

铜绿假单胞杆菌 QS 相关基因差异表达的研究*

童一民 潘欣** 荣光华 戚中田**

(第二军医大学微生物学教研室, 全军微生物学重点实验室 上海 200433)

摘要: 选取 100 个与铜绿假单胞杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 群感效应 (quorum-sensing, QS) 相关的基因, 克隆这些基因片段于 pMD-18T 载体, 测序鉴定, 点样制备 cDNA 基因芯片。制备 cy3-dCTP /cy5-dCTP 标记的探针, 与芯片杂交。初步研究了处于不同生长期的铜绿假单胞杆菌基因的表达差异。指数中期和平台初期相比, 有 9 个 QS 基因表达量显著增加, 有 6 个基因表达量显著下降。利用芯片做针对铜绿假单胞杆菌药物的筛选: 妥布霉素 (Tobramycin) 给药后细菌基因发生差异表达。证明了该 cDNA 芯片用于药物筛选的可行性。在国内首次研制开发了 QS 相关基因的 cDNA 芯片。应用基因芯片技术建立的铜绿假单胞杆菌 QS 相关基因研究平台, 为找到能较好抑制铜绿假单胞杆菌正常生长的药物研究提出新的解决方法。

关键词: 铜绿假单胞杆菌, 群感效应, 基因, cDNA 芯片, 差异表达

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2564 (2006), 06-0027-07

Expression Diversity of Quorum-sensing-Related Genes in *Pseudomonas aeruginosa**

TONG Yi-Min PAN Xin** RONG Guang-Hua QI Zhong-Tian**

(Department of Microbiology, Key Laboratory for Medical Microbiology, Second Military Medical University, Shanghai 200433)

Abstract: One hundred *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-related genes were selected and their primers were synthesized. The fragments of specific sequences which are related QS genes were amplified by PCR. These verified sequences were inserted into the vector pMD-18T for sequencing. These DNA fragments were dotted onto glass slides to make cDNA microarray. Hybridization was performed with cy3/cy5-dCTP labeled probes. The scanning data of early stationary phase and mid-logarithmic phase indicated that 9 genes were up-regulated and 6 genes were down-regulated. Undergoing the different medicines, we took tobramycin as an example to compare the expression diversity. The results confirm that the QS cDNA chip is useful, and may contribute to better understand the mechanism of quorum-sensing, and can help us find the new targets for restraining the growth of *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, Quorum-sensing, Gene, cDNA chip, Expression diversity

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 又称绿脓杆菌^[1], 是自然界中侵袭宿主范围最广的细菌之一, 具有制作微生物气溶胶进行军事用途的潜在危险; 铜绿假单胞菌也是最重要的造成院内感染的病原体。PAO1 是铜绿假单胞菌的标准菌株。最近的研究表明, 铜绿假单胞菌细胞外毒力因子的产生并非单个细胞所为, 而是达到一定密度的细胞群体所为。这种以细胞密度依赖方式协调表达特异性基因的现象称为群感效应 (Quorum-sensing, QS)^[2]。QS 与细胞毒力基因和形成生物膜相关的基因的表达有着密切的联系, 其高表达导致细菌的致病性和耐药性大幅度提高^[3]。

* 全军医学科研十五计划项目 (No. 01MA144)

军队“十一五”医药卫生专项课题 (No. 06Z026)

** 通讯作者 Tel: 021-25070312, E-mail: panxinpx@yahoo.com, qizt@smmu.edu.cn

收稿日期: 2006-01-16, 修回日期: 2006-02-07

基因芯片是指通过微加工技术将大量的 DNA 有序地固定在载体表面, 形成储存有大量信息的 DNA 阵列。该阵列与标记的核酸杂交后, 能快速获取大量信息。基于它的高通量微型化和平行分析的特点, 基因芯片目前得到广泛应用, 其中 cDNA 芯片技术由于其经济性和高特异性, 在实验研究中得到广泛的应用^[4]。

