

# 差显技术分析结核杆菌 H37Rv 与 H37Ra 差异表达的基因\*

熊志红 庄玉辉\*\* 李国利

(解放军总医院第 309 分部结核病研究室 北京 100091)

**摘要:** 采用差异显示技术比较了结核分支杆菌强毒株 H37Rv 和弱毒株 H37Ra 在体外培养条件下的基因表达差异。通过 20 种引物组合进行 mRNA 差异显示, 克隆到了两菌株间的 20 余个差异表达基因, 经序列分析及杂交鉴定发现其中 2 个基因仅在 H37Rv 中表达。其中 Rv1894c 基因编码的可能是 H37Rv 中的一个新蛋白。而在 H37Ra 的基因组中含有这 2 个基因的编码序列, 但均未检测到基因的表达。

**关键词:** 结核分支杆菌, 差异显示, 差异表达基因

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 03-0057-05

## Identification of Differential Genomic Genes between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and H37Ra Using DD-PCR\*

XIONG Zhi-Hong ZHUANG Yu-Hui\*\* LI Guo-Li

(Tuberculosis Research Laboratory, The 309th Hospital of PLA, Beijing 100091)

**Abstract:** Differential display-PCR was used to clone the differential expressed genes between *Mycobacterium tuberculosis* virulence strain H37Rv and its avirulent mutant H37Ra. All of different genes were cloned, sequenced and some were analyzed by Northern-blotting. Two cDNAs that appeared to be expressed in H37Rv, but not in H37Ra, were cloned and sequenced. Rv0170, and Rv1894c, code for proteins with unknown functions. The two gene were present in H37Ra, but not expressed. These results show that mRNA DD methodology can represent a potential tool for investigation of *M. tuberculosis* gene expression.

**Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Differential Display-PCR, Differential expressed genes

结核病是长期危害全球健康的主要传染病之一, 近年来在世界范围内又“死灰复燃”, 已成为传染病中主要死亡原因。人型结核分支杆菌 H37Rv 是结核病的主要病原菌, 但至今人们对其致病分子机理仍然了解甚少。仅为数不多报道了几个蛋白与结核菌的致病性相关, 如 *mce*、*erp* 等<sup>[1,2]</sup>。随着分子生物学的发展, 结核分支杆菌 H37Rv 全基因序列的测定已完成, 结核杆菌相关基因的功能及致病机理的研究展示了广阔的前景。mRNA 差异显示技术是寻找新基因的一种途径, 因其简单、灵敏、快速的特点而被广泛应用<sup>[3]</sup>。本实验采用改良 mRNA 差异显示技术<sup>[4]</sup> 比较了强毒株 H37Rv 与弱毒株 H37Ra 在体外培养条件下的基因表达差异, 寻找新的结核菌致病相关基因, 以期对结核菌致病机理研究和临床分子诊断的开发提供重要的信息。

\*国家重点基础研究发展规划项目 (No. G1999054104)

\*\*通讯作者 Tel: (010) 66775966, E-mail: udbi@sohu.com.

收稿日期: 2004-11-07, 修回日期: 2005-01-26

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株及培养

结核分支杆菌强毒株 H37Rv (菌株号 ATCC27294) 和弱毒株 H37Ra (菌株号 ATCC35835), 均由中国生物制品鉴定所菌苗室提供, 经改良罗氏固体培养基活化后, 接种于苏通液体培养基中。于 37℃ 培养箱中静置培养 15 ~ 20d, 收集菌体。

### 1.2 结核分支杆菌总 RNA 的提取

将新鲜的结核分支杆菌培养物稍加研磨, 用 5mg/mL 的溶菌酶液 37℃ 处理 2h, 后收集菌体, 加入 Trizol (GIBCO 公司) 液混匀, 按提取试剂盒中的使用说明进行细菌总 RNA 的提取。

### 1.3 RNA 差异显示

**1.3.1 引物:** 随机引物 (AP) 为 Beckman Coulter 公司 Genomymx LRS 系统 PCR 扩增反应试剂盒中所配的荧光标记随机引物; 锚定引物 (ARP) 是由中国科学院微生物研究所合成, 共 5 条: ① 5' -CCCAAGCTCCAG-3'; ② 5' -GGCGTCATCGAC-3'; ③ 5' -GC-CATCCTCGAC-3'; ④ 5' -GGCAAGGCACAG-3'; ⑤ 5' -GCGGTCATCCCTG-3'。

