

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
50(4):548-553; 4 April 2010
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

副溶血性弧菌全基因组 DNA 芯片的研制和质量评价

韩海红¹, 曾小涛², 殷胜骏², 杨瑞馥², 刘秀梅^{1*}, 周冬生^{2*}

(¹ 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

(² 军事医学科学院微生物流行病研究所, 北京 100071)

摘要:【目的】研制副溶血性弧菌全基因组芯片, 建立芯片杂交方法, 并对芯片质量进行评价。【方法】利用副溶血性弧菌全基因组序列, 挑选出 4770 条基因, PCR 扩增各基因并将 PCR 产物纯化, 点样制备芯片; 设计了两个质控杂交组合, 采用双色荧光杂交策略, 对芯片质量进行评价; PCR 方法验证部分芯片结果。【结果】芯片杂交与理论预期结果以及 PCR 验证结果完全一致。【结论】成功的研制了一批质量良好的副溶血性弧菌全基因组 DNA 芯片, 并建立了基于 DNA 芯片的副溶血性弧菌比较基因组学技术平台, 建立了一套系统的芯片数据分析的标准方法。

关键词: 副溶血性弧菌; DNA 芯片; 比较基因组学; 进化基因组学; 功能基因组学

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2010) 04-0548-06

副溶血性弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*, VP) 是一种嗜盐性的革兰氏阴性弧菌。它广泛的存在于沿岸海水、海河交界处及海产品中, 是引起食物中毒的重要致病菌。食物 (尤其是海产品) 未作适当处理可能污染大量的副溶血性弧菌^[1-2]。副溶血性弧菌经污染的食物进入肠道后, 首先附着于肠道细胞, 然后在肠道繁殖并分泌出各种溶血素、细胞毒素等分泌物。食用污染的食物后约 8-20 h 发病, 症状包括: 下痢 (中毒患者 98% 有此症状)、下腹绞痛 (82%) 和反胃 (71%) 等。副溶血性弧菌感染后在体内的滞留时间, 健康者约 3-7 d, 引起肠胃炎者约滞留 10-16 d。除了引起食物中毒外, 副溶血性弧菌也会通过海水污染伤口而引起败血症及组织感染^[3-4], 另有感染四肢、耳、眼之报告, 显示副溶血性弧菌也具有组织入侵能力。

随着生物学领域的长足发展, 有越来越多的模式生物及具有重要意义的病原菌的全基因组序列都

完成了测定工作。日本学者在 2003 年完成了副溶血性弧菌大流行菌株 RIMD2210633 的全基因组序列的测定^[5]。副溶血性弧菌的基因组由两条环状染色体组成, 大小分别为 3.29 Mb 和 1.88 Mb^[5]。两条染色体上共有 4832 个基因, 其中仅有约 40% 的基因注释了可能的编码蛋白, 大部分为未知功能基因。大小染色体上均包含细菌生长存活必需的基因, 但大部分都位于大染色体上。在小染色体上的一个 80 kb 的毒力岛上发现了编码副溶血性弧菌主要毒力因子——耐热直接溶血素 (thermostable direct haemolysin) 的基因, 以及编码 III 型分泌系统的基因 (type III secretion system)^[5]。

DNA 微点阵技术或称 DNA 芯片技术, 具有快速、高效、大规模和高通量的技术特点^[6], 其迅速发展使得基因功能与表达调控的研究由针对单个基因和蛋白质逐步分析迅速转向大规模平行和快速连续分析。目前 DNA 芯片技术已经被广泛应用于基因

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划 (2006BAK02A15); 国家自然科学基金 (30871370); 国家科技重大专项 (2008ZX10004-103)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-67770158; E-mail: xmliu01@yahoo.com.cn (刘秀梅); Tel: +86-10-66948594; E-mail: dongshengzhou1977@gmail.com (周冬生)

作者简介: 韩海红 (1983-), 女, 河北张家口人, 研究实习员, 主要从事食源性致病微生物研究。E-mail: shanlushanlu@163.com

收稿日期: 2009-12-05; **修回日期:** 2010-01-20

表达分析、比较基因组学研究、DNA 序列变异分析和基因分型等多个方面。

在完成鼠疫耶尔森菌全基因组 DNA 芯片研制工作基础上^[7], 本文利用副溶血性弧菌的序列数据, 研制了副溶血性弧菌的全基因组 DNA 微点阵芯片, 建立了副溶血性弧菌芯片杂交方法, 并对芯片的质量进行了评价。

