

应用 DNA 芯片技术研究体外表达禽致病性 大肠杆菌可能致病基因

宦海霞^{1,2}, 周琼¹, 赵李祥¹, 高崧^{1*}, 刘秀梵¹

(¹扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室, 扬州 225009)

(²淮阴师范学院生物系, 淮安 223001)

摘要:应用 DNA 芯片研究禽致病性大肠杆菌可能致病基因的表达。构建禽致病性大肠杆菌毒力基因、潜在毒力基因的 DNA 芯片,应用基因芯片技术对同属 O2 血清型的禽高致病性大肠杆菌 E058 株和低致病性大肠杆菌 E526 株在体外 LB 培养基和鸡血清培养状态下进行差异表达分析。结果:在体外 LB 静置培养状态下,低致病株 E526 与高致病株 E058 相比共有 16 个差异基因,均为下调基因。在鸡血清静置培养中,E526 与 E058 相比共有 15 个差异基因,均为下调基因。应用基因芯片成功筛选了禽致病性大肠杆菌在体外不同条件下的毒力基因及可能毒力基因中差异表达基因,表明一些铁摄取系统相关基因对 APEC 的毒力较重要,同时也筛选出了一些新的可能致病基因 *aes-1*, *aes-2*, *aes-3*, *aes-4*, *aes-6*, *aes-8*, *aes-10*, *aes-13*, *aes-15*, *aes-31* 等。

关键词:禽致病性大肠杆菌;毒力基因;体外培养;基因表达;DNA 芯片

中图分类号: Q786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008)01-0103-09

禽致病性大肠杆菌 (avian pathogenic *Escherichia coli*, APEC) 可引起家禽局部或全身性的感染,包括呼吸道感染 (气囊炎和肺炎)、心包炎、肝周炎和败血症等^[1],其优势血清型为 O1:K1, O2:K1 和 O78:K80^[2,3],与其致病相关的毒力因子已相继报道,如铁摄取系统、1 型菌毛、P 菌毛、V 型大肠杆菌素等^[1,4]。然而,关于禽病原性大肠杆菌引起入侵性感染的机理还没有搞清楚,一些已知的致病因子仅能解释感染过程的某些步骤^[5]。在大量禽源大肠杆菌的致病性实验中,发现有相当比例的分离株并不具备已知的毒力因子,却具有较强的致病性^[6,7],说明这些分离株还存在其它未知毒力因子。我们在致力弄清禽致病性大肠杆菌已知毒力因子的同时,也进行 APEC 一些新的可能致病基因的筛选。

本文利用基因芯片技术进行了 APEC 高致病株 E058,低致病株 E526 在体外 LB 培养和在鸡血清培养过程中差异表达基因的筛选,旨在探讨毒力基因、潜在毒力基因在体外表达方面的差异,为寻找

APEC 新的致病基因提供新手段。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:禽致病性大肠杆菌高致病株 E058 (O2 血清型) 和低致病株 E526 (O2 血清型) 由扬州大学农业部畜禽传染病学重点开放实验室分离、鉴定、保存^[8,9]。

1.1.2 主要试剂和培养基:麦康凯干粉培养基、营养琼脂为上海市医学化验所试剂厂产品;细菌培养采用 LB 液体和固体培养基,按常规方法制备^[10];抗性选择培养基中氨苄青霉素 (Ap) 的工作浓度为 100mg/L; PCR 试剂盒购自 Promega 公司; dNTP 购自上海生工公司;克隆载体为 pGEM-T® easy Vector, 购自 Promega 公司。Cy5-dCTP、Cy3-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, USA); dNTP, 10 mmol/L each (上海英骏生物技术有限公司); Random Primer, 9mer (上海英骏生物技术有限公司);

基金项目: 国家“863 计划”(2003AA222141); 国家自然科学基金(30471281, 30771604)

*通讯作者。Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

作者简介: 宦海霞(1976-), 女, 江苏句容人, 博士, 研究方向是预防兽医学。E-mail: coocean@yzu.edu.cn

收稿日期: 2007-04-19; 修回日期: 2007-10-26

NucleoSpin® RNA clean-up 试剂盒(MACHEREY-NAGEL, Germany); PCR NucleoSpin Extract II Kit (MN, Germany); M-MLV 反转录酶(Invitrogen), cDNA Synthesis Kit (Promega); 其它常规试剂均为国产分析纯级产品。鸡血清来自于健康鸡, 用于细菌培养的健

康鸡血清按常规方法制备, 过滤除菌后使用。

1.1.3 引物: 根据已发表的 APEC 毒力基因和部分耐药基因的序列, 设计上游引物和下游引物, 部分参照已发表的引物, 引物合成由上海生工生物工程公司完成(表 1)。

表 1 靶基因扩增所用引物、模板以及退火温度
Table 1 Gene targeted, template, primer sources and annealing temperature in this study