本文利用已知铜绿假单胞菌的标准菌株 PAO1 基因组遗传图谱, 5,570 个预测的开放阅读框架中的部分和 QS 相关的基因^[5], 设计特异引物, PCR 扩增, 制备克隆, 测序正确后点样制备 cDNA 基因芯片。研究 PAO1 不同生长时期的基因表达的变化。利用基因芯片进行针对 PAO1 药物的筛选的研究。并加入妥布霉素检验芯片^[6]。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌株: 铜绿假单胞菌标准株 PAO1, 由第二军医大学微生物学教研室保存。

1.1.2 引物来源: QS 相关的 100 对基因的特异引物, 6 聚体随机引物均由 Sangon 公司合成。

1.2 主要试剂及设备

Cy5-dCTP 和 Cy3-dCTP, TRIzol, 逆转录酶 SuperScript III 均购买于 Invitrogen 公司。dCTP, dATP dGTP dGTP 购买 Sangon 公司。Lysis buffer: 40mmol/L Tris, 1% SDS, 20mmol/L 乙酸钠, 1mmol/L EDTA。杂交洗液 SI: $1 \times \text{SSC}/0.2\% \text{ SDS}$; SII: $0.1 \times \text{SSC}/0.2\% \text{ SDS}$; SIII: $0.1 \times \text{SSC}$ 。生物分光光度计, 购买于 Eppendorf 公司, 第二军医大学微生物重点实验室保有。基片: 购买于 Fullmoon 公司生产的的基因芯片专用基片。点样仪: Omnigrad 公司产品, 为国家人类基因组南方中心保有。

1.3 方法

1.3.1 铜绿假单胞菌标准株 PAO1 的培养和基因组 DNA 的获得: 3mL LB 培养基中加入 30 μL PAO1 菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 12h。按照文献[7] 抽提 PAO1 基因组 DNA: 将 1.5mL 培养好的菌液 12,000 r/min 离心 3min, 弃上清, 使用 200 μL 的 Lysis buffer 重悬沉淀, 并吹匀。加入 66 μL 的 5mol/L NaCl 并摇匀, 于 12,000r/min 离心 10min, 吸取上清加入新的 EP 管, 加入等体积的氯仿, 用力摇动成白色乳浊液。12,000r/min 离心 3min。提取上清到新管中。用 100% 乙醇沉淀, 用 70% 乙醇洗涤 2 次。沉淀用 50 μL TE 溶解, 琼脂糖电泳鉴定。

1.3.2 引物设计、基因片段克隆: 根据最近国外文献报导, 选出 100 个与 QS 有关的基因, 使用生物学软件 Array Designer 3 批量设计, 并使用 Primer Premier 5.0 逐个检验校正后, 合成 100 对特异性引物。以基因组 DNA 为模板, PCR 扩增出相关基因的特定的片段。胶回收, 纯化, 将片段克隆于 pMD-18T 载体。测序, 结果与遗传学图谱进行比对。

1.3.3 芯片的点样制备: 通过 pMD-18T 的通用引物 M13, 单克隆菌液为模板, 扩增出足够量的靶序列的 DNA 片段, 抽滤纯化, 加入 50% DMSO, 终浓度的 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 点样, 紫外交联, 加固。室温干燥保存备用。

1.3.4 探针的制备: 按照 TRIzol 产品说明书抽提 PAO1 总 RNA, 测定 OD_{260}/OD_{280} 反转录掺入 cy3/cy5-dCTP。制备, 纯化 cDNA 探针。将探针分别用 7 μL 杂交液 ($3.5 \times \text{SSC}$ 0.3% SDS) 溶解。

1.3.5 杂交, 洗片和扫描: 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2min。将 cy3/cy5 标记成对探针进行混合后与芯

片杂交。保持湿度, 55℃杂交 18~24h。芯片杂交完成后洗液 SI, SII 各漂洗 5min, 重复以上步骤一次, SIII 洗 2min, H₂O 洗 2min, 干燥。使用 ScanArray 4000 扫描芯片获得图像, ImaGene 3.0 软件分析处理。

