

幽门螺杆菌基因组表达谱芯片的研制*

韩跃华¹ 刘文忠^{2**} 史耀舟³ 赵国屏³ 萧树东² 张庆华³

(浙江大学医学院附属第二医院消化科 杭州 310009)¹

(上海市消化疾病研究所上海交通大学医学院附属仁济医院 上海 200001)²

(生物芯片上海国家工程研究中心 上海 201203)³

摘要: 以 *H. pylori* 26695 和 J99 作为模板, 采用多聚酶链反应 (PCR) 扩增得到所需要的开放阅读框 (open reading frame, ORF) 片段。使用 Genemachine 点样仪进行点样, 采用随机九聚体、Cy3-dCTP 或 Cy5-dCTP 和 Superscript II 标记 *H. pylori* RNA 标本, 完成芯片杂交过程。数据判断标准是标化后 Cy3/Cy5 比值 (ratio) ≤ 0.5 为基因表达上调, 若 ratio 值 ≥ 2.0 则为表达下调。采用芯片重复性、信噪比评估芯片质量, 应用 RT-PCR 反应验证芯片结果。研制的 *H. pylori* 基因组 DNA 芯片共包括 1636 个 ORF, 其中 *H. pylori* 26695 为 1549 个, J99 为 87 个。表达谱数据分析显示大多数阵列具有显著高于背景的杂交信号, 信噪比 (S/N) ≥ 2 的基因点数约占总基因数的 87.76%。芯片内点间重复率约为 94.05%。通过 RT-PCR 反应显示, 在所选择的 20 个基因中, 大部分基因的 RT-PCR 结果与芯片检测结果一致。

关键词: 幽门螺杆菌, 基因组, 表达谱芯片

中图分类号: R117 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0006-04

Development of Helicobacter Pylori Genomic Expression Microarray*

HAN Yue-Hua¹ LIU Wen-Zhong^{2**} SHI Yao-Zhou³ ZHAO Guo-Ping³ XIAO Shu-Dong² ZHANG Qing-Hua³

(2nd Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009)¹

(Shanghai Institute of Digestive Disease, Renji Hospital, SSMU, Shanghai 200001)²

(Shanghai Engineering Research Center for Biotech, Shanghai 201203)³

Abstract: The open reading frame (ORF) fragments on our microarray were generated by polymerase chain reaction (PCR) using gene-specific primers. Genomic DNA of *H. pylori* 26695 and J99 were used as templates. DNA fragments on the array were printed by Genemachine printer. Using random nanomer, Cy3-dCTP/Cy5-dCTP and Superscript II to label *H. pylori* RNA and complete hybridization. Results were judged on the basis of normalized Cy3/Cy5 ratio value, that is, genes with ratio less than or equal to 0.5 were considered down-regulated, those with ratio greater than or equal to 2.0 were up-regulated. The quality of microarray was evaluated by means of reproducibility and signal/noise ratio. Microarray results were tested by RT-PCR. The final microarray included 1636 ORFs of both strains. Repetitive rate between different dots within the same microarray was 94.05%. Most array had significantly higher signal than background, with 87.76% spots had signal/noise greater than or equal to 2. Most genes from 20 genes selected for testing microarray results were verified by RT-PCR.

Key words: *Helicobacter pylori*, Genome, Expression microarray

幽门螺杆菌 (*H. pylori*) 是一种对生长条件要求苛刻的病原微生物, 在定植、繁殖、致病及传播过程中将经历显著的环境改变刺激, 环境选择压力的作用使其形成了对不同生长条件的适应性反应。在全基因组范围内探讨 *H. pylori* 的致病机制

和基因表达情况引起广大研究者的关注。我们在国内首次通过制备 *H. pylori* 基因组芯片, 建立表达谱芯片的研制过程, 以期有助于探讨不同刺激条件下 *H. pylori* 的基因表达情况, 为进行 *H. pylori* 致病机制和临床防治的研究提供一有利工具。

*上海市重点学科建设基金资助项目 (No. Y0205)

** 通讯作者 Tel: 021-63200874, E-mail: liuwzmd@126.com

收稿日期: 2006-01-06, 修回日期: 2006-05-25

1 材料与方法

1.1 *H. pylori* 菌株

标准菌株 *H. pylori* 26695 和 J99 由 David 教授 (Baylor College of Medicine, Texas Medical Center, Houston, Texas) 惠赠。*H. pylori* 临床菌株 (*Hp1* 和 *Hp2*) 分离自在我院接受胃镜检查的患者。