**1.3.2 逆转录反应 (RT-PCR):** 1μg 总 RNA 于 70℃ 作用 5min 后置冰上, 加入 0.5 mmol/L dNTP, 25 pmol dT<sub>15</sub>, 200μmol/L MLV 逆转录酶。37℃ 作用 1h, 95℃ 处理 5min 终止反应

**1.3.3 PCR 扩增反应:** 20 μL 中含 0.5μL RT 产物, 1.5mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.1mmol/L dNTP, 5μmol/L 锚定引物, 1.5μmol/L 随机引物, 0.2U Taq 酶。94℃ 5min 后进入 94℃, 1min; 42℃, 1min; 72℃, 1min, 4 个循环, 再进入 94℃, 1min; 50℃, 1min; 72℃, 1min, 33 个循环, 最后 72℃ 延伸 5min。

**1.3.4 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳:** 按 BeckmanCoulter Genomymx LRS 系统说明及操作步骤, PCR 产物上样 5.6% 聚丙烯酰胺凝胶, 进行高压电泳。Genomymx CS 仪进行胶的荧光扫描分析。

### 1.4 差异条带的 II 次 PCR 扩增

分别切下各差异条带的胶条, 加入 TE 溶液, 37℃ 作用 3h。取 4μL 为模板, 加入 0.15 mmol/L dNTP, 5μmol/L 锚定引物及 1μmol/L 通用引物, 0.3U Taq 酶。PCR 反应条件为 94℃ 变性 2min 后进行 94℃, 30s; 42℃, 30s; 72℃, 90s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10min。

### 1.5 II 次 PCR 扩增产物的纯化及克隆

上述 II 次 PCR 产物经纯化回收, 连接到 pGEM-T easy 载体 (Promega) 上, 并转化大肠杆菌感受态细胞 DH5α, 经氨苄抗性及蓝白斑筛选培养, 选取白色单菌落进行培养及其质粒的提取。酶切方法鉴定重组子。具体的操作参见分子克隆实验手册第三版<sup>[5]</sup>。

### 1.6 PCR 产物的序列分析及同源性分析

含有 PCR 产物插入的重组子用 T7 通用引物进行序列分析并经 internet 网用 NCBI 提供的 BLASTN 进行同源性比较分析。

### 1.7 Northern 杂交验证

以上述 T 载体的克隆为模板, Klenow 酶作用下用地高辛标记的 T7 通用引物进行探针标记。分别取 H37Rv、H37Ra 的总 RNA 20μg, 经甲醛变性琼脂糖胶电泳后, 转印于

尼龙膜上,与标记好的探针在  $2 \times \text{SSC}/50\%$  甲酰胺的缓冲液中,  $42^\circ\text{C}$  杂交过夜。杂交后将膜在  $2 \times \text{SSC}/0.1\%$  SDS 中  $42^\circ\text{C}$  漂洗 2 次,  $0.2 \times \text{SSC}/0.1\%$  SDS 中  $62^\circ\text{C}$  洗膜 1 次,再用地高辛检测试剂盒 (Roche 公司) 进行二次杂交及检测。

### 1.8 差异基因的 PCR 验证及 RT-PCR 验证

根据 H37Rv 中 Rv0170、Rv1894c 全长序列设计引物,以 H37Rv、H37Ra 基因组 DNA 为模板,使用 TaKaRa 公司的 LA-Taq 酶进行 PCR 扩增验证;以 H37Rv、H37Ra 基因组总 RNA 为模板,使用 Clontech 公司的 M-MLV 逆转录酶进行 RT-PCR 扩增验证。

## 2 结果

### 2.1 结核分支杆菌总 RNA 的提取及质量分析结果

从 H37Rv、H37Ra 中提取的总 RNA,测得  $OD_{260}/OD_{280}$  比值均在  $1.8 \sim 2.0$  之间,表明 RNA 的纯度较高,并推算浓度在  $100 \sim 200\text{ng}/\mu\text{L}$  之间。另取少量在琼脂糖凝胶中电泳检测 RNA 的完整性,见图 1, 16S 和 23S rRNA 条带清晰明亮,无弥散拖尾现象,表明 RNA 的完整性良好,同时也未有 DNA 的污染。