1.3.6 PAO1 生长曲线的测定: 3mL LB 培养基中加入 *OD*₆₀₀ 为 0.5 的菌液 10μL, 每 1h 时测定 *OD*₆₀₀ 数值。同样条件下加入最终浓度为 0.1g/L 的妥布霉素, 测定每 1h 测定的 *OD*₆₀₀ 数值。并作出生长曲线图。

1.3.7 抽取指数中期和平台初期的 PAO1 的 RNA, 制备成对探针; 抽取药物抑制下的 PAO1 的指数中期和平台初期的 RNA, 制备成对探针, 分别和芯片杂交。

2 结果

2.1 铜绿假单胞杆菌 PAO1 的基因组 DNA 的获得与鉴定

抽提的 PAO1 基因组 DNA, 琼脂糖电泳, 出现一条清晰的大约 6,300 kb 的片段。3 个点样孔分别加 1μL, 2μL, 5μL 抽提 PAO1 基因组 DNA (图 1)。

2.2 克隆出的基因片段的测序比对的结果

以 PA1319 为例, PCR 扩增产物电泳 (图 2), 1319 的片段大小为 550 左右。

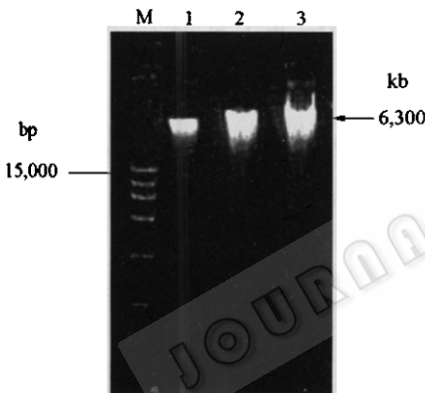


图 1 PAO1 基因组 DNA 电泳图
M DNA maker, 1、2、3 1μL、μL 和 5μL 提取的 PAO1 基因组 DNA

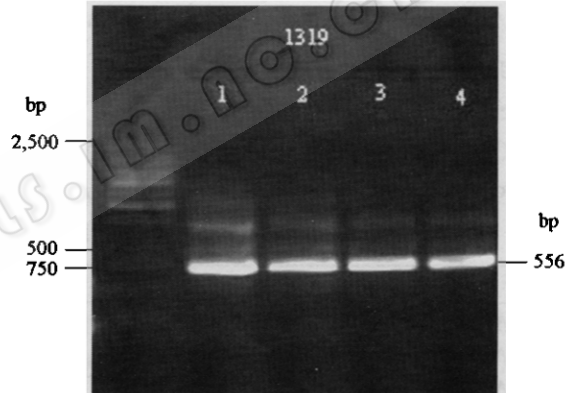


图 2 PA1319 PCR 电泳图
1~4 相同条件下的 PCR 扩增产物

与 PA 基因数据库比对发现, 克隆出 46 个与 PA 的 QS 相关基因中的片段:

PA0106, PA2300, PA1249, PA1003, PA2572, PA0107, PA2144, PA1000, PA1914, PA0586, PA1001, PA0998, PA0007, PA0364, PA0175, PA0365, PA0027, PA0996, PA0534, PA0588, PA0399, PA1669, PA1216, PA2564, PA1247, PA3189, PA1212, PA0355, PA1319, PA1218, PA1939, PA0108, PA0366, PA0999, PA3032, PA0447, PA2160, PA1248, PA1999, PA1148, PA1658, PA2250, PA1130, PA2566, PA0997, PA3183。

扩增出 PA 上的其他基因的片段 30 个:

PA2503, PA0855, PA2512, PA0026, PA1901, PA2304, PA2555, PA2303, PA2305, PA0745, PA2172, PA0105, PA3676, PA0744, PA4117, PA1002, PA2302, PA019, PA5354, PA1217, PA1893, PA1131, PA3535, PA0572, PA1214, PA2331, PA4880, PA2372, PA0132, PA1660。