1.2 *H. pylori* 培养及鉴定

固体培养: 将 *H. pylori* 菌株接种于选择性 Columbia 琼脂培养基, 其中含有 7% 马血, 在 37℃ 微氧条件下 (N_2 85%, CO_2 10%, O_2 5%) 培养, 48h 时收集菌体。经菌落形态、涂片染色以及生化反应 (尿素酶、氧化酶和触酶) 鉴定细菌。

液体培养: 液体培养基为脑心浸液 (BHI) 肉汤, 含有 7% 马血清。方法是将固体培养基上生长状态良好的 *H. pylori* 菌株接种于培养液中, 在 37℃ 微氧条件下振荡培养。鉴定方法同上。

1.3 芯片制备

1.3.1 引物设计: 芯片上所包括的 DNA 片段对应于 *H. pylori* 基因组的每个开放阅读框架 (open reading frame, ORF) 的特异区域 (即非同源区和非重叠区), 包括 1,590 个 *H. pylori* 26695 ORF 和 91 个 J99 特异性 ORF, 若 60% 以上基因长度的同源性大于 85%, 我们即认为是同源区域。利用基因特异性引物多聚酶链反应 (PCR) 扩增得到这些片段。另外, 在模板制备过程中, 为了使杂交信号比较均一, 我们将 PCR 产物控制在 1.5kb 以内, 长度大于 1.5kb 的 ORF 用 2~3 对引物分段进行扩增。采用 Primer Premier 5 进行 PCR 引物设计, 参考基因序列来自 <http://www.tigr.org>。

1.3.2 PCR 反应: 以 *H. pylori* 26695 和 J99 为扩增模板, 采用 Qiagen tissue DNA extraction kit 试剂盒提取 *H. pylori* 基因组 DNA, 并保存于 -70℃ 备用。PCR 反应体系为 100μL, 包括 10 × buffer 10.0μL, $MgCl_2$ 2.0mmol/L, dNTP 200μmol/L, 引物 10pmol, Taq DNA 聚合酶 0.3U, 模板 DNA 20ng。反应条件为 94℃ 预变性 5min, 94℃ 30s、50℃ 45s、72℃ 1min30s, 共 40 个循环, 终以 72℃ 延长 5min。通过 1% 琼脂糖电泳鉴定 PCR 反应是否成功, 反应成功的标志是产物条带特异、单一、大小正确, 条带亮度适中。首次未扩增出的基因重新设计引物进行扩增。

1.3.3 PCR 产物的纯化和定量: 采用 Millipore Multiscreen PCR 板纯化 PCR 产物, 小片段 PCR 产物 ($\leq 300bp$) 采用异丙醇沉淀法进行纯化。纯化后的产物以 ddH_2O 稀释成终浓度 600ng/μL, 再加以等体积的 DMSO。

1.3.4 点样及点样后处理: 将样品在湿度为 50%~60% 环境中采用 Genemachine 点样仪 (USA) 进行点样。每个基因片段重复点 4 次。点样完后在 400mJ 能量下采用 CL-1000 Ultraviolet Crosslinker 交联仪进行交联, 然后将芯片于室温下放置过夜。并对部分玻片进行抽检, 用扫描仪观察芯片上各个点的形状和强度。那些只显示出针尖, 而没有具体样品扩散所形成的圆点以及那些未点出的点定义为不合格点。若不合格点占所有点 1% 以下则为合格的玻片。

1.4 *H. pylori* RNA 抽提

分别离心收集 10mL 液体培养达 72h *Hp1* 和 *Hp2* 菌液, 弃去上清, 加入 2mL 或 3mL Trizol, 重悬沉淀, 室温放置 5min。其余步骤按 Trizol 抽提 RNA 方法的说明操作。

1.5 *H. pylori* RNA 纯化和基因组 DNA 污染去除

采用 RNAeasy Mini Kit 纯化和柱上 DNase 处理 RNA 标本, 具体操作按说明。使用分光光度计测定 OD_{260} 和 OD_{280} 读数, 并采用 1% 琼脂糖 RNA 电泳系统观察电泳条带。若 $OD_{260}/OD_{280} = 1.9 \sim 2.1$, 电泳显示有清晰的 23S rRNA 和 16S rRNA 条带, 且 23S rRNA 条带亮度是 16S rRNA 的 1.5~2.0 倍, 则认为标本合格, 标本保存于 -70℃ 备用。