### 2.2 mRNA 差异显示结果

采用 20 种引物组合进行 mRNA 的差异显示。从图 2 上观察到 38 个差异条带,通过 II 次 PCR 最终获得了 24 个克隆。该改良的 mRNA 差异显示技术的结果同时也表明,在结核分支杆菌中的转录系统中同样具有对 mRNA 进行的 poly-A 加尾机制。



图 1 提取 RNA 的结果

1 H37Rv, 2 H37Ra

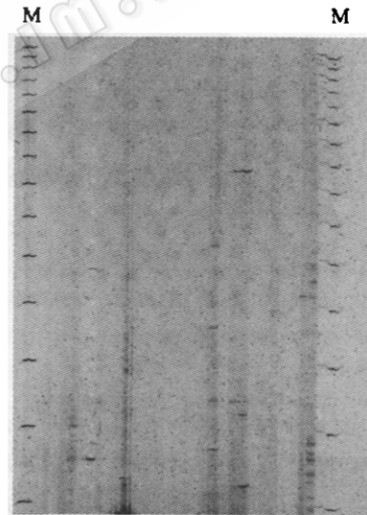


图 2 H37Rv 与 H37Ra mRNA 差异显示电泳图

M DNA Marker, 中间泳道为 H37Rv 与 H37Ra 每组 DD-PCR 的结果

### 2.3 差异片段的序列分析及同源性检索结果

对所得的克隆经序列分析后检索 GenBank 数据库,进行同源性分析。仅得到 H37Rv 株中特异表达基因 Rv0170 及 Rv1894c。在 H37Ra 中特异表达的基因,经比对有 2 条与人类的基因高度同源,其余无明显同源性。需要特别指出的是:在 GenBank 记载的 H37Rv 全序列中 Rv1894c 基因编码的是一可能蛋白,我们根据序列分析结果和 mRNA 3'端 poly-A 修饰的特性推断该基因的转录翻译链与 GenBank 中的推断相反。这一结果并不排斥在原核生物基因组中正、反链均能编码蛋白的特性,可能表明我们发现了

在结核分支杆菌 H37Rv 中的一个新蛋白。

## 2.4 Northern 杂交验证结果

以 Rv1894c、Rv0170 基因为模板分别制作地高辛标记的探针, 与 H37Rv RNA 均有杂交带而与 H37Ra RNA 未有明显的杂交带 (图 3)。表明这 2 个基因在 H37Ra 中不表达。

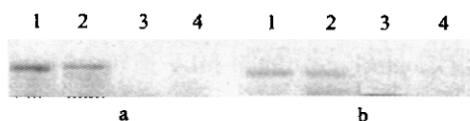


图 3 Rv1894c、Rv0170 Northern 杂交结果

a Rv1894c 探针, b Rv0170 探针, 1、2 H37Rv RNA, 3、4 H37Ra RNA

## 2.5 PCR 及 RT-PCR 鉴定 RV1894c、RV0170 基因

PCR 鉴定结果表明在 H37Ra 基因组 DNA 中均能扩增出 1.1kb、1.0kb 的片段, 与 H37Rv 中的情况相同, 2 个片段经序列分析分别与 Rv1894c、Rv0170 的基因序列一致。结果见图 4。同时 RT-PCR 结果表明在 H37Ra 总 RNA 中未能扩增出条带, 而 H37Rv 总 RNA 中能扩增出 1.1kb、1.0kb 的片段。进一步说明了 Rv1894c、Rv0170 在 H37Ra 中存在但不表达。

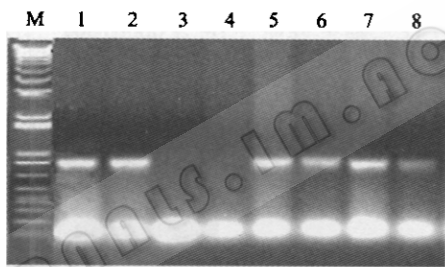


图 4 PCR 及 RT-PCR 鉴定结果

M GIBCO 1kb plus ladder, 1、2 H37Ra 中 Rv1894c、Rv0170 的 PCR, 3、4 H37Ra 中 Rv1894c、Rv0170 的 RT-PCR, 5、6 H37Rv 中 Rv1894c、Rv0170 的 PCR, 7、8 H37Rv Rv1894c、Rv0170 的 RT-PCR