1 材料和方法

1.1 芯片的研制

1.1.1 实验用菌株及 PCR 模板的制备: 副溶血性弧菌 S072 株 1998 年分离自孟加拉国, 属于新 O3:K6 大流行菌群, 在本研究中作为 RIMD2210633 的替代品; 副溶血性弧菌 S004 株 1985 年分离自马尔代夫, 属于旧 O3:K6 菌群。菌株保存在添加有 3% NaCl 和 40% 甘油的冰冻 LB 肉汤中。细菌接种在含 3% NaCl 的 LB 琼脂培养基中生长, 用经典的酚/氯仿提取法提取菌株 S072 和 S004 的基因组 DNA, 作为 PCR 扩增反应的模板 DNA。

1.1.2 挑选基因和设计引物: 本文挑选出菌株 RIMD2210633 全基因组数据中的全部 ORF, 还包括其它研究中已经测序的若干基因, 共得到 4770 条副溶血性弧菌基因。针对每个基因均设计一对特异性引物, 力求尽量使扩增产物达到基因全长, 但扩增产物一般不超过 2000 bp。为保证引物的特异性, 对每个引物对均进行了 BLAST 分析。引物由 Illumina 公司(San Diego, USA) 直接合成于 96 孔板中, 溶解成 100 $\mu\text{mol/L}$ 的母液后, 保存于 -20°C 。

1.1.3 基因的 PCR 扩增 100 μL 的 PCR 反应体系中各成分如下: 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的引物, 5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶(实验室自制)和 20 ng 的模板 DNA, 150 $\mu\text{mol/L}$ 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP, 50 mmol/L 的 KCl, 10 mmol/L 的 Tris-HCl (pH 8.0), 2.5 mmol/L 的 MgCl_2 , 0.001% 的明胶, 0.1% 的 BSA。PCR 反应条件为: 预变性 95°C 5 min, 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min 30 s, 共 30 个循环, 最后 72°C 5 min。第一次大规模扩增后成功率达到 96%。对于扩增失败的基因, 改变条件(如改变退火温度)重新扩增。最终共有 4660 条基因扩增成功, 每个基因得到 300 μL 产物。

1.1.4 纯化扩增产物: PCR 扩增产物共 300 μL 转入 MultiScreen-PCR Plate (Millipore) 中, 12 inchs Hg 负压抽滤 20 min。向每孔中加 100 μL 的去离子水, 12 inchs Hg 负压抽干。向每孔中加入 60 μL 的碱性

水 (pH 7.5) (由去离子水加少量 10 mol/L 的 NaOH 配置而成), 200 r/min 摇动 20 min。将纯化产物收集于另一纯净 96 孔 PCR 板中。最后再向每孔中加入 60 μL 的碱性水 (pH 7.5), 200 r/min 摇动 20 min 后, 两次纯化产物收集于同一个 96 孔 PCR 板中。取 8 μL 纯化产物经电泳检测可见单一明亮条带。65 $^\circ\text{C}$ 充分干燥 DNA。干燥后每孔中加入 35 μL 的 50% DMSO, 震荡 5 min, 室温放置数小时, 使 DNA 充分溶解于 DMSO 中。 -20°C 保存。

1.1.5 芯片点样: DNA 产物 3000 r/min 离心 30 min 后, 取上清 10 μL 转入另一干净的 384 孔板 (Genetix 7020) 中。13 块 384 孔板中, 除有 4660 条副溶血性弧菌扩增产物外, 还有若干对照 (S072 和 S004 基因组 DNA, 50% DMSO, 鲑鱼精 DNA), 共 4992 个样品。芯片点样仪为 SpotArray 72 芯片点样系统 (Perkin Elmer), 玻片为 CSS-1000 醛基化玻片 (CEL), 点样针为 32 个 SMP3 微点样针 (Telechem)。每个样品点两个重复。每张芯片 32 个亚矩阵 (4×8 排列), 每亚矩阵 18×18 点阵。

