

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
49(6):733-739; 4 June 2009
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

产毒和非产毒霍乱弧菌在甘露醇发酵液和 Luria-Bertani 培养液中的基因表达差异

张红芝, 逢波, 张力, 阚飙*

(中国疾病预防控制中心传染病预防控制所, 传染病预防控制国家重点实验室, 北京 102206)

摘要:【目的】分析霍乱弧菌产毒株和非产毒株在甘露醇发酵液和 LB (Luria-Bertani) 培养液中生长的基因表达谱和代谢差异特征。【方法】提取甘露醇发酵液和 LB 培养液中霍乱弧菌甘露醇慢发酵株(产毒株)N16961 和快发酵株(非产毒株)93097 生长第一小时的总 RNA, 应用霍乱弧菌 N16961 基因组芯片分析各菌株在不同培养液中的表达差异基因。【结果】筛选出产毒株 N16961 在甘露醇发酵液和 LB 中表达差异基因 142 个, 非产毒株 93097 有 418 个, 这些表达差异基因主要分属于 6 个不同的功能类群, 主要是转运结合、能量代谢以及蛋白质合成代谢功能。【结论】甘露醇发酵液和 LB 中产毒株和非产毒株的许多功能基因的转录水平有显著差异, 这些表达差异基因可能与霍乱弧菌在甘露醇发酵液中代谢产酸有关, 这为进一步分析霍乱弧菌代谢甘露醇的机制、以及分析产毒株与非产毒株的甘露醇发酵快慢机制提供了基础。

关键词: 霍乱弧菌; 甘露醇发酵; 表达谱芯片

中图分类号: R37 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2009) 06-0733-07

霍乱弧菌是引发霍乱的病原菌^[1], 霍乱毒素的产生是其致病的主要原因之一^[2]。我国在霍乱防控中, 建立了针对第七次大流行的 O1 群 El Tor 型霍乱弧菌进行分型的噬菌体-生物分型方案, 能够准确快速的区分 El Tor 型的霍乱弧菌的流行株(几乎全为产毒株)和非流行株(全为非产毒株), 这对在霍乱防控过程中区别对待这两类菌株、从而采取不同的预防控制措施有重要的意义^[3], 至今仍为霍乱弧菌分型的重要方法之一。山梨醇发酵实验是噬菌体-生物分型方案中一个重要的生化反应, 非流行株的山梨醇发酵液颜色约在第 4 小时因产酸积累而变为黄色, 表现为快发酵, 而流行株的山梨醇发酵液颜色约在发酵第 8 小时左右变为黄色, 表现为慢发酵, 霍乱弧菌的山梨醇发酵快慢是鉴别流行株和非流行株的

简单而明确的标志。尤其在现场的霍乱疫情处理中, 在没有条件进行分离株是否具有产霍乱毒素能力时, 可用山梨醇发酵快慢进行初步的判断, 目前发现快发酵株均为非产毒株, 一般对人体不致病, 而慢发酵株几乎全为产毒株, 可引起暴发流行。

在后来的研究中我们发现甘露醇发酵实验同样能鉴别产毒株和非产毒株, 其现象与山梨醇发酵实验一致^[4]; 我们实验室进行的双向电泳结果显示, 在快发酵株的山梨醇发酵液中甘露醇代谢相关蛋白 1-磷酸甘露醇脱氢酶的表达明显高于慢发酵株。霍乱弧菌全基因组测序菌株的序列预测结果显示在小染色体上有甘露醇特异的 PTS 基因 *mltA*, 但是没有发现山梨醇特异的 PTS 成分, 这些结果提示山梨醇在霍乱弧菌中的代谢途径比甘露醇复杂, 可能是几

基金项目: 国家“973 项目”——国家重点基础研究发展规划项目(G1999054102)

* 通信作者。Tel: +86-10-61739458; E-mail: kanbiao@icdc.cn

作者简介: 张红芝(1980-), 女, 山东省滨州市人, 博士研究生, 研究方向是霍乱弧菌的分子生物学和分子流行病学。E-mail: wxws46@vip.sohu.net

