

伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片的制备 与基因表达谱分析应用*

生秀梅¹⁾ 黄新祥^{1)**} 茅凌翔¹⁾ 朱超望¹⁾ 徐顺高¹⁾ 张海方¹⁾ 许化溪¹⁾ 刘秀梅²⁾

¹⁾江苏大学医学技术学院, 镇江 212013; ²⁾中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100050

摘要 伤寒沙门菌是一种具有鞭毛的革兰阴性人类肠道致病菌, 也是一种重要的原核生物研究用模式菌。基因组芯片能够系统、全面且高效地观察生物的基因表达及进行基因组结构比较。利用伤寒沙门菌现有的全基因组序列, 以 Ty2 菌株的基因组为基准, 选取 CT18 菌株和 z66 阳性菌株的特异性蛋白编码基因, 设计特异性引物, 经 PCR 有效扩增出 4 201 个基因, 产物纯化后点样于多聚赖氨酸玻片制备伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片, 并验证了芯片样点位次与效果。通过对基因表达谱分析的各种条件进行优化, 建立相应的表达谱分析方法, 并用于比较伤寒沙门菌野生株在高渗、低渗条件下的基因表达差异, 结果与以前的报道基本一致。结果表明, 成功建立了伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片及表达谱分析方法, 可为有关伤寒沙门菌基因表达调控及致病性机理、进化和基因多样性等方面的深入研究提供有效的技术支持。

关键词 伤寒沙门菌, 基因组 DNA 芯片, 基因表达谱

学科分类号 R378.2+3, Q786

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00373

沙门菌属 (*Salmonella*) 属于肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 是人类研究最为广泛和深入的原核生物之一, 其基因组结构及近 60% 的基因功能已被阐明, 成为一种重要的原核生物基因表达与信息调控研究的模式菌^[1,2]。伤寒沙门菌感染主要分布于热带和亚热带地区, 亚洲尤其是东南亚属于高发区, 每年约有 2 000 万感染病例和近 60 万的死亡病例^[3,4]。目前伤寒沙门菌仍是一种重要的食源性致病菌, 且多重耐药菌株的不断产生, 更增加了其对人类食品安全的危害^[5]。因此, 开展伤寒沙门菌有关基因表达调节机制及比较基因组学的研究显得极为重要。

基因芯片技术自 1991 年在《科学》(Science) 上首次提出后^[6], 以其高通量、集约化、大规模、快速平行化等特点, 极大地简化和缩短了实验研究进程, 主要应用于细胞周期、胁迫应答、基因表达调控、基因分型、推测操纵子结构、鉴定毒力因子和遗传药理学研究等方面, 为比较基因组学及功能基因组学研究提供了良好策略^[7~11]。目前, 已有数百

种微生物完成了全基因组序列测定, 为全基因组 DNA 芯片的研制提供了丰富的基因序列信息, 同时也为该技术在微生物研究中的应用提供了广阔空间。Stanford 大学研究人员在 2003 年首先建立了沙门菌基因组芯片^[12], 极大推动了有关基因表达谱和比较基因组学研究, 由于西方发达国家鼠伤寒沙门菌感染较多, 沙门菌基因组芯片应用研究多集中于鼠伤寒沙门菌的研究。基因芯片原位合成制备技术诞生后, 虽有多家公司相继设计生产出各种 Oligo 基因组芯片, 但目前价格仍然十分昂贵, 在我国大规模应用受到一定限制。

鉴于此, 我们选择伤寒沙门菌作为研究目标, 利用伤寒沙门菌现有的全基因组序列, 以 Ty2 菌

* 国家自然科学基金资助项目(3057008)和国家科技支撑计划资助项目(2006BAK02A15)。

** 通讯联系人。

Tel: 0511-85038449, E-mail: huxinx@yahoo.com.hk

收稿日期: 2008-05-21, 接受日期: 2008-07-31

株的基因组蛋白编码基因(或 ORF)为基准, 选取 CT18 菌株和 z66 阳性菌株的部分特异性基因, 经特异性 PCR 扩增各种基因, 点样制备伤寒沙门菌全基因组 DNA 微点阵(microarray)芯片, 并通过基因表达谱分析的各种杂交条件进行优化, 建立较为完善的伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片分析系统, 以用于比较基因组学及功能基因组学研究。