Primer	Primer sequence (5' 3')	Template	Annealing Temp/°C	Size of amplified product /bp	Reference
<i>fimC</i>	CGTCAATGTAAGGAAATCGCAGG GGCATTCAACTCTGTTACCGTC	E058	60	565	AY734876
<i>fimH</i>	ATGAAACGAGTTATTACCCTGTTT TTATTGATAAAACAAAAGTCACGCC	E058	55	854	AF089840
<i>tsh</i>	TTATTCTCTTCGCTACAG GATGACAGGCTACCGACAG	E149	59	685	AF218073
<i>iroN</i>	TCCTGGTTGGGTTGAATA CAGCCAGAGGCCCACTA	E149	55	603	AF449498
<i>irp2</i>	AAGGATTCGCTGTACCAGGA TCGGCCAGGATGATTCGTCG	E149	58	295	L18881
<i>fyuA</i>	ACACGGCTTTATCCTCTGGC GGCATATTGACGATTAACGAA	E149	55	953	Z29675
<i>kpsM</i>	GCGCATTTGCTGATACTGTTG CATCCAGACGATAAGCATGAGCA	1794	58	237	Johnso & Stell(2000)
<i>csgA</i>	ACTCTGACTTGACTATTACC AGATGCAGTCTGGTCAAC	E037	53	200	X90754
<i>papC</i>	GACGGCTGACTGCAGGGTGTGGCG ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA	E058	64	353	Le ouguenec et al. (1992)
<i>felA</i>	GGCAGTGGTGTCTTTGGTG GGCCAGTAAAAGATAATTGAACC	E058	58	279	L07420
<i>facA</i>	ATGAAGTTAAAATTCATCTCC CTGGTACTGAACTTTAAAGG	E058	50	540	AF298200
<i>cvaC</i>	CACACACAAAACGGGAGCTGTT CTTCCCGCAGCATAAGTTCCAT	E149	60	678	Johnso & Stell(2000)
<i>Iss</i>	GTGGCGAAAACACTAGTAAAACAGC CGCCTCGGGTGGATAA	E058	58	760	Johnso & Stell(2000)
<i>iucCD</i>	ATCCATGATTTGCAGACGG ATGACAATCCGGTACCAGCA	E149	55	467	AY553855
<i>vat</i>	TCGCTTACCCTGACTATCC CCTTACCAGACATACCGC	2#	57	441	AY151282
<i>bmaE</i>	GCTATCGCAAGCAGTGTC CAATGTCTGGTCTCCGAAG	17#	57	444	M15677
<i>hlyE</i>	ACTCTCAATCGGCATCCAC CTTCAACAACCCAGCAG	3#	57	453	AF052225
<i>cnfI</i>	ACGCAGTTTCAGTGATGGTG TCATAGTAGATGCCGCTCAG	A	57	534	X70670
<i>chuA</i>	GAACCAACGGTCAGGATG ATGGATTCGTCATTCGGC	2#	55	415	AM055961
<i>hlyA</i>	ATGGATTCGTCATTCGGC TTGTCAGGACGGCAGATG	HEC2	55	472	AF037578
<i>sitA</i>	ACAACCTTTACCATCATCGC GTCCGCAATCTGCTTAC	E058	53	451	AY598030
<i>kfiB</i>	GAGGGATTAGAATACGAGAC GCATTATGGGAGGTAGTCG	B	56	579	X77617
<i>papGII</i>	CCTTGTGTGTCTGGTGAG TCAGTCAGACGGGTTGTTTC	HEC4	57	415	AY212280
<i>papGIII</i>	TGTCAGGCTGTAATGATGCTC CTGTCCAGATGTGTTGCTTC	24#	58	368	AF237473
<i>ireA</i>	ATTACACGCTGATTCTGGTC CTTCTGGCTTTCAGTCGG	3#	55	440	AF320691

(to be continued on the next page)

(Continued)