收稿日期: 2008-12-19; 修回日期: 2009-03-16

个不同的代谢途径协同作用的结果,因此我们先将甘露醇代替山梨醇作为研究对象,以便深入研究发酵实验鉴别产毒株和非产毒株的机制。我们首先利用基因表达谱芯片技术,分析慢发酵株(产毒株)和快发酵株(非产毒株)在甘露醇发酵液和常规 LB 培养条件中的表达差异基因,分析代谢差异,作为研究甘露醇发酵实验区分两类菌株的初步探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和培养基: O1 群 El Tor 型产毒株 N16961(全基因组测序菌株)为山梨醇和甘露醇慢发酵株(归属于流行株), El Tor 型非产毒株 93097 为山梨醇和甘露醇的快发酵株(归属于非流行株)。LB 培养基含 1% 蛋白胨、0.5% NaCl、0.5% 酵母提取物; 0.2% 甘露醇发酵液中含 0.2% 甘露醇、0.5% NaCl 和 0.1% 蛋白胨,调 pH 值为 8.5。

1.1.2 主要试剂和仪器: RNeasy Mini Kit 购自 QIAGEN; One step SYBR RT-PCR kit (TaKaRa); 霍乱弧菌表达谱芯片由北京博奥生物芯片有限责任公司提供; 扩增检测仪器为 Roche Lightcycler II。

1.2 总 RNA 的提取

快发酵株 N16961 和慢发酵株 93097 在 LB 中于 37°C, 225 r/min 振荡培养过夜; 次日按 1:50 比例接种于 LB 中进行活化至 OD_{600} 约 0.3 左右,按 1:30 比例将 N16961 和 93097 分别接种于 0.2% 甘露醇发酵液和 LB 中,于 37°C 温箱孵育 1 h 后,用 Qiagen 试剂盒提取总的 RNA。因为此时在甘露醇发酵液及 LB 中,两类菌株生长浓度相似,能更好的反映细菌针对不同生长条件尤其是碳水化合物的早期反应,去除了生长浓度以及培养液因细菌生长而发生改变后对细菌基因表达带来的影响。NucleoSpin RNA clean-up 试剂盒(MACHEREY-NAGEL, Germany)对总 RNA 进行过柱纯化以消除 DNA 污染,最后用分光光度计定量,实验用样品总 RNA 20 μ g, 甲醛变性电泳质检。

1.3 生长曲线的测定

挑取 N16961 和 93097 单菌落分别接种到 LB 中,于 37°C, 225 r/min 振荡培养过夜; 按 1:50 的比例将菌活化,至 OD_{600} 约 0.3,按 1:30 的比例将活化的菌液分别接种至 0.2% 甘露醇发酵液和 LB 中,于 37°C 温箱,静止培养,并每隔 1 h 取菌液于分光光度计上测定 OD_{600} 。

1.4 表达谱芯片的制备、杂交洗涤及检测和分析

根据测序菌株 N16961 染色体上(GenBank

accession no. NC002505 和 NC002506)所有预测到的 ORF 设计 PCR 引物,PCR 产物片段长度在 200 ~ 1000 bp 之间,芯片包含了 3861 个基因,占预测到的 99.4% (3861/3885)^[5],用博奥公司的 SmartArray Microarrayer 进行点样,用反转录 Klenow 酶对样品 RNA 进行标记,然后将标记的 DNA 溶于 80 μ L 杂交液(4X 杂交 buffer, 50% 甲酰胺),于 42°C 杂交过夜,并依次用两种洗液清洗(0.2% SDS, 2XSSC, 0.2% XSSC)。

芯片用 LuxScan3.010KA 双通道激光扫描仪进行扫描,用 LuxScan3.0 软件进行数据的提取。芯片的信号值用博奥有限公司提供的程序 BoaoAnalyzer,进行片间校正和片内归一化及信号可见度标记,数据采用 Lowess 归一化,荧光强度 < 400 的为弱表达,400 ~ 800 的为临界表达(M), > 800 的为表达差异(E)。

所有芯片的表达数据均为样本与共同对照的比值,如果比值 > 2.0,或 < 0.5,并且经过 SAM 软件进行 one class 方法检验, $P < 0.05$ 的基因,认为是差异表达基因。