1 材料与方 法

1.1 实验菌株

伤寒沙门菌标准菌株 Ty2、多重耐药株 CT18, 野生 z66 阳性伤寒沙门菌均为江苏大学医学技术学院保存。细菌培养和基因组 DNA 提取使用标准方法^[13]。

1.2 基因挑选

从基因库获取伤寒沙门菌 Ty2 全基因组序列和信息^[1], 提取出全部 ORF(包括 CDS 和假基因, 不包括 RNA 基因)序列, 剔除插入(IS)序列所含重复基因、小于 150 bp 的基因及高度同源基因簇的重复基因, 再补充伤寒沙门菌 z66 阳性株和 CT18 菌株特异性基因 41 个, 并以伤寒沙门菌 16 S rRNA 基因作为阳性对照, 最后共选定伤寒沙门菌 4 224 个蛋白编码基因。

1.3 引物设计与合成

基因组引物设计采用 Array Designer 2.0 软件进行, 每个基因设计一对特异引物, 引物的 T_m 值均一(60℃左右), 扩增产物的长度最先满足于 500 bp 左右, 对较小的 ORF, 扩增产物长度逐步递减。引物设计后与全基因组序列进行 BLAST 分析, 以保证特异性。引物由中国科学院北京基因组研究所华大基因研究中心合成。引物溶解成 10 mmol/L 后置 96 孔板, 分别取等量的各对引物, 混匀置于 96 孔板中, 使各引物的浓度为 5 mmol/L, 以备 PCR 用。

1.4 基因 PCR 扩增

以伤寒沙门菌各菌株基因组 DNA 为模板和基因组引物进行 PCR 扩增, 反应体系为 90 μ l (10 \times 缓冲液 9 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 4.5 μ l, rTaq 2.5 U, 引物 9 μ l, 模板 DNA 18 ng, 加水至 90 μ l), 扩增用 rTaqDNA 聚合酶、缓冲液和 dNTPs 均购自 TaKaRa 公司。反应体系直接加入 96 孔 PCR 板(Axygen 公司), 铝泊密封后在 PCR 仪(Eppendorf)上扩增(预变性 94℃ 5 min 后进行循环扩增, 94℃ 30 s、54℃ 30 s、72℃ 30 s, 共 30 个循环, 最后

72℃ 5 min)。扩增后取 2 μ l 反应液于 1%琼脂糖凝胶电泳观察结果, 对出现条带大小不符、非单一条带和没有出现任何条带的视为扩增失败。对扩增失败的通过改变扩增条件(结合温度)重新扩增。对最后仍没有成功扩增的, 重新手工设计引物, 再进行相应的扩增。留取成功扩增的产物各 150 μ l 以备纯化点样用。

1.5 扩增产物的纯化与确认

将 PCR 产物转入 MuLtiScreen-PCR Plate (Millipore 公司)中, 16 inchs Hg 负压抽滤 20 min, 每孔加入 80 μ l 水, 16 inchs Hg 负压抽滤 10 min, 再次加入 80 μ l 水 (pH 7.5), 200 r/min 摇动 30 min, 纯化产物收集于另一 96 孔板中。取 3 μ l 电泳, 与纯化前进行比对确认。同时随机抽取纯化后的产物(2%)进行 DNA 序列分析, 确认和目的基因序列一致。将纯化产物于 65℃干燥后, 每孔加入 10 μ l 的 50% DMSO, 振荡 5 min 后 4℃过夜, 使 DNA 充分溶解后-20℃贮存, 以备点样。

1.6 芯片点样

将 DNA 样品从 96 孔板转入 384 孔板。用 SpotArray72 芯片点样系统(PerkinElmer 公司)进行点样, 玻片为多聚赖氨酸包被玻片, 型号为 MA-001, 点样针为 SMP3 微点样针(Telechem 公司)。点阵设计为双重点, 每张芯片含 32 个亚矩阵(4 \times 8 排列), 每亚矩阵按 18 \times 15 点样。每亚矩阵均含有 2 个阴性对照, 采用无 DNA 的点样液(50% DMSO)点样, 在芯片的四周及中央亚矩阵设计 6 个阳性对照, 采用 16S rRNA 基因扩增产物点样。点样由中国科学院北京基因组研究所北京华大基因研究中心完成。点样完成后经封闭处理, 得到伤寒沙门菌全基因组 DNA 芯片, 室温干燥避光保存。