Primer	Primer sequence (5' 3')	Template	Annealing Temp/°C	Size of amplified product /bp	Reference
<i>focG</i>	AGCACAGGCAGTGGATACG TAATACTTCCCGCACCAGC	23#	57	414	S68237
<i>malX</i>	GCTGGCGACTAATAACCC TATCCCATTGCTCTGCTAAG	5#	55	411	AF081286
<i>afaBC</i>	GCTGGGCAGCAAACCTGATAATTCTC CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG	HEC4	63	793	Le ouguenec <i>et al.</i> (1992)
<i>sfaDE</i>	CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA	HEC4	62	408	Le ouguenec <i>et al.</i> (1992)
<i>gyrB</i>	CACCATTACGCGGATAAC CCACTTCGACGCCAATACC	HEC4	57	581	X04341
<i>recA</i>	AAAACCACGCTGACGCTG AAGTTGATACCTTCGCCG	10#	55	595	V00328
<i>mdh</i>	GGAGTTTAGGATGAAAGTCGC GCCCATAGACAGGGTTGC	HEC4	58	674	Y00129
<i>uspA</i>	GCGTTGGCATCTGCTTTG GCCGTTATTGGATACCGAC	B	57	615	AB056440
<i>sepL</i>	TAATCAAAACACCGCATCTG ACTCCCAATCATCTTCGCC AGAGTTAGTTGTGGTGAGGTG	933W	55	473	AJ277443
<i>fepC</i>	ATGGCGAGCACATTCAAC ACAACCTCCAGCAAATCAATC	933W	53	357	X57471
<i>rtx</i>	GGTACCCGTTACCTTTGGC GGTTACCCGCTTATCGC	933W	57	446	AE005229
<i>ehxA</i>	TTGCTGAGAAAACAACGGG CCAACATTTCCAAGAACCTG	933W	55	360	AF043471
<i>espP</i>	TAGTGAAGAAAGATGGCTCC GTCATCAATGTGAACGAAAG	933W	53	458	AF074613
<i>flic</i>	ATCGGTGGAAGCCAGGCATACG GCAGCATCACTGGATTACCCG	933W	63	350	U47614
<i>iha</i>	TAACCACTCTGGCTTCCGTAG CTGACAGAATCATCCACAAGG	933W	58	592	AF126104
<i>tir</i>	GCACCTCCAFACCTTCAC CAACGGTGACCATAGCAT	933W	55	451	AF070067
<i>eae</i>	TAACGGCTATTTCCGCATGA TCCCAGACGATACGATCCAG	933W	53	552	AJ223063
<i>ler</i>	CGCACACAACAAGCCCATAC GATGAGTTCGGCGGAGCA A	933W	59	195	AF200363
<i>stx1</i>	GCAGTTGATGTCAGAGGGATA CTACTCAACCTTCCCCAGTTCATG	933W	50	473	M17358
<i>stx2</i>	TATCTCAGGGGACCACATCGG ACACAGGAGCAGTTTCAGACAGT	933W	50	430	M59432
<i>rfbE</i>	CTACAGGTGAAGGTGGAATGG ATTCTCTCTTTCCCTGCGG	933W	59	327	S83460
<i>paa</i>	GGTCCTGGTGGCCCGCATAC GTCTGGTCAGGTCGTCGAATAC	933W	59	292	U82533
<i>katP</i>	GTCGCTGAAAGAGCAGGTTA TACTCCATCGTGTGACATATCC	933W	57	641	X89017
<i>neuC</i>	TGCTAAGAGAAACTCCAGAA GATCATTAACCGACTGCGTG	14#	53	594	M84026
<i>etpD</i>	GGGACTGGTGATGAGGTTG CCACTAAATCCTTCGCCTTC	933W	55	487	Y09824
<i>toxB</i>	GGCAAATACACCTTCTC CATTAGGGGCGATGTTTAC	933W	55	572	AB011549
<i>tagA</i>	TGAGAGATGGAGAACACCG GAATAGAACTCCCCTGG	933W	57	494	NC002128
<i>cesT</i>	GCTTTTATTAGATAGATTTGC ATGTTATTCCCTGATTATG	933W	50	383	AF253560
<i>pas</i>	GCGGGAGATGTTGATACC GATGTCTTAACGGAATACGG	933W	55	531	Y13068

(to be continued on the next page)

(Continued)

Primer	Primer sequence (5' 3')	Template	Annealing Temp/°C	Size of amplified product /bp	Reference
<i>espA</i>	ATGTGAGTGCAGTTCTTC TATTCACCTACCGTTGTCAGG	933W	55	432	Y13068
<i>cdtA</i>	CTCAAGTAGAGGGAGGACC TCTGGCTTAAACAATAGTGGC	17#	55	601	AJ508930
<i>east</i>	ATCCTCATCGCCTGTGTG CGAGTGACGGCTTTGTAG	1#	57	149	L11241
<i>bfpA</i>	CGTTACCGCAGGTGTGATG CAGCAGGAGTAATAGCAGTCG	37#	59	438	Z68186
<i>cif</i>	ATAGGGCGAGAGAAAGGC GGTGTCCATACTCAAACAACCTGG	37#	52	510	AY128538
<i>efal</i>	GATGGAACCTATCCTGCCG CATAGGTGATAACGACGAAG	37#	57	376	AF159462
<i>sheA</i>	GCAGATAAAACGGTAGAAG CCCGCAGCAATAGAATAG	37#	53	576	AF200955
<i>perA</i>	CACCGAATACACAATAGAATCC CATTGAACCTACTGACATCGCC	37#	56	427	AF255771
<i>espB</i>	TAACAGTGTACGAAAGGCG GCTCTGCGAACTTCTTGC	37#	57	495	AF144010
<i>OmpA</i>	GACTGGTTAGGTCGTATGCC AACAAACAGACTGAGCACGG	37#	57	618	V00307
<i>faeG(K88)</i>	CCTGGATGACTGGT CGTAGCAATAACTTATTAC	107/86	58	788	M35945
<i>K99(fanC)</i>	AATACAGGTACATTAACCTCAATG ATCCTTCTTAGTCACTTATATG	C83907	58	477	M35282
<i>987P(fasA)</i>	GCGCCCCTGAAAACAA CGGTGTACCTGCTGAACGAA	987P	59	513	M35257
<i>F41</i>	GCTGATTGGACGGAAGGT TTAACTATAAATAACGGTGATAGTC	Fc	57	768	X14354
<i>f17a-A</i>	GCTACGCTTGCTTATGAC CGTGTTCCGATTAGGTTT	C83927	55	243	AF022140
<i>lt</i>	TGGATTCATCATGCACCACAAGG CCATTTCTTTTTGCCTGCCATC	2134	50	313	X83966
<i>sta</i>	TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG ACAGGCAGGATTACAACAAAG	2134	58	166	M34916
<i>stb</i>	TGCCTATGCATCTACACAATC GCAGTGAGAAATGGACAATG	2134	50	283	M34916
<i>stx2eB</i>	GCGGATTGTGCTAA AGTTAAACTTACCTGG	TB1	58	205	AB252836
<i>tetA</i>	CACTATGGCATTCTGCTGGC CATAGATCGCCGTGAAGAGG	S0503	59	948	X00006
<i>tetB</i>	GCCCAGTGCTGTTGTTGTC AAGACCAAGACCCGCTAATG	S09256	57	553	J01830
<i>tetG</i>	CGGTCTTATGGGTGCTCTAT CCTTGCTTGTTACTGCTGAC	S213	57	900	AF071555
<i>blaTEM-1</i>	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA ACTCCCCGTCGTGTAGATAA	10159	46	643	AJ6346025
<i>carb2(blaPSE)</i>	GGTGTTCCTGTTCTTGATA TATTGCCTTAGGAGTTGTGC	S5109	55	423	DQ238104
<i>addA1</i>	TATCAGAGGTAGTTGGCGTCAT GTTCCATAGCGTTAAGGTTTCATT	S10158	53	537	AY125351
<i>sull</i>	GTGACGGTGTTCGGCATTCTG TCTAACCCCTCGGTCTCTGGC	02/98	51	825	AF071555
<i>sullI</i>	CATTTTCGGCCTCGTCAAC AGTTTGGCAGATGATTTTCGC	S0503	55	357	AF542061
<i>addA2</i>	TGTTGGTACTGTGGCCGTA GATCTCGCCTTTCACAAAGC	S5216	58	713	AF071555
<i>strA-B</i>	AACGCCTTGCCCTTCTATCTGC CCAAAGCCCACTCACCGAC	41/06	60	645	AF100173
<i>qac</i>	CTCCGCCGTTGTCATAA GCAGCGACTTCCACGATG	S5213	55	234	AY152821