1.5 芯片结果的实时荧光定量 PCR 验证

选取有表达差异的 5 个基因,分别为 *mtlA*、*asc-1*、*aceE*、*dD* 和 *mtlD*,以 *recA* 为内参,用荧光定量 PCR 方法对表达谱芯片结果进行验证。

2 结果

2.1 快发酵株和慢发酵株在甘露醇发酵液和 LB 中的生长曲线

图 1 明确显示慢发酵株 N16961 和快发酵株 93097 在 LB 中生长 OD_{600} 的增加幅度均明显高于其在 0.2% 甘露醇发酵液中的 OD_{600} 的增加幅度,说明

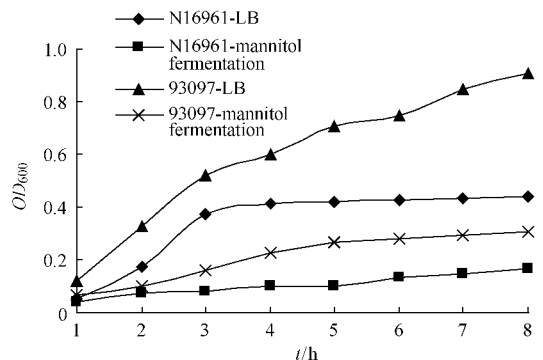


图 1 快发酵株 93097 和慢发酵株 N16961 在 0.2% 甘露醇发酵液和 LB 中的生长曲线

Fig. 1 Growth curves of fast-fermentation strain 93097 and slow-fermentation strain N16961 in 0.2% mannitol fermentation medium and LB.

快发酵株和慢发酵株在 LB 中的生长速度要快于其在 0.2% 甘露醇发酵液中的生长速度; 且在相同的培养条件下, 快发酵菌株 93097 的生长速度要快于慢发酵菌株 N16961。

2.2 实时荧光定量 PCR 结果验证

在获得菌株 N16961 和 93097 各在两种培养液中转录组的检测数据后, 我们用实时荧光定量 PCR 抽检了 5 个差异表达基因、对其进行了基因转录水平的检测, 结果如图 2 所示, 表达谱芯片结果和荧光定量 PCR 结果均显示 *mtlA*、*aceE*、*lldD* 和 *mtlD* 属于上调基因, *asc-1* 属于下调基因, 这两种定量结果是一致的, 同时我们也以这 5 个基因数据作为样本, 进行了芯片定量结果与 QRT-PCR 定量结果的相关性分析, 相关系数为 0.882 ($P = 0.048$), 二者之间存在正相关, 验证了转录组芯片检测结果的可信性。

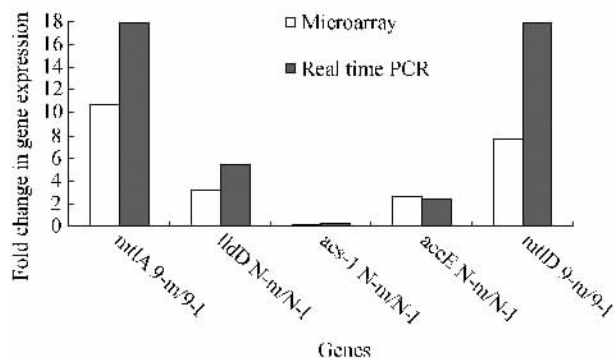


图 2 荧光定量 PCR 法验证芯片结果

Fig. 2 Comparison between microarray and real-time PCR gene expression analyses.

2.3 甘露醇快慢发酵株在不同培养条件下的各自基因表达谱芯片分析

对表达谱芯片结果进行分析, 我们发现慢发酵株 N16961 的芯片表达谱结果显示共有差异基因 142 个, 具有明确功能的基因有 64 个, 另外有 54 个 hypothetical protein, 24 个 unknown class, 在 64 个功能明确的差异表达基因中, 上调基因 48 个, 下调基因 16 个。快发酵株 93097 的芯片表达谱结果显示共有 418 个差异表达基因, 其中具有明确功能的有 270 个, 还有 120 个 hypothetical protein 和 28 个 unknown class; 在 270 个功能明确的差异表达基因中, 有 112 个表达上调基因, 158 个表达下调基因(图 3)。对这些表达差异基因的功能进行分类, 发现这些表达差异基因分布在 14 个功能类群(图 3)。我们主要分析了与细菌的生长代谢密切相关的 6 类功能的基因, 这些类群中包含的表达差异基因也比较多。