1.7 芯片的点样验证

取 3 种伤寒沙门菌基因组 DNA 各 3 μ g, 混合后按参考文献[14]所述方法使用荧光素 Cy3 标记后与芯片杂交, 扫描以观察芯片点样制备的效果。其次, 以相同方法用 Cy3 标记基因组 DNA, 另随机选取经电泳观察鉴定的 96 个基因扩增产物, 合并纯化后同样用 Cy5 标记, 混合 Cy3 和 Cy5 标记产物, 与芯片进行杂交, 用双通道扫描以验证芯片上点样位次是否与设计相符。

1.8 芯片表达谱分析方法的建立与应用

1.8.1 细菌总 RNA 的提取。将野生伤寒沙门菌分别于 30 ml 的含 NaCl 300 mmol/L(高渗)或 50 mmol/L(低渗)的 LB 液体培养基培养至对数生长期, 冰上

放置 20 min 后离心(4 000 r/min, 10 min, 4°C)收集菌体, 用 TE 缓冲液 - 溶菌酶(0.6 g/L, pH 8.0)结合磁珠 MORA-EXTRACT(AMR 公司, 日本)室温振荡 4 min 破壁溶菌, 用 RNaeasy mini column (QIAGEN 公司)试剂盒, 按说明书操作提取细菌总 RNA. 用 ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop 公司)测浓度及纯度, 并取少量于 1%琼脂糖凝胶电泳观察质量, 用 DNase I 消化痕量的 DNA 后, -70°C 保存待用.

1.8.2 RNA 逆转录与 cDNA 荧光标记. 取细菌总 RNA, 用 9 碱基随机引物(N9)加用 FindGDPs 软件, 对芯片上所有基因 3'端 50%的序列为靶标设计的基因组特异性引物(genome directed primers, GDP)^[19]和反转录酶(SuperScript III, Invitrogen 公司)进行反转录, 并标记荧光 Cy3 或 Cy5. 操作简述如下: 取 RNA 20 μ g, 加 1 μ l N9 引物(3 g/L), 1 μ l GDP 引物(3 g/L), 补 DEPC 处理的无菌水至 14.5 μ l, 于 70°C 保温 10min 后置冰骤冷, 再依次加入 1 μ l RNA 酶抑制剂(40U/ μ l), 6 μ l 5 \times 缓冲液, 3 μ l 0.1 mol/L DTT, 3 μ l 12.5 mmol/L dNTPs, 1 μ l 1 mmol/L Cy3- 或 Cy5-dCTP (Amersham 公司), 1.5 μ l 反转录酶(200U/ μ l), 混匀后在 PCR 仪 (Eppendorf 公司)上进行逆转录反应(25°C 10 min, 50°C 4 h, 85°C 10 min).

1.8.3 RNA 的灭活. 在上述反应后溶液中加入 10 μ l 0.5 mol/L EDTA, 混匀, 放置 2 min 后加入 2 μ l 5 mol/L NaOH(新鲜, 每 2 周配置 1 次), 65°C 保温 20 min 后加入 5 mol/L HCl 2 μ l平衡反应体系.

1.8.4 cDNA 的荧光标记与纯化. 混合 Cy3 和 Cy5 反应体系, 使用 PCR pro purification kit(QIAGEN 公司)按说明纯化, 最后用 40 μ l 水回收, 用 ND-1000 Spectrophotometer 测浓度及纯度, 于 45°C 离心真空干燥, -20°C 贮存.

1.8.5 芯片预杂交. 将 35 μ l的预杂交液(5 \times SSC, 0.1% SDS, 1% BSA)加到芯片的点样区域, 盖上盖片, 放入杂交箱内 50°C 预杂交 4~6 h. 取出芯片, 除去盖片, 于去离子水中洗涤芯片 2 次各 2 min. 最后于无水乙醇中洗涤 1 min, 用电风吹干芯片, 快速进行芯片杂交操作.