1.2 芯片杂交

1.2.1 荧光素标记基因组 DNA: 采用互换双色荧光标记, 待测 DNA (即用于分析的菌株基因组 DNA) 用 Cy5 或 Cy3 标记, 参照 DNA (S072 菌和 S004 菌基因组 DNA 的等量混合物) 用 Cy3 或 Cy5 标记, 以避免染料的标记误差。即重复一: 待测 DNA 用 Cy5 标记 + 参照 DNA 用 Cy3 标记; 重复二: 待测 DNA 用 Cy3 标记 + 参照 DNA 用 Cy5 标记, 其中参照 DNA 囊括了芯片上所有的副溶血性弧菌基因。取 3 μg 的待测或参照 DNA 和 6 μg 的六碱基随机引物 (北京三博远志公司合成), 补加水至 38.5 μL 。98 $^\circ\text{C}$ 下 10 min 充分变性后, 用冰浴迅速冷却, 然后加入 $10 \times$ Klenow 酶缓冲液 5 μL 、Klenow 酶 (5 U/ μL) 4 μL 、50 \times dNTPs (5 mmol/L dATP, 5 mmol/L dGTP, 5 mmol/L dTTP, 2 mmol/L dCTP) 1 μL 、Cy3-或 Cy5-dCTP (1 mmol/L, Amersham) 1.5 μL , 反应总体积为 50 μL , 在 37 $^\circ\text{C}$ 反应 23 h。再将对应的待测 DNA-Cy5 或 Cy3 和参照 DNA-Cy3 或 Cy5 反应体系混合后, 用 QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 纯化, 用 40 μL 的 H_2O (pH 7.5 - 8.0) 回收, 50 - 60 $^\circ\text{C}$ 干燥。 -20°C 下保存。

1.2.2 芯片杂交: 点样后的芯片于室温下放置干燥, 在紫外交联仪 (Hofer) 中按照总能量模式 60 mJ 交联 2 次, 用去离子水漂洗, 吹干后方可用于杂交。杂交炉设定温度 42 $^\circ\text{C}$, 预热杂交液和湿盒。于荧光

标记物中,加入 35 μL 的杂交液,PCR 仪(Biometra)中 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min,取尽所有杂交液,加于芯片上,盖上盖片。湿盒中 42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 18 - 20 h。取出杂交后的芯片,轻轻除去盖片。芯片置于支架上,于 1000 mL 烧杯中加入 500 mL 的洗液 I(1 \times SSC, 0.06% SDS),用力摇动支架洗涤 2 min。芯片置于新的支架上,于 1000 mL 烧杯中加入 500 mL 的洗液 II(0.06 \times SSC),洗涤 2 min。于 50 mL 的烧杯中加满无水乙醇,轻轻漂洗芯片 1 min,吹干芯片,用 GenePix Personal 4100A 芯片扫描仪(Axon Instruments)扫描。

1.2.3 数据分析:采用软件 GenePix Pro 5.0 (Axon Instruments)和 Excel,进行芯片扫描后的图片处理和后续的数据分析。参照 DNA 的信号强度(中值)低于两倍背景强度(中值)的点将被剔除,不做后续分析。由于芯片的问题(如芯片出现‘连点’、样点大小不均一等)导致的数据不好的点也将剔除。采用全局归一法(Global normalization)对剩余的点的数据进行归一化处理。计算各样点的信号比值(待测 DNA 归一化强度/参照 DNA 归一化强度),并转换成 \log_2 值。小于 3 个数据的基因被认为数据不可靠,剔除。经数据剔除后,共有 4021 个基因数据保留在最后的数据集中。最后计算两张重复芯片上的剩余点的 \log_2 平均值。

1.3 PCR 方法验证部分芯片结果

将需要验证的基因做 25 μL 的 PCR 的反应体系,各成分如下:0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的引物(引物同制作芯片时的相应基因的引物),5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶(实验室自制)和 20 ng 的模板 S004 基因组 DNA,150 $\mu\text{mol/L}$ 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP,50 mmol/L 的 KCl,10 mmol/L 的 Tris-HCl(pH 8.0),2.5 mmol/L 的 MgCl_2 ,0.001% 的明胶,0.1% 的 BSA。PCR 反应条件为:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,共 30 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

2 结果和讨论

2.1 芯片的研制

本研究是在本实验室完成了鼠疫耶尔森菌全基因组 DNA 芯片的基础上,运用其完善的技术平台又完成了副溶血性弧菌的全基因组 DNA 芯片研制并将其成功的运用于副溶血性弧菌的比较基因组学研究。全基因组 DNA 芯片的研制是一个多步骤过程,如前期的挑选基因,批量设计引物等;中期的大量