2.3.1 转运结合功能类群基因: 在慢发酵株 N16961 中此功能类群基因共有 12 个表达差异基因, 其中 11 个基因在甘露醇发酵液中显示上调(约占总转录差异基因的 7%), 下调基因只有 1 个; 在快发酵株 93097 中表达差异基因有 44 个, 其中上调基因 13 个, 下调基因 31 个, 占总的转录差异基因的比例分别约 3% 和 7%。

在快、慢发酵株中, 负责甘露醇转运的基因 *mtlA* 在甘露醇发酵液中的转录水平与在 LB 中相比均显示上调。*mtlA* 是编码霍乱弧菌中转运甘露醇的 PTS 系统中特异蛋白的基因, 这说明两类菌株在

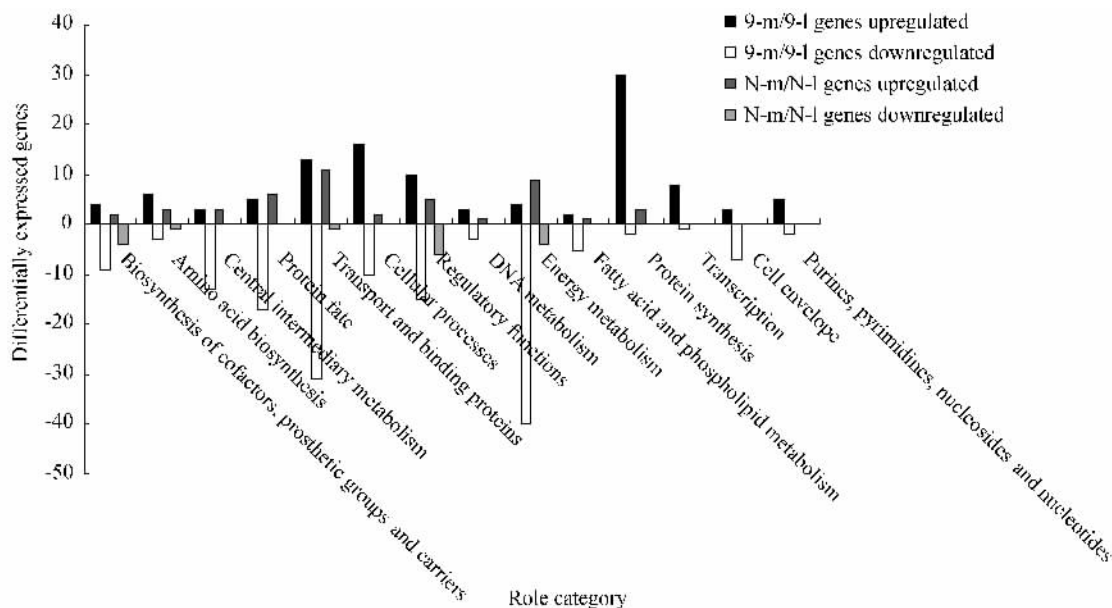


图 3 N16961 和 93097 在甘露醇发酵液和 LB 中生长的表达差异基因的功能分类

Fig. 3 Genes differentially expressed in N16961 and 93097 in mannitol fermentation medium and LB by role category.

甘露醇发酵液中转运甘露醇的能力增加了。慢发酵株 N16961 的表达变化基因中大多数基因在甘露醇发酵液中显示表达上调,其中主要是负责离子转运的相关基因(表 1),如 *vctP*、*vctD*、*mgtE-1*、*exbD2*、*tonB2*;但是快发酵株 93097 中的表达差异基因与慢发酵株 N16961 相比有很大的差异,在 93097 中大多数差异基因在甘露醇发酵液中显示表达下调,这主要包括负责转运碳水化合物、核酸、氨基酸转运复合

物等的基因,如 *dctM*、*dctP-2*、*cysZ*、*mglB*、*vctP*、*ompS*、*malE*、*malF*、*malK*、*fruA-1*、*treB* 等。提示编码转运和外周受体蛋白的基因的表达可能受到甘露醇代谢的反馈抑制作用,尤其是在快发酵株 93097 中由于甘露醇转运较快,推测这些基因的表达受到比在慢发酵株 N16961 中更强的抑制。Gosset 曾经报道葡萄糖的存在也会抑制发酵液中其它碳水化合物的代谢^[6]。