2.3 目标序列 PCR 扩增获得

用 pMD-18T 载体的通用引物 M13, PCR 扩增出足够数量的片段。每一个孔道对应一个基因片段。

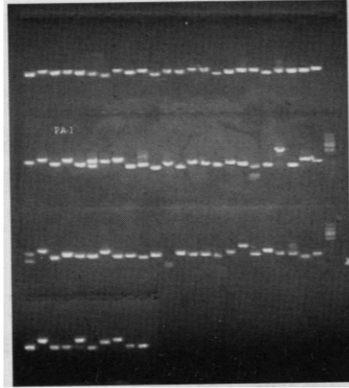


图3 PCR 扩增产物电泳图

编号顺序: 第1排 A01, B01, A02, B02, 依次类推, 第2排是 C01, D01, C02, D02. 依次类推. 第3排依次编号为 E, F. 第4排为 G, H. 每个编号都代表了一个扩增出的基因片段。

2.4 cDNA 芯片的点样

PCR 产物纯化后用 50% DMSO 溶解使得每个 PCR 产物终浓度都约为 250ng/μL. 点成 9×9 的小矩阵, 重复的 4 个小矩阵组成一个完整从矩阵 (表 1)。

表 1 QS 相关基因 cDNA 芯片上各点的分布情况

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	PA0106	PA2300	PA1249	PA1003	PA2572	PA0107	PA2144	PA1000	PA1914
2	PA0586	PA1001	PA0998	PA0007	PA0364	PA0175	PA0365	PA0108	PA0366
3	PA2250	PA0027	PA0996	PA0534	PA0588	PA0399	PA1130	PA2566	PA0997
4	PA3183	PA0999	PA3032	PA0447	PA2160	PA0355	PA1319	PA1218	PA1669
5	PA1216	PA2564	PA1247	PA3189	PA1212	PA1939	PA1248	PA1999	PA1148
6	PA1658	空白对照	PA2736	PA3146	PA2736	PA1525	PA1368	PA4747	PA5560
7	PA0668	PA3814	PA0650	PA1888	PA0105	PA3194	PA3157	PA1319	PA3194
8	PA4541	PA3966	PA2223	PA0434	PA2400	PA0586	PA4280	PA0421	PA3814
9	PA0983	PA4880	PA2372	PA5398	PA1660	NC	NC	NC	NC

QS 相关基因 cDNA 芯片上各点对应的目标基因的编号, NC 为阴性对照。

阳性基因为 QS 相关基因, 空白对照为 50% DMSO, 可能相关基因为文献没有报导但与铜绿假单胞杆菌 QS 可能相关的基因, 阴性对照是与铜绿假单胞杆菌无关的非绿脓杆菌基因 (图 4)。

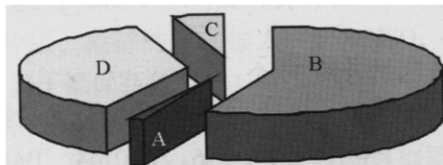


图 4 QS 相关基因 cDNA 芯片上各点的组成

A 阳性基因, B 空白对照, C 可能相关基因, D 阴性对照

2.5 末端转移酶 (TDT) 反应产物与芯片杂交结果

cy3-dCTP 通过末端转移酶 (TDT) 连接到通用引物上, 作为探针与芯片杂交, 鉴定芯片制作的结果, 通过于空白对照点的比较。各个点信号正常, 都可以扫描出信号, 说明点样结果正确 (图 5)。

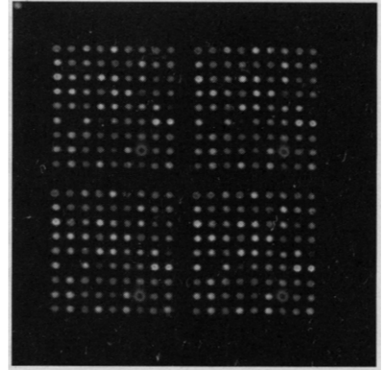


图 5 TDT 杂交图

2.6 PAO1 的生长曲线的测定

根据每隔 1h 测定的 OD_{600} 数值, 画出菌体生长曲线 (图 6)。使用妥布霉素后, PAO1 进入指数生长期的时间延长了, 平台期浓度的也降低了。说明了妥布霉素对 PAO1 生长有明显的抑制作用。

