? A mixture model approach. *Genome Biol*, 2002, 3 (5): research0022.
- [6] 李凌,马文丽,祝骥,等. 利用基因芯片技术筛选 HIV-1F 亚型基因限制性显示探针. 中国生物化学与分子生物学报, 2002, 18 (5): 564 - 567.
- [7] Pannucci J, Okinaka R T, Sabin R, et al. *Bacillus anthracis* pX01 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J Bacterio*, 2002, 184 (1): 134 - 141.
- [8] Pannucci J, Okinaka R T, Williams E, et al. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pX02 plasmid and genomic. *BMC Genomics*, 2002, 3 (1): 34 - 42.

Preliminary Study on DNA Microarray for Detection of *Bacillus anthracis*

MA Xiao-Dong¹ MA Wen-Li^{1*} SUN Zhao-Hui² LU Liang¹ ZHENG Wen-Ling²

(¹ The Institute of Molecular Biology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China)

(² The Institute of Molecular Oncology, General Hospital of Guangzhou Command, Guangzhou 510010, China)

Abstract : To develop a technique of detecting *Bacillus anthracis* with DNA microarray, and explore the way of preparing DNA microarray for detecting *B. anthracis*. *B. anthracis* plasmids, pX01 and pX02, were digested with Sau3AI and the resulting fragments were used to construct DNA library of pX01 and pX02. DNA microarray probes were obtained from fragments of DNA library. The positive clone fragments from DNA library verified by sequencing were used as the DNA microarray probes. A plant gene that includes GATC restriction site was used as positive control. When fluorescence labeled, it was added into the sample detecting system. Another plant gene that was nonhomologous to *B. anthracis* was used as negative control, and DMSO was used as blank control. A DNA microarray of detecting *B. anthracis* was prepared by printing the probes on a superamine modified glass slide. 290 cloned probes were collected. A DNA microarray for detecting *B. anthracis* was prepared. After hybridized with sample *B. anthracis* plasmids, pX01 and pX02, 273 cloned probes were screened by the analysis of the fluorescent intensities for further study. The high effectivity, utility and reliability of DNA microarray technique would lay a good foundation for further study on detection of *B. anthracis*.

Key words : *Bacillus anthracis*, DNA microarray, Molecular probe

Foundation item : Chinese National Natural Science Foundation (39880032)

* Corresponding author. Tel : 86-20-61648210 ; Fax : 86-20-61647755 ; E-mail : wenli@fimmu.com

Other author : WANG Hong-Min¹ SHI Rong¹

Received date : 08-22-2003

《微生物学报》第八届编辑委员会名单

主 编 : 李季伦 院 士 中国农业大学生物学院
 副主编 : 谭华荣 研究员 中国科学院微生物研究所
 陆德如 研究员 第二军医大学遗传研究所
 王敖全 研究员 中国科学院微生物研究所
 曲音波 教 授 山东大学生命科学学院
 徐建国 研究员 中国疾病预防控制中心传染病预防控制研究所

编 委 (按姓名拼音排序, * 2003 年 7 月新增补)

蔡永峰	陈永青	程 池	东秀珠	范云六	郭 俊	胡福泉
胡远扬	黄 力	陆承平	闵 航	钱世钧	邵一鸣	盛 军
唐 宏	田 波	王 平	* 王华明 (USA)	谢 红	杨苏声	翟中和
* 张耀平 (USA)	郑天凌	朱宝泉	诸葛健			

编 辑 : 王晋芳 王 敏