表 1 N-m/N-1 和 9-m/9-1 中表达上调的部分转运和结合功能相关基因

Table 1 Partial positive transcriptional regulation genes related with transport and bind in N-m/N-1 and 9-m/9-1

GenBank	Fold increase	Gene	Description
N-VCA1045	<u>3.5089</u>	<i>mltA</i>	PTS system, mannitol-specific II ABC component
N-VCA0227	<u>2.6996</u>	<i>vctP</i>	vibriobactin and enterobactin ABC transporter
N-VCA0228	<u>2.3433</u>	<i>vctD</i>	vibriobactin and enterobactin ABC transporter
N-VC1655	<u>2.8182</u>	<i>mgtE-1</i>	magnesium transporter
N-VC1428	<u>2.8070</u>	<i>potA</i>	spermidine/putrescine ABC transporter, spermidine/putrescine ABC
N-VC1425	<u>2.2505</u>	<i>potD-2</i>	transporter,
N-VC1545	<u>2.1558</u>	<i>exbD2</i>	TonB system transport protein ExbD2
N-VC1544	<u>3.0479</u>	<i>tonB2</i>	tonB2 protein
N-VC2171	<u>2.9206</u>	<i>uraA</i>	uracil permease
9-VCA0760	<u>2.9791</u>	<i>artP</i>	arginine ABC transporter, ATP-binding protein
9-VCA1045	<u>10.7626</u>	<i>mltA</i>	PTS system, mannitol-specific II ABC component

N-m/N-1 for N16961 in mannitol fermentation medium/N16961 in LB; 9-m/9-1 for 93097 in mannitol fermentation medium/93097 in LB.

2.3.2 能量代谢功能类群基因:慢发酵株 N16961 中此类功能基因中含有上调基因 9 个,下调基因 4 个;而在快发酵株中主要是下调基因 40 个,上调基因只有 4 个。

慢发酵株 N16961 中此类功能基因在甘露醇发酵液中主要表现为上调(占 69%),糖酵解途径中的乳酸脱氢酶和丙酮酸复合体中的 3 个相关的基因, *lldD*、*aceE*、*aceF* 均显示上调,这些基因参与丙酮酸的后续代谢,甘露醇经过一系列的生化反应生成丙酮酸,丙酮酸在乳酸脱氢酶和丙酮酸复合体的作用下,可以分别生成乳酸和乙酰辅酶 A;快发酵株 93097 中此类基因在甘露醇发酵液中主要表现为下调(约占 90.9%,表 2),尤其是一些代谢通路中的基因,包括 TCA 循环中基因(*gltA*、*icd*)、电子转运相关基因(*napA*、*napB*、*napC*)及糖异生途径的基因(*maiA*、*gapA-2*、*gcuH*、*hutH*、*ppsA*)。93097 在甘露醇发酵液中的转录,与在 LB 中相比,虽然生成乳酸途径的代谢酶基因没有表现上调,但代谢中非产酸途径的基因显著下调,因此推测其产酸能力也增强。

2.3.3 蛋白生物合成功能类群基因:慢发酵株 N16961 中此类功能基因较少,只有 3 个上调基因,而 93097 中有 32 个差异基因,其中上调基因 30 个,下调基因 2 个。

慢发酵株 N16961 中 3 个基因 *gltX*、*metG* 和 *prfC* 在甘露醇发酵液中表现上调;快发酵 93097 中有 *pth*、*tgt*、*rluA-1*、*rluA-2*、*rluD*、*rplO* 等 30 个上调基因,这些基因主要负责蛋白合成,如 rRNA 合酶、核糖体蛋白等;与其相应的是,93097 中与转录功能有关基因在甘露醇发酵液中也几乎全部表现为上调(占约 89%),包括与 RNA 合成有关的酶 16s rRNA 加工蛋白、ATP 依赖的螺旋酶以及转录因子,这类功能基因的上调是与蛋白合成的增加是一致的。由于快发酵株 93097 的生长速率(不论在甘露醇发酵液中以及在 LB 中)均比慢发酵株 N16961 为快,因此认为在第一小时时,93097 与 N16961 相比更有效利用了甘露醇,更快速启动了合成反应,这样的结果与霍乱弧菌自身的生理状态有关,因为细菌的代谢总是有利于其生长的。