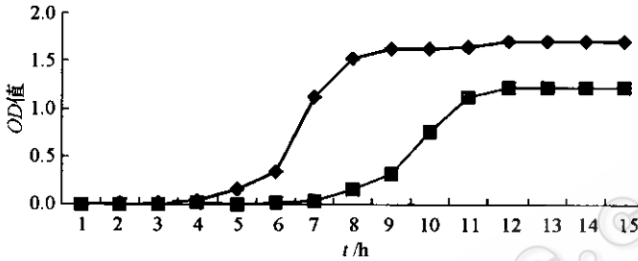


图 6 PAO1 生长曲线图

◆ PAO1 正常生长曲线图, ■ 妥布霉素抑制下的生长曲线图

2.7 扫描获得的图像的数据处理

$$R = \frac{cy5 (\text{信号强度} - \text{背景}) / \text{该通道下的平均信号强度}}{cy3 (\text{信号强度} - \text{背景}) / \text{该通道下的平均信号强度}}$$

当 R 值在 $1/2 \sim 2$ 之间, 认为没有发生差异表达^[4]。cy3 和 cy5 分别标记了平台期和对数期抽取的 RNA 所制备的探针; 正常生长的和在妥布霉素抑制下抽取的 RNA 制备的探针。平台期和对数期相比, 出现高表达的基因有: PA2300, PA2144, PA1216, PA1212, PA2566, PA1319, PA2564, PA3189。出现低表达的基因有: PA2250, PA0399, PA0447, PA1658, PA1669, PA1999 表 2。cy3 和 cy5 分别标记的正常生长的和妥布霉素抑制条件下, 同时抽取的 RNA 制备的探针。正常生长的和妥布霉素抑制相比, 多数基因出现高表达。

表 2 表达变化的基因列表

基因编号	表达产物	R 值 (CY5/CY3)
高表达基因		
PA2144	Glycogen phosphorylase	2.03
PA2300	Chitinase	2.24
PA1218	Hypothetical protein	2.58
PA1216	Hypothetical protein	2.83
PA1212	Probable major facilitator superfamily (MFS) transporter	3.35
PA2566	Conserved hypothetical protein	3.45
PA1319	Cytochrome oubiquinol oxidase subunit III	4.43

续表 2

PA2564	Trans - aconitate methyltransferase	5. 15
PA3189	Probable permease of ABC sugar transporter	7. 46
低表达基因		
PA2250	Lipoamide dehydrogenase - Val	0. 12
PA0399	Cystathionine beta - synthase	0. 24
PA0447	Glutaryl - CoA dehydrogenase	0. 28
PA1658	Conserved hypothetical protein	0. 33
PA1669	Hypothetical protein	0. 43
PA1999	Probable CoA transferase, subunit A	0. 48

3 讨论

从少量细菌中分离出来的细胞外毒力因子可激发宿主免疫应答来中和这些化合物；而整个菌群一旦达到某种密度，其毒力基因协调表达使铜绿假单胞菌分泌的细胞外因子达到足以克服宿主防御系统的高水平，侵入血管，引起全身性炎症反应及最终的死亡^[8]。即使使用合适的抗生素治疗也不能阻止这一进程。因此该过程必须在毒力基因协调表达之前在早期得到阻断。细菌常常趋向于吸附在固体表面形成群落，形成细菌生物被膜提高了耐药性和免疫逃逸，是院内感染的最常见的病原 QS 相关的基因表达进行调控的^[9]。所以对信号小分子产生传导通路，QS 相关的基因的研究有着重要的现实意义。