1.8.6 芯片杂交. 于上述标记 DNA 中加入 35 μ l 的杂交液(参考文献[16]), 95°C 变性 10 min 后, 将杂交液点加于芯片上, 加盖玻片后于湿盒中 50°C 杂交 16~18 h. 杂交后取出于 1 \times SSC, 0.06% SDS 中洗涤 2 min, 0.06 \times SSC 中洗涤 2 min, 95%乙醇

中洗涤 2 min. 吹干后用 GenePix Personal 4100A 芯片扫描仪(Axon Instruments)扫描芯片.

1.8.7 数据分析. 采用 GenePix Pro6.0 软件(Axon Instruments)并辅以 Excel 软件进行图片处理和数据分析. 计算扣除背景后的各样点荧光信号值(均值). 采用全局归一法(global normalization)对双色荧光数据进行标准化处理. 并计算每个点杂交后不同荧光物质标记所得信号比值(Ratio), 以 Log₂ Ratio 值描述结果, 取-1 和 1(表达 1 倍差异)作为阈值.

1.8.8 表达谱分析技术的应用. 分别取高、低渗透培养条件下的 RNA 各 20 μ g, 采用双色荧光交换 2 \times 3 法重复原则, 即分别在高渗、低渗条件下培养伤寒沙门菌各 2 管, 对每管中的培养物分别提取 RNA, 然后分别进行 3 次逆转录、杂交和反向荧光标记即荧光互换^[15]. 具体方法同 1.8.2~1.8.7.

2 结果与讨论

2.1 伤寒沙门菌全基因组 DNA 芯片的制备

本研究中以 Ty2 菌株的基因组为基准, 提取出全部 ORF(包括 CDS 和假基因, 不包括 RNA 基因)序列, 剔除所有插入(IS)序列所含重复基因、小于 150 bp 的基因及高度同源基因簇重复基因, 再补充伤寒沙门菌 z66 阳性株和 CT18 菌株特异性基因 41 个, 并以伤寒沙门菌 16S rRNA 基因作为阳性对照, 最后共选定伤寒沙门菌 4 224 个基因. 针对每个基因设计了一对特异性引物, 引物长度为 18~20 bp, T_m 值均一于 60°C 左右, 扩增产物的长度在 500 bp 左右, 以适宜于批量扩增, 同时利于芯片应用中优化核酸分子杂交条件及保证杂交效果. 引物设计后逐个与全基因组序列信息中进行 BLAST 分析, 以保证其特异性.

以细菌全基因组 DNA 为模板, 使用如上针对 4 224 个 ORF 设计的特异性引物进行 PCR 扩增, 扩增后产物使用 MuLtiScreen-PCR Plate 试剂盒纯化, 纯化前和纯化后的 PCR 产物均进行了电泳检测. 结果显示其特异性高达 99.5%以上. 经过数轮扩增, 最后成功扩增出 4 201 个基因. 纯化后的 PCR 产物溶于 50% DMSO 中, 浓度在 100 mg/L 以上. 将 DNA 样品转入 384 孔板后, 进行芯片点样. 由于从 PCR 扩增到点样, 产物经数次转换, 为判断是否有操作不当带来的错误, 点样前从 384 孔样品中随机抽选 2%的样品进行测序, 结果显示所有产物序列和目的基因相应序列完全吻合. 整理 384 孔板中每孔的基因位次, 按点样仪所需格式保

存, 并根据点样设计, 制作芯片扫描输出的带有基因注释的样点次序文件, 即 gal 文件, 以备在下游数据处理过程中为扫描仪软件使用. 每张芯片共点有 8 448 个点(双点阵), 含可有效分析的 4 201 个伤寒沙门菌基因(包含阳性对照), 覆盖 96.1% 的伤寒沙门氏菌全基因组蛋白质编码基因(ORF). 最后, 本次研究首批制备了 130 张伤寒沙门氏菌全基因组 DNA 芯片, 剩余 DNA 探针样品密封于 384 孔板-20℃ 保存, 以备下次点样用. 当今全基因组序列测定发展迅速, 今后如有新的伤寒沙门菌菌株全基因组序列公开时, 我们还可以通过比对分析, 补充其特异性基因探针进行点样, 以提高此伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片的研究适用性.