2.3.4 蛋白质代谢功能类群基因:甘露醇发酵液中多数此类功能基因表达下调,93097 中有 17 个下调基因,包括与蛋白质降解有关的基因 6 个(*pepD*、*pepN*、*prlC*、*hslU*、*trxB*、*VC0157*),这提示在缺少甘露醇的 LB 中,细菌生长所需要的碳源和能量主要是由蛋白质的降解来提供的,另外在慢发酵株 N16961 和快发酵株 93097 在 LB 中的生长速度均高于各自在甘露醇发酵液中的生长速度(图 1),更多的蛋白

表 2 N-m/N-1 and 9-m/9-1 中表达的部分能量代谢相关基因

Table 2 Partial negative transcriptional regulation genes related with energy metabolism in N-m/N-1 and 9-m/9-1

GenBank	Fold decrease	Gene	Description
N-VC0298	<u>0.1289</u>	acs-1	acetyl-CoA synthase
N-VC1338	<u>0.4679</u>	acnA	aconitate hydratase I
N-VC1336	<u>0.4868</u>	prpB	carboxyphosphoenolpyruvate phosphonmutase
N-VC1337	<u>0.3293</u>	prpC	methylcitrate synthase
9-VCA0016	<u>0.3343</u>	glgB	1,4-alpha-glucan branching enzyme
9-VCA0014	<u>0.2538</u>	malQ	4-alpha-glucanotransferase
9-VCA0886	<u>0.4592</u>	kbl	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase
9-VC1344	<u>0.3253</u>	hpdD	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase
9-VCA0829	<u>0.4249</u>	acs-2	acetyl-CoA synthase
9-VC0298	<u>0.3698</u>	acs-1	cetyl-CoA synthase
9-VCA0657	<u>0.1083</u>	glpD	aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase
9-VC2033	<u>0.3111</u>	adhE	alcohol dehydrogenase/acetaldehyde dehydrogenase
9-VCA0747	<u>0.1929</u>	glpA	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase, subunit A
9-VCA0748	<u>0.1899</u>	glpB	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase, subunit B
9-VCA0749	<u>0.2641</u>	glpC	anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase, subunit C
9-VC0423	<u>0.3916</u>	arcA	arginine deiminase
9-VC2698	<u>0.2708</u>	aspA	aspartate ammonia-lyase
9-VCA0027	<u>0.4747</u>	chiA-2	chitinase
9-VC2092	<u>0.4667</u>	gltA	citrate synthase
9-VC1347	<u>0.4312</u>	maiA	maleylacetoacetate isomerase
9-VCA0843	<u>0.4429</u>	gapA-2	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
9-VCA0744	<u>0.0649</u>	glpK	glycerol kinase
9-VCA0136	<u>0.3661</u>	glpQ	glycerophosphoryl diester phosphodiesterase
9-VCA0277	<u>0.3373</u>	gecH	glycine cleavage system H protein
9-VCA1029	<u>0.3494</u>	glgX	glycogen operon protein GlgX
9-VC1202	<u>0.1007</u>	hutH	histidine ammonia-lyase
9-VC1141	<u>0.4096</u>	icd	isocitrate dehydrogenase, NADP-dependent, monomeric type
9-VCA0013	<u>0.2243</u>	malP	maltodextrin phosphorylase
9-VCA0678	<u>0.3586</u>	napA	periplasmic nitrate reductase
9-VCA0679	<u>0.4314</u>	napB	periplasmic nitrate reductase, cytochrome c-type protein
9-VCA0680	<u>0.3732</u>	napC	periplasmic nitrate reductase, cytochrome c-type protein
9-VCA0987	<u>0.3104</u>	ppsA	phosphoenolpyruvate synthase
9-VC1570	<u>0.4093</u>	qxtB	quinol oxidase, subunit II
9-VCA0131	<u>0.4029</u>	rbsK	ribokinase
9-VC2616	<u>0.4683</u>	aruD	succinylglutamate 5-semialdehyde dehydrogenase
9-VC1203	<u>0.1907</u>	hutU	urocanate hydratase
9-VCA1073	<u>0.2830</u>	putA	prolin

N-m/N-1 for N16961 in mannitol fermentation medium/N16961 in LB; 9-m/9-L for 93097 in mannitol fermentation medium/93097 in LB.