1.6 cDNA 探针的制备

分别用 Cy3-dCTP 和 Cy5-dCTP 标记 *Hp1* RNA 和 *Hp2* RNA 标本。取 10μg RNA 和 5μg 随机九聚体, 用 RNase-free H_2O 补足体系到 15μL, 70℃ 下作用 10min, 然后冰上放置 2min。再加入 5μL first-strand buffer、3μL 0.1mol/L DTT、1μL dNTP mix、1.5μL Cy3-dCTP 或 Cy5-dCTP、1μL RNase 抑制剂和 2μL Superscript II, 42℃ 保温 120min。然后 70℃ 10min, 加入 2.5μL 2.5mol/L NaOH, 37℃ 孵育 15min 以终止反应, 再加入 10μL HEPES。

1.7 荧光探针的纯化和杂交过程

未吸收的荧光染料采用 QIAquick Nucleotide Removal Kit 去除, 具体操作按说明。然后各取出等 pmol Cy3 和 Cy5 标记的探针进行杂交。采用

11 μg 鲑精 DNA 去除非特异性反应, 然后加入 10 μL 4 \times Buffer 和 20 μL 甲酰胺, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 杂交箱中避光杂交 16h, 洗片后读取数据。

1.8 数据分析

使用 Agilent 扫描仪扫描芯片, 应用 Image 5.1 软件处理数据。将每张芯片上低信号点 (信噪比小于 2) 去除后, 应用 Genespring 6.1 进行数据标准化处理和聚类分析。将每个基因片段的可用于数据分析的重复点的平均值作为其最终分析的数据。计算得出每个点标准化后的 Cy3/Cy5 (R/G) ratio 值。数据分析的判断标准为 $\text{R/G} \leq 0.5$ 者为表达下调, $\text{R/G} \geq 2$ 者为表达上调。

1.9 RT-PCR 反应

选取 20 个基因, 通过 RT-PCR 反应验证芯片结果。引物设计采用 Primer Premier 5.0。PCR 反应体系为 25 μL , 包括 dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$, MgCl_2 2.0 mmol/L , 引物 5 μmol , Taq DNA 聚合酶 0.3 U, cDNA 模板 10 ng。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min 30 s, 共 30 个循环, 终以 72 $^{\circ}\text{C}$ 延长 5 min。每次试验重复 1 次, 以 16S

rRNA 作为内参照。

2 结果

2.1 RNA 标本的质量检测

电泳显示有清晰的 23S rRNA 和 16S rRNA 条带, 23S rRNA 条带亮度是 16S rRNA 的 1.5 ~ 2.0 倍 (见图 1), $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280} = 1.9 \sim 2.1$, 表明 *H. pylori* RNA 标本是合格的。

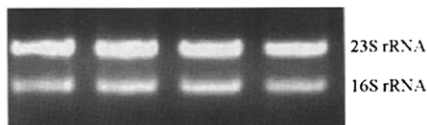


图 1 *H. pylori* RNA 电泳图

2.2 芯片数据可靠性的检测

我们所制备的芯片上每个基因片段重复点四次, 分析显示芯片内点间重复率约为 94.05% (1786/1899), 即点间重复性较高, 表明芯片质量较高。大多数阵列具有显著高于背景的杂交信号 (见图 2), 信噪比 (S/N) ≥ 2 的基因点数占总基因数的比例约为 87.76%。



图 2 *H. pylori* 表达谱芯片杂交扫描图

2.3 RT-PCR 反应结果

所选择的 20 个基因中, 有 14 个基因的 RT-

PCR 结果与芯片检测结果一致 (见图 3)。说明我们的表达谱芯片数据具有较高的可靠性。

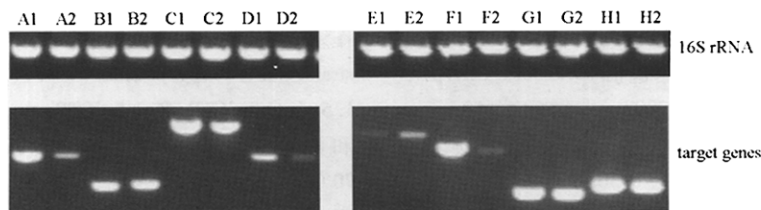


图 3 基因的 RT-PCR 结果

A ~ H 分别表示与芯片结果相一致的部分基因 RT-PCR 结果, 1 和 2 表示菌株 *Hp1* 和 *Hp2*, 与 *Hp1* 相比 *Hp2* 的 A, C, D 和 F 基因的表达减弱, 而 E 基因表达增强, 其余基因的表达未改变