PCR 扩增,产物纯化及芯片点样;和后期的芯片杂交,数据分析及芯片的评价等。在复杂的芯片研制和研究应用工作中,有许多细节值得注意。

本研究中的芯片属于 PCR 产物微点阵芯片,每条基因需设计一对特异引物。借鉴本实验室上次芯片研制的经验,PCR 扩增采用 100 μL 体系,并做 3 个重复,即共 300 μL 的 PCR 产物用于下游操作^[7]。一次扩增没有成功的基因,根据扩增结果分成扩增产物有杂带和无扩增产物两种情况,改变 PCR 实验条件重新扩增,前者可以提高退火温度至 60 $^{\circ}\text{C}$ 或更高以提高扩增的特异性;后者可以降低退火温度至 56 $^{\circ}\text{C}$ 或更低以提高扩增的灵敏度,对于扩增还不成功的基因需重新设计引物等。纯化时采用 MultiScreen-PCR Plate(Millipore),抽滤时负压不易太高,否则小片段 PCR 产物很易丢失。对于抽滤丢失的基因,则需要重新扩增和纯化。芯片点样时应保持环境清洁,放置点样仪的操作台应平稳,并保持一定的环境湿度,湿度低可能导致芯片背景信号高,而湿度高则可能使芯片上出现‘连点’,导致芯片质量下降。芯片点制完成后,需扫描抽检芯片上点的均匀一致状态,及时发现和纠正芯片点样仪器的参数设置错误等情况。

2.2 芯片杂交

荧光素标记基因组 DNA 时,变性后应迅速冰浴,以使六碱基引物能与基因组 DNA 退火结合;荧光素要避免光,待测和参照 DNA 标记反应若均匀一致,混合纯化后应为紫色,偏蓝或偏红说明标记反应不均匀,有标记偏差。芯片杂交时湿盒的湿度也要控制在一定水平,过高或过低都影响杂交的结果,杂交后的芯片应避光保存。由 GenePix Pro 5.0 芯片扫描仪扫描芯片得出的数据信息量大而且杂,需要从中摘选出有用的数据,并进行进一步的运算、剔除、分析等,稍有疏忽可能会得到错误的结果。因此需要建立一套系统、有序、没有人工错误的数据分析标准方法。本文运用 Excel 的公式、函数以及宏程序等工具,摸索出一套成熟的数据分析标准程序,极大的缩短了数据分析时间,并使得人工错误降低为零。

2.3 芯片质量的评价

芯片完成后,需要对芯片的质量进行评价,确保得出的芯片杂交数据真实可信,并为大规模开展芯片的比较基因组学研究奠定基础。本文采用参照 DNA 和参照 DNA,S004 菌株 DNA 和参照 DNA 两个杂交组合。选定 -1 作为临界值,如果某个基因的 \log_2 信号比值(待测 DNA 与参照 DNA 的荧光比值