2.2 伤寒沙门菌全基因组 DNA 芯片的评价

伤寒沙门菌全基因组 DNA 芯片制备后, 为检验芯片点样效果与正确性, 我们设计实验对该芯片进行了验证. 首先, 使用 Cy3 标记基因组 DNA, 与本次研究制备的芯片进行杂交并扫描, 显示 99.9% 的有效基因有明显荧光信号, 说明芯片点样制备的效果良好, 漏点率低. 其次, 从 4 201 个 ORF 中随机选取 96 个基因, 进行特异性扩增, 产物经电泳观察鉴定后, 合并、纯化后用 Cy5 标记, 另用 Cy3 标记基因组 DNA, 混合 Cy3 和 Cy5 标记产物, 与芯片进行杂交, 用以验证各芯片上各基因位次是否与设计相符. 通过双通道扫描结果显示, 随机抽选的 96 个基因均在相应的设计位点出现较强的 Cy5(红色)荧光信号, 说明点样没有发生位次错误. 据此我们认为此次伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片制备成功, 可用于相关的基因表达谱分析或比较基因组学研究.

2.3 伤寒沙门菌全基因组 DNA 芯片基因表达谱分析应用

芯片表达谱分析实验过程中, 提取的 RNA 的质量是影响整个实验的关键之一. 因细菌 mRNA 无 poly(A) 序列等基本特征, 所以只能通过提取细菌总 RNA 进行相关实验. 为了保证获取高质量的 RNA, 选用 QIAGEN 公司 RNeasy mini column 试剂盒进行 RNA 的提取, 并应用磁珠快速破菌. 本次研究多次提取 RNA, A_{260}/A_{230} 和 A_{260}/A_{280} 均在 2.0 左右, 电泳观察均有清晰的 23 S rRNA 和 16 S rRNA 条带, 说明提取的细菌总 RNA 质量较好.

反转录和荧光标记 cDNA 是影响芯片分析结果的重要因素. 本实验采用反转录时直接掺入 Cy3(5)-dCTP 标记法, 操作较为简便、快速. 通过

预试比较不同 RNA 量、反转录酶量、Cy3(Cy5)-dCTP 量和不同的引物及用量对杂交结果的影响, 结合考虑试剂成本, 最后确定反应体系为 30 μ l, 含 20 μ g 细菌总 RNA, 300 U 逆转录酶 SuperScript III 和 1 nmol Cy3(5)-dCTP, 引物 N9 和 GDP 各 3 μ g, 进行逆转录, 最终的效果较好, 样点信号较强而背景较弱, 且成本较低. 我们发现, 预杂交是必要的, 直接进行杂交产生的信号明显偏弱. 同时, 对杂交温度进行比较发现, 42℃ ~ 50℃ 范围内, 均能得到较好的杂交效果(信号较强). 研究显示, 在 50℃ 下杂交的特异性更好.

为了检查所建立的表达谱分析方法的可靠性, 我们使用同一种伤寒沙门菌总 RNA(LB 低渗培养至对数生长期)分别以 Cy3- 和 Cy5-dCTP 标记, 混合、纯化后与芯片杂交. 若无 RNA 质量外因素的影响, 则杂交后两种信号强度理应接近. 本次研究选用低渗环境下培养伤寒沙门菌至对数生长期提取的总 RNA 进行双荧光互标, 与芯片杂交扫描后各样点的荧光强度经数字化转换, 以 Log₂Ratio (635/532) 荧光强度比值对 Cy3 和 Cy5 的平均荧光强度作图(图 1), 我们发现: 荧光强度减去背景值后大于 1000 的所有点的 Log₂Ratio 值在 -1 和 1 之间, 即偏差在一倍以内; 98% 的 Log₂Ratio 值超过 -1 和 1 的离散点分布在平均荧光强度小于 300 以内, 这说明荧光强度较低时, 数据可靠性较低. 所以我们确定荧光值小于 300 的属于无效数据, 分析应当舍弃. 同时, 在舍弃了减去背景后 Cy5 和 Cy3 值小于 300 的数据后, 我们还比较了中位数、均数和总数 3 种不同的数据均一(标准化(normalization))分析方法, 发现中位数、均数和总数标准化的