(to be continued on the next page)

(Continued)

Primer	Primer sequence (5' 3')	Template	Annealing Temp/°C	Size of amplified product /bp	Reference
<i>Int-1</i>	CGAATGTCGTAACCGCTG CCTTGATGTTACCCGAGAG	S5213	57	455	AF071555
<i>cat1</i>	GTATGGCAATGAAAGACGG TCAGCACCTTGTGCCTT	S5413	55	333	U46780
<i>floR</i>	TATGGTGATGCTCGGCGT TTCGTGCCACCTGAAACC	S4207	57	403	AY499129
<i>Aac(3)-IV</i>	GTCTCTGACACATTCTGGCG ATGACCGACTGGACCTTC	S5213	57	387	X01385
<i>dfi-12</i>	GAATCGGTCCGCATTTATC ATTGGGAAGAAGGCGTCAC	S9305	55	354	AF175203
<i>aph(3)-Ia</i>	AGCGTCTCCGACCTGATG GTATTGACCGATTCTTGC	S5301	55	372	V01499
<i>cmlA</i>	CTCTTGTTTGGACCGCTATC ACAACCAGAAAGTTCAGGCAC	S5339	57	454	DQ018384
<i>uidA</i>	GTCACGCCGTATGTTATGTC AACTGTTCCGCCCTTCACTG	933W	57	493	AF30597
<i>fhuA</i>	CCGAACCGCTGAAAGAAG CAGACGCCGTAACCATAAAC	933W	57	481	M12486
<i>yjaA</i>	AGACGCTGCCTTCAGTAAC GACGCTCTGAGGTGGACG	1#	57	437	U00096
<i>feoB</i>	GTGTAGGTAAGTGGGCTGG AGTGAATCTGCTTCGTTGAG	E149	55	478	X71063

1.2 目的基因的克隆、鉴定和分析

PCR扩增目的基因按产品说明书进行, 退火温度见表1。扩增后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 用Agrose Gel DNA Extraction Kit 回收目的条带。基因的克隆鉴定按《分子克隆实验指南》中的方法进行^[10]。由上海联合基因公司完成重组质粒中的插入片段DNA自动测序, 结果与GenBank中同基因序列比较, 进行综合分析。

1.3 芯片制备

包含154个探针的cDNA表达谱芯片由北京博奥生物有限公司合成, 包括大肠杆菌部分已知的毒力基因、耐药基因以及抑制性差减杂交(Suppression subtractive hybridization, SSH)和选择性捕获转录序列(Selective capture of transcribed sequences, SCOTS)方法筛选的可能致病性基因(由陈祥博士提供)(表2、3)等。以通用引物进行PCR扩增, PCR产物长度为500~1000bp。靶基因以0.5mg/mL溶解于DNA点样液(CapitalBio Corp., Beijing, China)中, PCR产物用SmartArrayTM microarrayer (CapitalBio Corp.)点样于氨基硅烷化玻片上。玻片经水合(2 h)、室温干燥(30 min)、紫外线(UV)交联再分别用0.5% SDS水洗涤, 再以无水乙醇浸泡(30 s), 离心干燥。

1.4 细菌RNA提取

1.4.1 细菌的培养和鉴定: 将禽病原性大肠杆菌E058、E526株分别接种于LB液体培养基、健康鸡全血清, 于37°C静置培养至对数生长期(OD_{600} =0.4~0.8)。