## 3 讨论

研究结核分支杆菌 H37Rv 的毒力基因有助于了解结核病发生的分子机理, 对结核病的临床诊断与治疗以及新药的研究提供更明确的研究方向。人型结核分支杆菌毒株 H37Rv 是引起结核病的主要病原, 其基因突变株 H37Ra 丧失了致病力而称为弱毒株, 这两个菌株成为研究结核杆菌毒力基因的良好材料。结核杆菌的毒力基因确定的仅有 *mce*<sup>[1]</sup> 和 *erp*<sup>[2]</sup> 蛋白, 其他的如 TlyA、索状因子等至今还很不明确<sup>[6]</sup>。因此结核杆菌的毒力基因的寻找与鉴定成为一大研究热点。1993 年 Kinger 等<sup>[7]</sup>通过对 H37Rv 和 H37Ra 间的 cDNA 消减杂交获得了一些消减片段的克隆, 但未得到明确的差异基因。1999 年 Rindi 等<sup>[8]</sup>运用 mRNA 差异显示技术分析 H37Rv 和 H37Ra 间的差异表达基因, 获得了 H37Rv 中的 6 个差异基因。我们运用改良的差异显示技术从分子水平上初步探讨了 H37Rv 和 H37Ra 在体外培养条件下的差异表达基因。

我们在 H37Rv 中分离到的差异表达基因经序列分析和 blast 分析表明有两条, 为 GenBank 中登录的 Rv1894c、Rv0170, 编码的都是可能蛋白。根据 mRNA3 端 poly-A 修

饰的特性推断 31 和 32 克隆 (与 Rv1894c 高度同源) 所在基因的转录翻译链与 GenBank 中的推断相反。这一结果并不排斥在原核生物基因组中正、反链均能编码蛋白的特性, 很可能表明我们发现了在结核分支杆菌 H37Rv 中的一个新蛋白。还有一有趣的发现是在 H37Ra 基因组中存在与人类基因组高度同源的基因片段, 这与我们同时进行的用消减抑制杂交方法研究 H37Rv 与 H37Ra 间基因表达差异的结果相似 (文章未发表)。可能从另一方面证明了结核杆菌的变异性高, 其转座子能携带外源基因插入导致基因组变异, 从而更能适应环境的变化。有研究证实在一些结核杆菌临床分离株中发现了人类的同源基因<sup>[9]</sup>。

通过 PCR、RT-PCR 检测及 Northern 杂交实验, 表明在 H37Ra 基因组中均存在 Rv1894c、Rv0170 基因, 但在体外培养中却没有检测到表达。这些基因是如何在弱毒株中被抑制表达、该蛋白的功能如何及其是否在结核杆菌的致病过程中起作用还需更深入的研究。

### 参 考 文 献

- [1] Cole S T, Brosch R, Parkhill J, *et al.* Nature, 1998, **393**: 537 ~ 544.
- [2] Berthet F X, Lagranderie M, Gounon P, *et al.* Science, 1998, **282**: 759 ~ 762.
- [3] liang P, Pardee A B. Science, 1992, **257**: 967 ~ 971.
- [4] Miele G, MacRae L, McBride D, *et al.* Biotechniques, 1998, **25** (1): 138 ~ 144.
- [5] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning. Cold Harbor Labrstory Press, 1989. 69 ~ 144.
- [6] Smith I. Clin Microbiol Rev, 2003, **16** (3): 463 ~ 496.
- [7] King A K, Tyagi J S. Gene, 1993, **131**: 113 ~ 117.
- [8] Rindi L, Lari N, Garazelli C. Biochem Biophys Res Commun. 1999, **258** (1): 94 ~ 101.
- [9] Kinsella R J, McInerney J O. Trends Genet, 2003, **19** (12): 687 ~ 689.