以 2 为底的对数) 小于 -1, 那么该基因在待测 DNA 中缺失, 反之, 该基因存在。

2 种组合的杂交芯片扫描图象及杂交结果统计图见图 1-2。

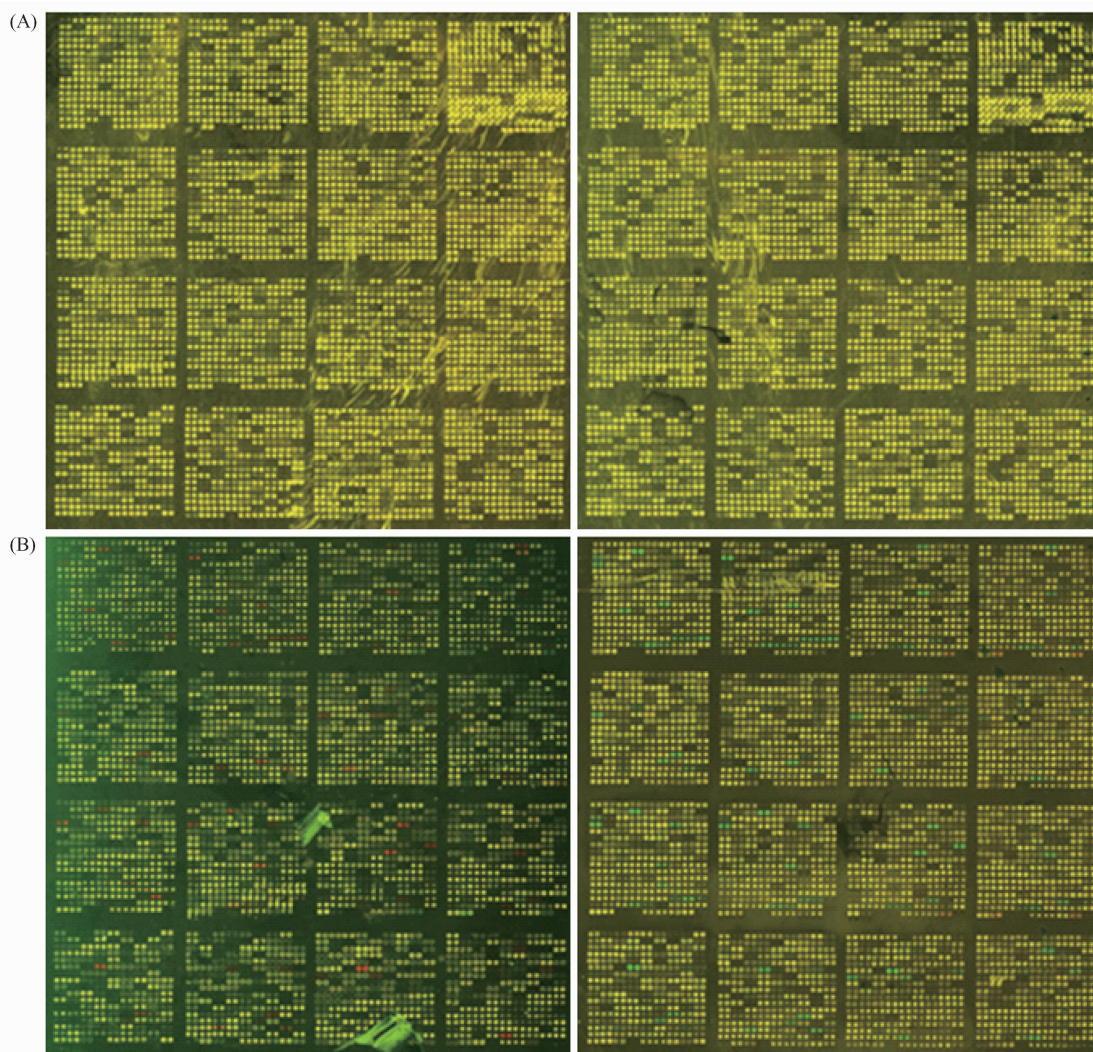


图 1 芯片杂交扫描截取图

Fig. 1 Microarray hybridization scanning interception images. A: Reference DNA (regard it as Test DNA) hybridization with Reference DNA; B: S004 DNA (i. e. Test DNA) hybridization with Reference DNA (in the left image S004 DNA was Cy3- labeled, while in the right S004 DNA was Cy5- labeled). Yellow signals represent the signal intensity of the two DNAs (i. e. Reference DNA and Test DNA) are equal, which means the corresponding gene also exists in Test DNA. The red or green signals represent the corresponding gene is missing in Test DNA.

参照 DNA 作为制作芯片时 PCR 反应的模板 DNA, 其全基因组中包含了所有的芯片上基因, 理想中芯片杂交结果所有的基因都应显示为存在, 即在杂交扫描图中显示为黄色信号, 在杂交数据统计图中 4021 个基因的 \log_2 值都应小于 1。如图 1-A 和图 2-A 所示, 参照 DNA 杂交结果十分理想, 所有基因均正确预示了其存在。而 S004 作为旧 O3:K6 菌株, 其全基因组不同于大流行菌株 RIMD2210633, 应有部分基因会表现为缺失, 在芯片上相应的表现

为红色或者绿色。在图 1-B 中, S004DNA-Cy3 表现为部分红色信号点, S004DNA-Cy5 表现为部分绿色信号点; 在图 2-B 中, 数据表明相应的基因在待测 DNA 中表现为缺失, 本文挑选出在杂交结果在显示为缺失的 VP2900-2910 基因, 用 PCR 的方法部分验证其结果, 结果显示 PCR 结果和杂交结果有 100% 的一致率(表 1), 两种方法均显示为缺失。故可以认为芯片质量良好, 可以用于后续的比较基因组学及其它研究。