质降解可为霍乱弧菌的快速生长提供更多的营养物质。与此相应的是编码热休克蛋白和分子伴侣相关基因在 LB 中的表达显示上调,这表明在 LB 生长的霍乱弧菌中存在着较高的蛋白转换率,这与有关文献的报道是一致的,蛋白的降解和错配会诱导热休克蛋白和分子伴侣的高表达^[7,8]。

2.3.5 嘌呤、嘧啶、核苷及核苷酸的生物合成有关基因: N16961 和 93097 中共有 6 个与核酸的合成有关的、在甘露醇发酵液中上调的基因,其中大多是参与核酸的“从头合成”途径有关基因^[9],如 N16961 中 *pyrB* 和 *galU*, 93097 中 *pyrD*、*purK*、*purN* 和 *prsA*, 甘露醇发酵液中这些基因表达的上调可能是甘露醇代谢

中间产物提供了充足的碳源,增强了细胞“从头合成”的能力。

2.3.6 主要中间代谢功能类群基因: 在这两个菌株中,尤其是快发酵株在甘露醇发酵液中与在 LB 中相比,一些参与碳、氮代谢的有关基因均下调,例如 *glnB-2*、*pvcA*、*speG* 以及 *nema* 等,这表明甘露醇的存在对其它碳、氮的代谢具有抑制作用,此时霍乱弧菌在甘露醇发酵液中生长所需要的能量和碳源主要是由甘露醇提供。

3 讨论

建立噬菌体-生物分型并使用至今,发现流行株和非流行株在山梨醇和甘露醇发酵上表现了明显的差异。通过对霍乱弧菌 N16961(为产毒株,并且为山梨醇和甘露醇慢发酵)和 93097(为非产毒株,并且为山梨醇和甘露醇快发酵)在甘露醇发酵液和 LB 中基因表达谱的分析,我们鉴定出了一些转录水平具有显著差异的功能基因,显示产毒株和非产毒株在甘露醇发酵液和 LB 中的生理代谢均存在很多的差异。与在常规的 LB 培养条件相比,在甘露醇发酵培养基中,首先是甘露醇诱导代谢相关基因的高表达,尤其是明确看到甘露醇特异 PTS 转运系统中 *mtlA* 基因在甘露醇发酵液中明显上调,同时其中甘露醇的存在抑制了糖异生和其它碳源转运和结合的相关基因的转录水平;其次在甘露醇存在的条件下蛋白质的生物合成能力增强了,同时核酸的“从头合成”能力也增强了,这也提示在缺少甘露醇时, LB 中蛋白质的降解对于细菌的生长更重要,此时 LB 中蛋白质的降解为霍乱弧菌的快速生长提供了更充足的营养物质。

我们也发现同样在 LB 以及甘露醇发酵液中培养,慢发酵株 N16961 和快发酵株 93097 在一些功能类群基因上转录的种类和数量不同,认为是由于快慢发酵株对甘露醇的转运进入细胞以及利用的速率有不同,虽然在第一小时两个菌在两种培养液中生长浓度相似,但快发酵株因获得更多的甘露醇、诱导启动了更强的生长潜力,因此会造成这两个菌株即便在同一时间点上,其转录谱也是有差别的。

总之,基因的表达差异是与霍乱弧菌的生长环境相关的,一方面快发酵株和慢发酵株在 LB 中的生长速度均快于其在甘露醇中的生长速度,另一方面,在甘露醇发酵液中,甘露醇为霍乱弧菌的生长提供了丰富的碳源,而且霍乱弧菌发酵甘露醇会产酸,细菌要适应酸性环境和甘露醇发酵液这个相对的高渗环境,这些外界环境因素导致了甘露醇发酵液和 LB 中相关功能基因的作用差异。这些差异表达基因可能与霍乱弧菌代谢甘露醇并产酸途径有关,这为我们研究甘露醇发酵实验区分能引起霍乱流行的