本文根据国外最新文献报导可能与 QS 相关的基因序列，制备 cDNA 基因芯片。测定 PAO1 的生长曲线后，分别在指数期和平台期抽取铜绿假单胞杆菌 PAO1 的 RNA 制备探针，与芯片杂交。研究 QS 相关基因中，细菌在不同的生长时期基因发生差异表达。插入 PA2300, PA2144, PA1216, PA1212, PA2566, PA1319, PA2564, PA3189, PA2250, PA0399, PA0447, PA1658, PA1669, PA1999。这些高表达的基因的表达产物有的是葡糖基转移酶、壳多糖酶、MFS 运载体、细胞色素氧化亚单位，有的是功能未知的或是保守的蛋白。低表达的基因的表达产物是脱氢酶，胱硫醚 β-合酶，戊二酰-CoA 脱氢酶，辅酶 a 亚单位和保守蛋白。表明了指数期和平台期，部分基因在指数期高表达，平台期则明显减弱。一些基因则相反。还有部分基因的表达量没有出现明显的变化，说明了在指数期和平台期的表达量相似。

同时平行培养 2 个 PAO1 样本。试验组中加入一定浓度的妥布霉素抑制其正常生长，对照组为正常生长的 PAO1^[10]。为避免细菌不同生长时期的基因的表达的差异，在同一生长时期抽取 RNA，制备探针，和芯片杂交，可以观察到这种抑制药物作用下，QS 系统相关基因的表达发生的变化。正常生长的和妥布霉素抑制相比：多数基因表达量要显著高于加入药物抑实验组。这符合点样时选取的部分靶基因片段的国外文献的相关报导。达到了制备该芯片的预期目的。体现了这张 cDNA 芯片在针对铜绿假单胞杆菌药物筛选上的使用价值。

cDNA 芯片是一种新的关于细菌毒力和耐药机制的研究手段，将为控制群感效应信号系统、降低细胞外毒力因子产生、处理生物膜提高药物敏感性以及寻找新的药物奠定理论和实验基础，并为快速检测和控制铜绿假单胞菌感染提供有效措施，同时将为

铜绿假单胞菌基因表达谱的建立和基因功能分析奠定基础。在国内,首次研制出与 QS 相关基因的 cDNA 芯片, QS 相关 cDNA 基因芯片的制备,使得可以运用基因芯片技术到研究铜绿假单胞杆菌 QS 系统相关基因,比较直观的观察不同药物对基因表达调控的影响,为找到能较好抑制铜绿假单胞菌正常生长的药物研究提供新方法。

致谢 感谢上海华冠生物芯片有限公司秦红友老师在芯片制备与检测方面给予的细心指导和大力协助;感谢本室潘卫副教授以及湛卫、陈秋莉、贾建安、温宗梅等同学给予的帮助和建议。

参 考 文 献

- [1] Stover C K, Pham X Q, Erwin A L, *et al.* *Nature*, 2000, **406** (6799): 959 ~ 964.
- [2] 齐枝花, 于鑫, 郑正, 等. *微生物学通报*, 2005, **32** (2): 128 ~ 133.
- [3] 周钥, 刘小锦, 喻子牛, 等. *微生物学报*, 2004, **44** (1): 122 ~ 126.
- [4] 李瑶. *基因芯片与功能基因组*. 北京: 化学工业出版社, 2004. 50 ~ 75.
- [5] Rasmussen T B, Bjarnsholt T, Givskov M, *et al.* *J Bacteriol*, 2005, **187** (5): 1799 ~ 1814.
- [6] Wagner V E, Bushnell D, Iglewski B H. *et al.* *J Bacteriol*, 2003, **185** (7): 2080 ~ 2095.
- [7] Chen W P, Tsong-teh Kuo A. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21** (9): 914.
- [8] Fergie J E, Shema Patrick C C. *Clin Infect Dis*, 1994, **18** (3): 390 ~ 394.
- [9] Schuster M, Lostroh C P, Greenberg E P, *et al.* *J Bacteriol*, 2003, **185** (7): 2066 ~ 2069.
- [10] Bjarnsholt T, Jensen P O, Givskov M, *et al.* *Microbiology*, 2005, **151** (2): 373 ~ 383.