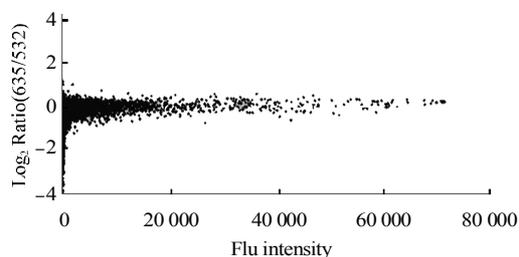


Fig. 1 Comparison of labeling efficiency with Cy3 and Cy5

The wild strains of *S. enterica* serovar Typhi were incubated to log phase ($A_{600}=0.5$) in Luria-Bertani (LB) broth (pH 7.0) containing 50 mmol/L. Total RNA was extracted and reverse-transcribed to cDNA, labeled with Cy3-dye or Cy5-dye. Different labeled cDNAs were mixed and hybridized with the *Salmonella* genomic DNA microarray. Fluorescence intensity differences between Cy3 and Cy5 of spots of the microarray were described as Log₂Ratio (635/532) values.

Log₂ Ratio 的平均值分别为 0.107 691、0.079 967、0.130 790, 提示用均数进行均一化最佳. 同时我们也发现, 即使采用均一法进行校正, Cy3 和 Cy5 双标记还是存在一定偏差(图 1). 因此, 在表达谱分析时, 配对比较的两种 RNA 用 Cy3 和 Cy5 荧光素交换标记(dye-swap labeling)进行平行杂交是必要的.

在形成上述基本操作条件(方案)的基础上, 我们应用该芯片进行了低渗和高渗条件下野生型伤寒沙门菌基因表达谱差异比较分析, 芯片杂交扫描结果见图 2. 本研究提取 RNA、逆转录及双荧光交换标记、杂交重复 3 次, 共杂交 6 张芯片. 依据前面确定的分析条件, 采用 GenePix Pro6.0 软件(Axon Instruments)和均数数据的均一化, 并辅以 Excel 软件进行数据分析, 以 3 次不同标本获得的结果平均, 差异在 1 倍以上的为差异表达基因, 发现在 4 201 个基因或 ORF 中, 获得近 70%有效分析数据(荧光信号大于局部背景信号 3 倍以上), 其中存在表达差异的基因有 189 个, 88 个基因(2.1%)

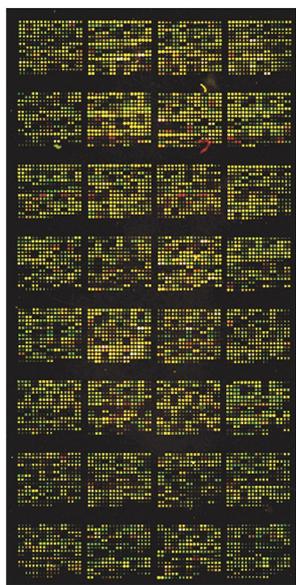


Fig. 2 The global transcriptional responses of wild strain of *S. enterica* serovar Typhi grown in high- and low-osmotic environmental conditions

The wild strains of *S. enterica* serovar Typhi were incubated to log phase ($A_{600}=0.5$) in Luria-Bertani (LB) broth (pH 7.0) containing 50 mmol/L or 300 mmol/L NaCl to simulate a low or high osmolarity environment, respectively. Total RNA was extracted and reverse-transcribed to cDNA, labeled with Cy3-dye and Cy5-dye respectively. The labeled probes were purified and hybridized to a *S. enterica* serovar Typhi genomic DNA microarray. The images were obtained by a laser scanner with two channels, and the digital density data were analyzed by the Acuity 4.0 software.