3 讨论

完整基因组序列的获得和高通量技术的到来使得在全基因组范围内进行病原微生物基因表达的研究成为可能。基因芯片可以同时检测成千上万个基因的表达情况。目前,其已被证实是有价值的剖析细菌对各种环境刺激反应机制的研究工具,可以揭示细菌对新环境的适应机制以及适应性反应的调节网络和介导适应性反应的信号转导系统,阐明影响新表型的代谢和生物合成通路,明确细菌在发育和进化过程中的一系列代谢和生理学特征^[1-5],揭示在其致病机制中起关键作用的基因群^[6,7]。

原核生物 RNA 极易降解,导致难以进行 RNA 的成功抽提。通过严格控制实验条件,我们成功完成了 *H. pylori* 菌株 RNA 抽提。在表达谱芯片的研制过程中应避免因标本获得技术所带来的干扰,因为高质量的芯片数据取决于芯片质量和适当的微生物生理学技术^[8]。另外,我们的试验结果表明所研制的 *H. pylori* 基因组表达谱芯片具有较高的点间重复性、可靠性和信噪比,可以用于在全基因组范围内 *H. pylori* 基因转录过程的研究。在微生物表达谱芯片研制中,由于 rRNA 占总 RNA 的 95%,干扰了表达谱芯片基因信号的检出率。我们的芯片杂交结果显示,大多数阵列具有显著高于背景的杂交信号,信噪比 (S/N) ≥ 2 的基因点数约占总基因数的 87.76%,故解决了这一难点。

细菌基因转录过程是基因组范围内细菌对环境改变的即刻、进行性和动态反应过程,芯片技术可以在全基因组范围内揭示细菌的转录情况。由于微生物对环境改变的敏感性、转录反应的快速性、细菌半衰期的短暂性,使得芯片技术在细菌生理学和病理学研究方面具有较高的应用价值。另一方面,芯片技术可以加速我们对病原微生物

和宿主之间相互作用的理解决^[9],可以揭示二者之间相互作用,有助于相关疾病的诊治、预防以及疫苗研制^[10,11]。*H. pylori* 在其繁殖和致病过程中形成了对环境变化的适应机制。目前,*H. pylori* 的传播途径尚未完全明了,推测的途径有口-口途径、胃-口途径和粪-口途径以及经医疗器械传播。大量研究表明在自然环境中存在 *H. pylori*,排出体外的 *H. pylori* 在周围环境中能够生存是其传播的必要条件。应用 *H. pylori* 表达谱芯片可以研究不同刺激条件对其基因表达谱的影响,探讨在不同生长条件下 *H. pylori* 生长代谢和毒力相关基因的表达改变情况,从而有助于揭示与其生长代谢和致病机制密切相关的基因型,有助于指导临床相关疾病的诊治。

参考文献

- [1] Hinchliffe S J, Isherwood K E, Stabler R A, et al. *Genome Res*, 2003, 13 (9): 2018 ~ 2029.
- [2] Stintzi A, Marlow D, Palyada K, et al. *Infect Immun*, 2005, 73 (3): 1797 ~ 1810.
- [3] Nicholson T L, Olinger L, Chong K, et al. *J Bacteriol*, 2003, 185 (10): 3179 ~ 3189.
- [4] Hottes A K, Meewan M, Yang D, et al. *J Bacteriol*, 2004, 186 (5): 1448 ~ 1461.
- [5] Goodman A L, Lory S. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7 (1): 39 ~ 44.
- [6] Andersen M T, Brondsted L, Pearson B M, et al. *Microbiology*, 2005, 151: 905 ~ 915.
- [7] Gov Y, Kiran M D. *Infect Immun*, 2005, 73 (10): 6220 ~ 6228.
- [8] Conway T, Schoolnik G K. *Molecular Microbiology*, 2003, 47 (4): 879 ~ 889.
- [9] Bryant P A, Venter D, Robins-Browne R, et al. *Lancet Infect Dis*, 2004, 4 (2): 100 ~ 111.
- [10] Schoolnik G K. *Adv Microb Physiol*, 2002, 46: 1 ~ 45.
- [11] Brooks C S, Hefty P S, Jolliffe S E, et al. *Infect Immun*, 2003, 71 (6): 3371 ~ 3383.