1.4.2 提取细菌的RNA: 使用热酚法提取细菌的总RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩RNA, 并进一步采用NucleoSpin® RNA clean-up试剂盒对总RNA进行过柱纯化, 最后用分光光度计定量, 甲醛变性胶电泳质检。

1.4.3 RNA纯化: 电泳检查符合标准, 参照产品说明书进行RNA纯化。

1.5 RNA的随机引物反转录和纯化

按《分子克隆实验指南》中的方法进行反转录^[10]。反转录产物用PCR NucleoSpin Extract II Kit纯化, 过程同方法1.4.3。

1.6 杂交

1.6.1 cDNA用Klenow酶标记: 将纯化后的反转录产物(浓缩至14μL)和9 Random Primer引物(4μL)先95°C变性3min, 再进行Klenow酶标记。标记过程中dATP, dGTP, dTTP使用浓度120μmol/L, dCTP使用浓度为60μmol/L, Cy5-dCTP、Cy3-dCTP使用浓度为40μmol/L。Cy3-dCTP标记实验组cDNA, Cy5-dCTP标记对照组cDNA, 标记的总体积为26μL, 37°C, 90min; 70°C变性5min; 冰浴5min。

标记产物用PCR NucleoSpin Extract II Kit纯化, 过程同1.4.3。不同点为用NE洗脱2次(30μL/次), 纯化后抽干至1.5μL。

1.6.2 杂交: 标记的DNA溶于3μL灭菌水中(溶解顺序为先实验组-cy3, 再对照组-cy5), 加入甲酰胺6μL和4×杂交液缓冲液3μL, 杂交体系为总体积12μL, 95°C变性3min, 冰浴5min, 将杂交液点在芯片上, 于

表 2 SSH 方法获得的 APEC E058 特异的潜在毒力基因片段

Table 2 APEC E058-specific fragments of potential virulence genes obtained by SSH

SSH fragment	Insert size/bp	GenBank accession No.
<i>ecs-1</i>	765	M31808
<i>ecs-6</i>	534	AF218051
<i>ecs-7</i>	1519	AF218051
<i>ecs-8</i>	984	AF218051
<i>ecs-9</i>	629	D30057
<i>ecs-10</i>	649	D30061
<i>ecs-11</i>	594	AY048853
<i>ecs-12</i>	215	AF218051
<i>ecs-13</i>	689	AF311902
<i>ecs-14</i>	801	AF311902
<i>ecs-15</i>	180	AE015101
<i>ecs-16</i>	330	AE000412
<i>ecs-17</i>	220	X61676
<i>aes-1</i>	576	AF550679
<i>aes-2</i>	1144	AF550679
<i>aes-3</i>	721	AF550679
<i>aes-4</i>	933	AF550679
<i>aes-5</i>	586	AJ223631
<i>aes-6</i>	697	AY205565
<i>aes-7</i>	412	AY205565
<i>aes-8</i>	652	X14566
<i>aes-9</i>	253	X05874
<i>aes-10</i>	550	U15625
<i>aes-11</i>	321	AE016765
<i>aes-12</i>	792	AF493797
<i>aes-13</i>	616	U82619
<i>aes-14</i>	594	AE016764
<i>aes-15</i>	304	AE016758
<i>aes-16</i>	367	AE016760
<i>aes-17</i>	424	AE016760
<i>aes-18</i>	393	AE016760
<i>aes-19</i>	893	AE016761
<i>aes-20</i>	259	AE016761
<i>aes-21</i>	230	AE016768
<i>aes-22</i>	478	AE016771
<i>aes-23</i>	321	AE016772
<i>aes-24</i>	270	AE016772
<i>aes-25</i>	639	AF222160
<i>aes-27</i>	1024	X57524
<i>aes-28</i>	216	L07942
<i>aes-29</i>	465	U82619
<i>aes-30</i>	1201	AE016759
<i>aes-31</i>	1199	AE016759
<i>aes-32</i>	372	D90750

采用 t 检验方法进行差异表达基因挑选。博奥生物有限公司

表 3 SCOTS 方法获得的 APEC 特异性潜在毒力基因片段
Table 3 APEC pathogen-specific fragments of potential virulence genes identified by SCOTS

Functional group	Insert size/bp	Accession No. of <i>aec</i> homolog
<i>aec-8</i>	261	D30057
<i>aec-11</i>	223	D30059
<i>aec-13</i>	275	Y14016
<i>aec-14</i>	322	AF218051
<i>aec-18</i>	253	AB027308
<i>aec-20</i>	342	AY333433
<i>aec-24</i>	435	AE005674
<i>aec-25</i>	473	AE005674
<i>aec-26</i>	293	AE005674
<i>aec-27</i>	392	AE005674
<i>aec-29</i>	254	AE000516
<i>aec-30</i>	393	AJ875436
<i>aec-31</i>	386	X58999

42℃水浴过夜;杂交结束后,先在 42℃左右含 0.2% SDS, 2×SSC 的洗液中洗 5 min, 然后在 0.2×SSC 溶液中室温洗 5 min。玻片甩干后即可用于扫描。