在高渗下表达明显上调, 主要有毒力岛 SPI-1 基因、鞭毛及趋化相关基因等, 110 个基因(2.6%)高渗下表达明显下调, 主要有 Vi 抗原合成相关基因簇基因等, 与以前应用伤寒沙门菌基因组 Oligo 芯片开展的相关研究结果基本一致^[14]. 结果进一步反映, 本次研究建立的应用伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片开展的基因表达谱技术方案基本成熟, 可为今后基于 DNA 芯片表达谱技术的各种表达调控等方面的研究提供分析平台^[17~19]. 此外, 本次研究应用基因组 DNA 标记荧光并获得良好的杂交效果, 也提示此芯片也可应用于相关的伤寒沙门菌进化、变异等比较基因组学研究.

在伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片的基础上, 结合基因敲除、表达增强等技术, 系统开展伤寒沙门菌生物学特性和基因组表达分析, 深入研究伤寒沙门菌的致病机制, 及通过比较基因组分析, 探寻诊断鉴别用标志基因将成为我们今后的研究重点.

3 小 结

本研究建立了一种基于特异扩增产物的伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片, 包含以 Ty2 菌株的基因组为基准和 CT18 菌株及 z66 阳性菌株部分特异性基因, 共 4 224 个蛋白质编码基因. 经过特异性 PCR 扩增出 4 201 个相应产物, 纯化后点样于聚赖氨酸玻片制备 DNA 芯片, 通过用相应的基因组 DNA 或特异性 PCR 扩增产物标记 Cy3 或 Cy5 荧光素后与芯片进行杂交, 发现点样效果良好, 位次与设计一致. 通过对基因表达谱分析的各种杂交条件进行优化, 建立相应的分析方法, 并应用该方法比较了伤寒沙门菌野生株在高渗、低渗条件下基因表达差异, 结果与以前相关报道基本一致. 表明成功建立了伤寒沙门菌基因组 DNA 芯片及相应的表达谱分析方法, 为今后进一步开展基因表达调控及致病性机理, 进化和基因多样性等方面的深入研究提供了有效的技术支持.

致谢 本研究得到了军事医学科学院微生物流行病学研究所杨瑞馥教授的悉心指导和无私帮助, 得到了该研究所周冬生、韩延平、邱景富、王津等同志的帮助, 并得到了中国科学院北京华大基因研究所市场部王霞等多位同志的密切配合, 在此一并表示诚挚的谢意.

参 考 文 献

- 1 Deng W, Liou S R, Plunkett G III, *et al.* *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi Ty2 Complete genome information: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=genomeprj&cmd=Retrieve&dopt=Overview&list_uids=371, 2002-09-25
- 2 Everest P, Wain J, Roberts M, *et al.* The molecular mechanisms of severe typhoid fever. *Trends Microbiol*, 2001, **9**(7): 316~320
- 3 Parry C M, Hien T T, Dougan G, *et al.* Review Article: Typhoid fever. *N Engl J Med*, 2002, **347**(22): 1770~1782
- 4 Huang D V, DuPont H L. Problem pathogens: extra-intestinal complications of *Salmonella enterica* serotype Typhi infection. *Lancet Infect Dis*, 2005, **5**(6): 341~348
- 5 Threlfall E J. Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiol Rev*, 2002, **26**(2): 141~148
- 6 Fodor S P A, Read J L, Pirrung M C, *et al.* Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, **251**(4995): 767~773
- 7 Agostini C, Miorin M, Semenzato G. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: a new approach to assess functional genomics in diseases. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*, 2002, **19**(1): 5~9
- 8 Kim M J, Lim S, Ryu S, *et al.* Molecular analysis of the *Salmonella* Typhimurium *tdc* operon regulation. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18**(6): 1024~1032
- 9 Hinchliffe S J, Howard S L, Huang Y H, *et al.* The importance of the Rcs phosphorelay in the survival and pathogenesis of the enteropathogenic *Yersinia*. *Microbiology*, 2008, **154**(4): 1117~1131
- 10 Blixt O, Hoffmann J, Svenson S, *et al.* Pathogen specific carbohydrate antigen microarrays: a chip for detection of *Salmonella* O-antigen specific antibodies. *Glycoconj J*, 2008, **25**(1): 27~36
- 11 Batchelor M, Hopkins K L, Liebana E, *et al.* Development of a miniaturised microarray-based assay for the rapid identification of antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, **31**(5): 440~451
- 12 Chan K, Baker S, Charles C. Kim, *et al.* Genomic comparison of *Salmonella enterica* serovars and *Salmonella bongori* by use of an *S. enterica* serovar Typhimurium DNA microarray. *J Bacteriology*, 2003, **185**(2): 553~563
- 13 Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 6.4~6.11
- 14 Huang X, Xu H, Sun X, *et al.* Genomic oligo microarray analysis of global transcriptional expression by *Salmonella enterica* serovar Typhi during hyperosmotic stress. *Int J Mol Sci*, 2007, **8**(2): 116~135
- 15 Talat A M, Hunter P, Johnston S A. Genome-directed primers for selective labeling of bacterial transcripts for DNA microarray analysis. *Nat Biotechnol*, 2000, **18**(6): 679~682
- 16 周冬生, 杨瑞馥, 宋亚军, 等. DNA 芯片技术在微生物研究中的应用. *军事医学科学院院刊*, 2002, **26**(4): 294~300
Zhou D S, Yang R F, Song Y J, *et al.* *Bull Acad Milit Med Sci*, 2002, **26**(4): 294~300
- 17 庞 昕, 韩延平, 周冬生, 等. 基于 DNA 芯片的细菌基因表达谱技术的建立与评价. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2006, **26**(2): 179~184
Pang X, Han Y P, Zhou D S, *et al.* *Chin J Microbiol and Immunol*, 2006, **26**(2): 179~184
- 18 Vrana K E, Freeman W M, Aschner M. Use of microarray technologies in toxicology research. *Neurotoxicology*, 2003, **24**(3): 321~332
- 19 周冬生, 韩延平, 戴二黑, 等. 鼠疫耶尔森菌全基因组 DNA 芯片的研制及用于比较基因组学分析. *解放军医学杂志*, 2004, **29**(3): 200~203
Zhou D S, Han Y P, Dai E H, *et al.* *Med J Chin Peop Liberat Army*, 2004, **29**(3): 200~203