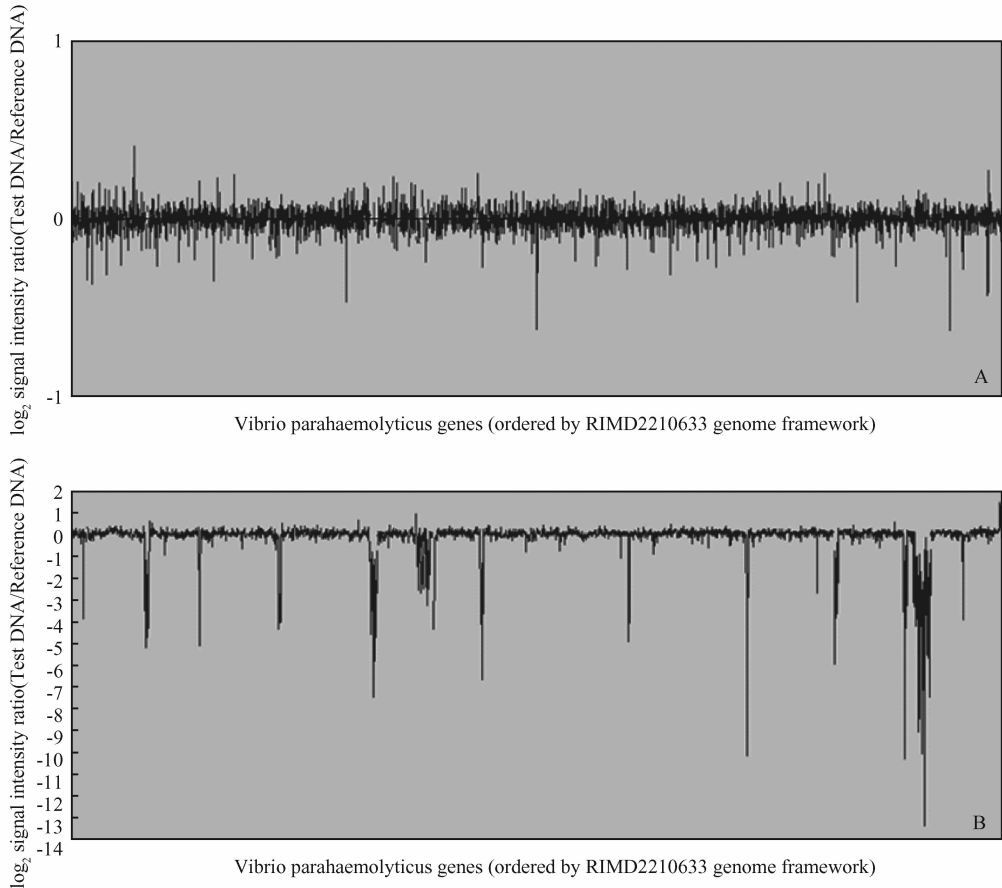


图2 杂交数据统计图

Fig.2 Statistic diagrams of microarray hybridization Data. A: Reference DNA (regard it as Test DNA) hybridization with Reference DNA; B: S004 DNA (i. e. Test DNA) hybridization with Reference DNA.

表1 芯片杂交和PCR验证的结果比较

Table 1 The comparison of the results of microarray hybridization and PCR verification

Genes	Microarray hybridization	PCR verification	Consistent ratio
VP2900-VP2910	Missing	Missing	100%

2.4 副溶血性弧菌 DNA 芯片研制的意义

副溶血性弧菌作为引起食物中毒的重要致病菌,其 DNA 芯片的成功研制具有重要意义。它为后续利用 DNA 芯片进行副溶血性弧菌比较基因组学、进化基因组学以及功能基因组学的研究奠定了基础。比较基因组学即以已经完成的副溶血性弧菌菌株全基因组序列为参考,采用 DNA 芯片技术,对未测序的副溶血性弧菌菌株基因组和参考基因组间进行比较基因组杂交分析,可以鉴定出两个基因组共有基因以及待比较基因组中缺失的基因^[8](例如,比较有毒株和无毒株的基因组,那么仅在有毒株中存在的基因则可能与该菌株的毒力以及适应环境宿主等相关);基于比较基因组学研究,可以进行副溶血性弧菌的基因组分型,认识其基因组进化的基本