1.7 芯片图像的采集和数据分析

芯片用 LuxScan 10KA 双通道激光扫描仪 (CapitalBio 公司)进行扫描。

采用 LuxScan 3.0 图像分析软件对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号;然后对芯片上的数据用 Lowess 方法进行归一化;最后以 t test 结合两倍差异的标准来确定差异表达基因。筛选差异表达基因标准为(1)统计意义:在 95%显著性水准上为显著差异;(2)生物学意义:差异表达大于 2 倍。

2 结果

2.1 目的基因的获得

PCR 扩增共获得 97 个目的基因,其中包括已知的大肠杆菌部分毒力基因、耐药基因和看家基因。经酶切鉴定和测序,均为正确的基因序列,经 BLAST 搜索,靶基因均为特异性片段。57 个经 SSH、SCOTS 筛选出的 APEC 潜在毒力基因片段已由陈祥博士测序鉴定^[11, 12]。

2.2 芯片制备

包含的 154 个 cDNA 的表达谱芯片平台由扬州大学和博奥生物有限公司共同构建。扬州大学提供探针,博奥生物有限公司将此探针库用 SmartArrayTM microarrayer (CapitalBio Corp., Beijing, China)点制在一张 75×25 mm、经过化学修饰的载玻片上。点制在芯片上的样品还包括:Hex 作为点样阳性对照,以及

酵母的 8 个基因间序列作为外标。整个点阵分成 1 个亚阵：亚阵有 24 列，21 行，点间距为 180 μ m，点的直径约为 150 μ m，每个样品在芯片上重复 3 次。

2.3 细菌 RNA

用分光光度计定量，甲醛变性胶电泳质检显示(表 4)所提取的 RNA 样品电泳条带清晰，28S 比 18S rRNA 条带亮度接近或大于 1:1，质量符合实验要求，可以进行芯片实验。

2.4 芯片的杂交实验结果

2.4.1 LB 静置培养条件下的 E526/E058 芯片扫描图和差异基因：图 1 为 E526 株和 E058 株进行杂交的扫描叠加图片，图片上方标注部分为质控基因。其中，HEX 为固定化的阳性对照，DMSO 为杂交的阴性对照，Y1-Y8 为杂交的阳性对照。不同点信号值不同，其颜色不一样。白色表示该点信号达到饱和，绿色代表 E058 株该基因表达量高于 E526 株，红色反之，黄色代表两者的表达量相当。

由此杂交图可以作出如下判断：实验组样品 E526 株基因表达和对照组样品 E058 株的基因表达有差异，E526(cy5)/E058(cy3) 共有 16 个差异基因，

均为下调基因(表 5)，质控基因显示杂交过程正确。

2.4.2 鸡血清培养条件下 E526/E058 芯片扫描图和差异基因：图 2 为 E526 株和 E058 株进行杂交的扫描叠加图片。白色表示该点信号达到饱和，绿色代表 E058 株该基因表达量高于 E526 株，红色反之，黄色代表两者的表达量相当。由此杂交图可以作出如下判断：E526(cy5)/E058(cy3) 差异表达基因共有 15 个，均为下调基因(表 6)，质控基因显示杂交过程正确。

3 讨论

有研究报告指出，尿道致病性大肠杆菌(UPEC)在人的尿液中生长时，其毒力基因的表达，部分类似于其在小鼠尿道内的表达^[13]。因此联想到以鸡血清部分模拟鸡体内的生长环境，并以 LB 培养基作对照，对 APEC 的高致病株 E058，低致病株 E526 在这些条件下的差异表达基因进行研究。

鸡血清中培养的 E526 株与 E058 株相比，出现了 15 个基因的下调(表 6)，在 LB 培养基中，则出现了 16 个基因的下调(表 5)。APEC E526 株有 11 个目标基因在 2 种培养条件下表现一致，即均表现为下

表 4 在不同培养基中培养的大肠杆菌抽提的 RNA 的特性
Table 4 Characters of RNAs extracted from *E.coli* cultured in different media

Strain	Medium (statically incubation)	A ₂₆₀	A _{260/280}	A _{260/230}	Concentration /(μ g/ μ L)	Total weight / μ g	Result of RNA electrophoresis
<i>E.coli</i> E058	LB	6.068	1.98	2.45	2.42	145.20	qualified
<i>E.coli</i> E526	LB	5.937	1.94	2.44	2.37	142.20	qualified
<i>E.coli</i> E058	Chicken serum	9.69	2.03	2.36	3.88	116.28	qualified
<i>E.coli</i> E526	Chicken serum	12.731	2.00	2.35	5.09	152.77	qualified

表 5 LB 静置培养条件下 E526 株与 E058 株差异表达基因(16 个下调基因)
Table 5 16 genes downregulated in APEC strain E526 compared to those of APEC strain E058 in LB stationary cultures