产毒株和不致病非产毒株提供了基础数据,有利于进一步明确产毒株和非产毒株发酵甘露醇速度的差异机制。

参考文献

- [1] Herrington DA, Hall RH, Losonsky G, et al. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. *Journal of Experimental Medicine*, 1988, 168: 1487 – 1492.
- [2] Kurazono HA, Pal PK, Bag GB, et al. Distribution of genes encoding cholera toxin, zonula occludens toxin, accessory cholera toxin, and El Tor hemolysin in *Vibrio cholerae* of diverse origins. *Microbial Pathogenesis*, 1995, 18: 231 – 235.
- [3] 高守一. 埃尔托型霍乱弧菌流行株和非流行株两类菌株的研究及应用. 中华流行病学杂志(*Chinese Journal of Epidemiology*), 1988, 9(特刊 3 号): 10 – 26.
- [4] 郑霄, 王淑京, 阚颀等. 霍乱弧菌两类菌株甘露醇发酵特征分析. 中国预防医学杂志(*China Preventive Medicine*), 2005, 6: 121 – 125.
- [5] Pang B, Yan MY, Cui ZG, et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189: 4837 – 4849.
- [6] Gutierrez-Rios RM, Freyre-Gonzalez JA, Resendis O, et al. Identification of regulatory network topological units coordinating the genome-wide transcriptional response to glucose in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*, 2007, 7: 53 – 71.
- [7] Goff SA, Goldberg AL. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of *lon* and other heat shock genes. *Cell*, 1985, 41: 587 – 595.
- [8] Parsell DA, Sauer RT. Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in *Escherichia coli*: dependent on protein level not protein degradation. *Genes and Development*, 1989, 3: 1226 – 1232.
- [9] Sciortino CV, Finkelstein RA. *Vibrio cholerae* expresses iron-regulated outer membrane proteins in vivo. *Infection and Immunity*, 1983, 42: 990 – 996.

Gene expression differences of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains in mannitol fermentation medium and Luria-Bertani broth

Hongzhi Zhang, Bo Pang, Li Zhang, Biao Kan*

(State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China)

Abstract: [Objective] To analyze gene expression differences of toxigenic and nontoxigenic strains of El Tor *Vibrio cholerae* growing separately in mannitol fermentation medium and LB (Luria-Bertani) broth. [Methods] Total RNA was extracted from the mannitol slow-fermenting strain N16961 (toxigenic) and the mannitol fast-fermenting strain 93097 (nontoxigenic) at 1 h of fermentation. The large scale gene expression profiles were detected and compared with high throughput microarray. [Results] By comparing the strains growing in different cultures, we found 142 differentially expressed genes in N16961 and 418 genes in 93097. Most of these genes were grouped into six functional classes. They were mainly related to transport and binding, energy metabolism, protein biosynthesis, and protein fate. [Conclusion] The expression levels of genes in N16961 and 93097 were affected by culture conditions, which can serve as basis for further studying the mechanism of metabolism of mannitol.

Keywords: *Vibrio cholerae*; mannitol fermentation; gene expression profile

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (G1999054102)

* Corresponding author. Tel: +86-10-61739458; E-mail: kanbiao@icdc.cn

Received: 19 December 2008/ Revised: 16 March 2009

1953年创刊以来所有文章全文上网

2008年1月中旬,《微生物学报》自1953年创刊以来的文章全文上网啦!欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>)浏览、查询、免费下载全文!

建立全文数据库的工作是从2007年初开始的,经过多方人员的共同努力,历经半年多时间成功完成。由于《微生物学报》历史悠久,其间经历了期刊的变化,变化情况统计如下,以供读者查阅参考。

《微生物学报》刊、期统计表

2008年12月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953~1956	半年刊	1~4	1~2
1957~1958	季刊	5~6	1~4
1959	季刊	7	1~2
1959~1962	停刊3年		
1962	季刊	8	3~4
1963~1965	季刊	9~11	1~4
1966	季刊	12	1~2
1966~1972	停刊6年半		
1973~1988	季刊	13~28	1~4
1989~2007	双月刊	29~47	1~6
2008	月刊	48	1~12