规律等,达到进化基因组学的目的;DNA 芯片还可以用于副溶血性弧菌基因表达谱研究,如冷诱导、低盐等条件下的基因转录表达分析,基因表达谱是功能基因组学中非常活跃的研究技术之一^[9]。

总之,本研究成功研制了一批 DNA 芯片,建立了基于全基因组 DNA 芯片的副溶血性弧菌的比较基因组学研究平台,建立了一套系统的芯片杂交及下游数据分析的标准方法,为后续将副溶血性弧菌芯片用于比较基因组学、进化基因组学以及功能基因组学等研究奠定了基础。

致谢 感谢台湾东吴大学微生物学系黄显宗教授馈赠部分副溶血性弧菌菌株。

参考文献

- [1] Gooch JA, DePaola A, Bowers J, et al. Growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus* in postharvest American oysters. *Journal of Food Protection*, 2002, 65: 970-974.
- [2] Cook DW, O'Leary P, Hunsucker JC, et al. *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus* in U. S. retail shell oysters: A national survey from June 1998 to July 1999. *Journal of Food Protection*, 2002, 65: 79-87.
- [3] Hlady WG, Klontz KC. The epidemiology of *Vibrio* infections in Florida, 1981-1993. *Journal of Infectious Diseases*, 1996, 173: 1176-1183.
- [4] Daniels NA, MacKinnon L, Bishop R, et al. *Vibrio parahaemolyticus* infections in the United States, 1973-1998. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181: 1661-1666.
- [5] Makino KK, Oshima K, Kurokawa K, et al. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: a pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholera*. *Lancet*, 2003, 361: 743-749.
- [6] Shoemaker DD, Linsley PS. Recent developments in DNA microarrays. *Current Opinion in Microbiology*, 2002, 5(3): 334-337.
- [7] 周冬生, 韩延平, 戴二黑等. 鼠疫耶尔森菌全基因组 DNA 芯片的研制及用于比较基因组学分析. 解放军医学杂志(*Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*), 2004, 29(3): 200-203.
- [8] Panda S, Sato TK, Hampton GM, et al. An array of insights: application of DNA technology in the study of cell biology. *Trends in Cell Biology*, 2003, 13: 151-156.
- [9] Conway T, Schoolnik GK. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Molecular Microbiology*, 2003, 47: 879-889.

Development and evaluation of whole-genome DNA microarray of *Vibrio parahaemolyticus*

Haihong Han¹, Xiaotao Zeng², Shengjun Yin², Ruifu Yang², Xiumei Liu^{1*}, Dongsheng Zhou^{2*}

(¹Institute of Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China)

(²State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology and Epidemiology, Beijing 100071, China)

Abstract: [**Objective**] We developed and evaluated a whole-genome DNA microarray of *Vibrio parahaemolyticus*. [**Methods**] Based on the genomic sequences of *V. parahaemolyticus*, we chose a total number of 4770 genes, amplified them by PCR with specific primers, purified the PCR products and printed them onto glass slides. We performed two sets of hybridizations by the method of two-fluorescence comparative hybridization to evaluate the microarray quality, followed by PCR method to validate parts of microarray results. [**Results**] Microarray hybridization results were completely consistent with theory expectations and PCR verification results. [**Conclusion**] We successfully developed a batch of good quality whole-genome DNA microarrays of *V. parahaemolyticus*, built up a method of microarray-based comparative genomic hybridization of *V. parahaemolyticus* and a set of microarray data analysis standard method.

Keywords: *Vibrio parahaemolyticus*; DNA microarray; comparative genomics; evolutionary genomics; functional genomics

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Key Technology R&D program (2006BAK02A15), the National Natural Science Foundation of China (30871370) and the Important National Science & Technology Specific Projects (2008ZX10004-103)

* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-67770158; E-mail: xmliu01@yahoo.com.cn (Xiumei Liu); Tel/Fax: +86-10-67770158; E-mail: xmliu01@yahoo.com.cn (Dongsheng Zhou)

Received: 5 November 2009/Revised: 20 January 2010