Gene	Function	Average ratio (cy3/cy5)	T value	P<0.05	P<0.01
<i>aec-31</i>	IS1 target sit	0.4377	22.3263	T	T
<i>aec-25</i>	Praline permease II	0.4100	66.0570	T	T
<i>aec-15</i>	Unnamed protein, <i>E.coli</i>	0.3947	10.5305	T	T
<i>fyuA</i>	Yersiniabactin	0.3897	28.3011	T	T
<i>aes-4</i>	<i>finP</i> , <i>traJ</i> , <i>traY</i> , plasmid F, <i>E.coli</i>	0.2767	9.2598	T	
<i>iss</i>	Increased serum survival	0.2680	12.7092	T	T
<i>aes-6</i>	p300, iro gene cluster, <i>E.coli</i>	0.2560	21.9831	T	T
<i>iroN</i>	Siderophore receptor IroN	0.2077	7.2756	T	
<i>aes-2</i>	<i>sopA</i> , <i>sopB</i> , plasmid F, <i>E.coli</i>	0.2053	38.8229	T	T
<i>aes-31</i>	Unknown, UPEC	0.1833	46.1379	T	T
<i>iucCD</i>	Aerobactin protein IucCD	0.1443	22.8091	T	T
<i>aes-25</i>	TspE15.D11 neonatal meningitis, <i>E.coli</i>	0.1281	11.4831	T	T
<i>aes-1</i>	<i>repA6</i> , <i>repA1</i> , <i>E.coli</i>	0.1177	31.6314	T	T
<i>aes-8</i>	<i>traT</i> lipoprotein, <i>E.coli</i>	0.1117	11.3716	T	T
<i>cvaC</i>	Colicin V	0.0664	50.8782	T	T
<i>iutA</i>	Aerobactin	0.0155	21.7546	T	T

图1 E526 (cy3)/E058(cy5)芯片杂交扫描图

Fig.1 overlay fluorescence image of E526 (Green) and E058 (Red) in LB stationary cultures.

图2 E526(cy5)/E058(cy3)芯片杂交扫描图

Fig.2 Overlay fluorescence image of E058 (Green) and E526(Red) in chicken serum stationary cultures.

表6 鸡血清静置培养条件下 E526 株与 E058 株差异表达基因 (下调基因 15 个)

Table 6 15 genes downregulated in APEC strain E526 compared to those of APEC strain E058 in chicken serum stationary cultures

Gene	Function	Average ratio (cy3/cy5)*	T value	P<0.05	P<0.01
<i>aes-13</i>	Unknown, UPEC	0.4040	10.2156	T	T
<i>aes-10</i>	Colicin, plasmid Colla-IHE3113 colicin, <i>E.coli</i>	0.3645	18.8787	T	T
<i>iss</i>	Increased serum survival	0.2970	96.0475	T	T
<i>aes-6</i>	p300, iro gene cluster, <i>E.coli</i>	0.2224	20.6923	T	T
<i>iroN</i>	Siderophore receptor IroN	0.2002	19.4175	T	T
<i>aes-15</i>	Cell division protein ftsk, UPEC	0.1750	49.1722	T	T
<i>aes-4</i>	<i>finP</i> , <i>traJ</i> , <i>traY</i> , plasmid F, <i>E.coli</i>	0.1283	47.1721	T	T
<i>iucCD</i>	Aerobactin protein IucCD	0.1104	29.4130	T	T
<i>aes-31</i>	Unknown, UPEC	0.1087	31.0365	T	T
<i>aes-3</i>	Nostoc sp. PCC7120 transposase, plasmid F, <i>E.coli</i>	0.1052	8.2764	T	
<i>aes-2</i>	<i>sopA</i> , <i>sopB</i> , plasmid F, <i>E.coli</i>	0.1014	96.7352	T	T
<i>cvaC</i>	Colicin V	0.0991	38.2940	T	T
<i>aes-8</i>	<i>traT</i> lipoprotein, <i>E.coli</i>	0.0986	25.7795	T	T
<i>aes-1</i>	<i>repA6</i> , <i>repA1</i> , <i>E.coli</i>	0.0860	18.8980	T	T
<i>iutA</i>	Aerobactin	0.0082	15.2912	T	T

*Ratio=Cy5 / Cy3. Standards of differential expression of gene : Ratio> 2 indicated it was up-regulated gene in this point, Ratio< 0.5 indicated it was down-regulated gene in this point. Average ratio was average of three points ratio of the same gene.

“T0.05”indicated differential expression threshold on 95% level. If T value> T0.05, the gene of this point was differential expression on 95% level and it was labeled T in p<0.05; “T0.01”indicated differential expression threshold on 99% level. If T value> T0.01, the gene of this point was differential expression on 99% level and it was labeled T in p<0.01.

调基因, 主要包括编码铁摄取系统(*iucCD*, *iutA*, *iroN*, *fyuA*), 外膜蛋白(*iss*)以及大肠杆菌素(*cvaC*), 这 11 个差异表达的基因无疑是关注的焦点。因为选择的分离株同属于 O2 血清型的高致病株和低致病株, 而当低致病株的毒力基因相对于高致病株而言, 在血清中或 LB 培养基中表达下调时, 暗示它们与细菌的毒力可能存在某种联系, 应成为我们进一步研究的重点。

另一方面, 与 APEC E058 株相比, E526 株在鸡血清中培养时, 其 15 个下调基因中有 4 个基因(*aes-3*, *aes-10*, *aes-13*, *aes-15*)与 LB 培养基中的不同。这 4 个

下调基因更应该引起注意, 原因是与 LB 相比, 鸡血清培养无疑更接近鸡体内环境, 换句话说, 这 4 个基因与分离株对鸡的致病性关系可能更大, 有可能是本研究中筛选出的 APEC 可能的新致病基因。