Preparation of *Salmonella enterica* Serovar Typhi Genomic DNA Microarrays for Gene Expression Profiling Analysis*

SHENG Xiu-Mei¹⁾, HUANG Xin-Xiang^{1)**}, MAO Ling-Xiang¹⁾, ZHU Chao-Wang¹⁾, XU Shun-Gao¹⁾,
ZHANG Hai-Fang¹⁾, XU Hua-Xi¹⁾, LIU Xiu-Mei²⁾

¹⁾School of Medical Technology, University of Jiangsu, Zhenjiang 212013, China;

²⁾National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

Abstract *Salmonella enterica* serovar Typhi, a gram-negative human enteroinvasive pathogen is the etiological agent of typhoid fever, and is an important experimental model for prokaryote research. DNA microarray technology was widely used in analysis of genomic structures and expression profiles. The genomic DNA microarrays were prepared based on the genomic sequences of *S. enterica* serovar Typhi. A total number of 4 201 protein encoding genes selected from strains Ty2, LT18 and a z66⁺ wild strain of *S. enterica* serovar Typhi were amplified by PCR. The products were purified and printed onto the poly-L-lysine coated chip slides in duplicate to form the genomic DNA microarrays. Fluorescently labeled probes were prepared by priming of genomic DNAs with random hexamers and extension with Klenow DNA polymerase. Labeled DNAs were hybridized with the microarrays to check the printing effect and verify the genes order. The genomic DNA microarray-based bacterial gene expression profiling analysis was optimized and used to investigate global transcriptional responses when wild strain of *S. enterica* serovar Typhi was grown in high- and low-osmotic environmental conditions. The major results were consistent with those of previous research with oligo-genomic microarrays of *S. enterica* serovar Typhi. These results demonstrated that *S. enterica* serovar Typhi genomic DNA microarrays were successfully prepared and could be utilized in relative gene expression profiling analysis and comparative genomic researches.

Key words *Salmonella enterica* serovar Typhi, genomic DNA microarrays, gene expression profile

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00373

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (3057008) and The National Key Technology R&D Program (2006BAK02A15).

**Corresponding author.

Tel: 86-511-85038449, E-mail: huxinx@yahoo.com.hk

Received: May 21, 2008 Accepted: July 31, 2008