另外, 芯片的杂交试验结果显示, 在 LB 培养、血清培养条件下, E526 和 E058 还有一些基因两者表达量相当并且信号很强, 说明表达量很高, 这些基因除了看家基因外, 主要是一些与铁的吸收(*ireA*, *sitA*, *feoB*), 血清抗性(*ompA*)以及一些抗生素抗性(*tetB*, *blaTEM-1*)有关。*tetB*, *blaTEM-1* 的高表达显示了这两株 APEC 对四环素和β-内酰胺类抗生素的抗性。

本文应用基因芯片筛选了禽致病性大肠杆菌在体外不同条件下的毒力基因及可能毒力基因中的差异表达基因，表明一些铁摄取系统相关基因对 APEC 的毒力较重要，同时也筛选出了一些新的可能致病基因 *aes-1*, *aes-2*, *aes-3*, *aes-4*, *aes-6*, *aes-8*, *aes-10*, *aes-13*, *aes-15*, *aes-31* 等，为进一步研究 APEC 致病机理奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Calnek BW. 禽病学. 第 10 版. 高福, 苏敬良, 译. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] Blanco JE, Blanco M, Mora A, *et al.* Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). *Vet Microbiol*, 1998, 61(3): 229–235.
- [3] Dho-Moulin M, Fairbrother JM. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res*, 1999, 30, 299–316.
- [4] Dozois CM, Fairbrother JM, Harel J, *et al.* Pap- and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun*, 1992, 60(7): 2648–2656.
- [5] Ewers C, Janssen T, Wieler LH. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2003, 116(9-10): 381–395.
- [6] 高崧, 姜焱, 刘业兵, 等. 禽病原性大肠杆菌 I 型菌毛的分离与鉴定. *微生物学报*(*Acta Microbiologica Sinica*), 1999, 39(6): 521–526.
- [7] 刘业兵, 高崧, 彭大新, 等. 禽病原性大肠杆菌 I 型菌毛单克隆抗体的研制及其对分离株的检测. *中国兽医学报*(*Chinese Journal of Veterinary Science*), 2000, 20(3): 148–151.
- [8] 高崧, 刘秀梵, 张如宽, 等. 我国部分地区禽病原性大肠杆菌的分离与鉴定. *畜牧兽医学报*(*Chinese Journal of Animal and Veterinary Sciences*), 1999, 30(2): 164–171.
- [9] 高崧, 吴长新, 文其乙, 等. 不同地区 101 个禽源性大肠杆菌分离株的致病性试验. *中国预防兽医学报*(*Chinese Journal of Preventive Veterinary Medicine*), 1999, 21(1): 13–16.
- [10] Sambrook J, Maniatis T, Frisch EF. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.
- [11] 陈祥, 赵娟, 高崧, 等. 抑制差减杂交筛选禽致病性大肠杆菌基因组差异片段及其分析. *微生物学报*(*Acta Microbiologica Sinica*), 2005, 45(5): 680–684.
- [12] 陈祥, 高崧, 王晓泉, 等. 选择性捕获禽病原性大肠杆菌体内转录序列. *微生物学报*(*Acta Microbiologica Sinica*), 2007, (3): 407–412.
- [13] Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, *et al.* Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun*, 2004, 72(11): 6373–6381.

Differential expression of virulence and potential virulence genes of avian pathogenic *Escherichia coli* in vitro with DNA microarray analysis

Haixia Huan^{1,2}, Qiong Zhou¹, Lixiang Zhao¹, Song Gao^{1*}, Xiufan Liu¹

¹*Animal Infectious Disease Laboratory, Ministry of Agriculture, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China*

²*Biology Department, Huaiyin Pedagogic College, Huai'an 223001, China*

Abstract: We constructed avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) specific DNA microarray to analyze the transcriptomes of APEC highly pathogenic strain E058 and low pathogenic strain E526 (both belonging to O2 serotype). For cultures in Luria-Bertani (LB) broth medium, 16 distinctly expressed genes were observed in strain E526, and all of them were down-regulated. For cultures in the serum of chickens, 15 distinctly expressed genes were screened in strain E526, and all of them were also down-regulated. The results suggest that DNA microarray could be used to screen distinctly expressed genes among virulence- and potential virulence-associated genes of APEC. The expression of 11 common virulence- or potential virulence-associated genes were down-regulated for strain E526 compared to those of strain E058 cultured both in LB broth and chicken serum. Meanwhile, 4 potential virulence-associated genes, *aes-3*, *aes-10*, *aes-13* and *aes-15* were down-regulated for strain E526 but not for strain E058, when they grew in the chicken serum. Besides known virulence factors, we observed 10 new potential virulence-related genes including *aes-1*, *aes-2*, *aes-3*, *aes-4*, *aes-6*, *aes-8*, *aes-10*, *aes-13*, *aes-15* and *aes-31*.

Keywords: DNA microarray; APEC; differential expression of gene; culture *in vitro*

Supported by the National Programs for High Technology Research and Development of China(2003AA222141) and the National Natural Science Foundation of China (30471281, 30771604)

*Corresponding author. Tel: +86-514-87991448; Fax: +86-514-87972218; E-mail: gsong@yzu.edu.cn

Received: 19 April 2007/Revised: 26 October 2007