

• 论 著 •

炭疽芽孢杆菌基因芯片探针的制备^{*}

姜昌丽¹, 刘 凌¹, 杜凌琳², 李 云¹, 滕 毅¹, 王 超², 谭德勇², 王惠萱^{1△}

(1. 中国人民解放军成都军区昆明总医院检验科 650032; 2. 云南大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室, 昆明 650091)

摘 要:目的 制备炭疽芽孢杆菌(BA)基因芯片探针, 应用于 BA 基因芯片的检测。方法 采用 PCR 方法, 以 BA 疫苗株 A16R 基因组 DNA 为模板, 扩增 pXO1 质粒上的 8 个特异性片段, 连接至 pMD19-T Simple 载体, 构建分别包含 8 个探针序列的重组质粒, 以其为 PCR 扩增模板获取探针 DNA。结果 基因测序证明, 成功获得 BA 的 3 个探针。结论 BA 基因探针的成功获取, 为炭疽芽孢杆菌基因芯片的制备奠定了基础。

关键词:芽孢杆菌, 炭疽; 质粒; 寡核苷酸序列分析; DNA 探针

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 14. 001

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2011)14-1531-02

Preparation of gene probe for Bacillus anthracis gene chip^{*}

Jiang Changli¹, Liu Ling¹, Du Linglin², Li Yun¹, Teng Yi¹, Wang Chao², Tan Deyong², Wang Huixuan^{1△}

(1. Clinical Laboratory, Kunming General Hospital of Chengdu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, China; 2. Laboratory of Biochemistry and Molecule Biology, School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: Objective To prepare the gene probe for Bacillus anthracis(BA) gene chip for detection of BA. Methods Eight specific gene fragments were obtained by the PCR amplification of pXO1 plasmid from A16R, and inserted into pMD19-T Simple vectors to construct eight recombinant plasmids. The targeting probes were amplified from these successfully constructed recombinant vectors. Results Three probe gene segments for BA gene chip were obtained. Conclusion The acquirement of gene probe for BA laid the foundation for the preparation of BA gene chip.

Key words: Bacillus anthracis; plasmids; oligonucleotide array sequence analysis; DNA probes

炭疽病是一种人畜共患的烈性传染病, 该病是炭疽芽孢杆菌(BA)所致, 传播迅速、潜伏期短、死亡率高, 是一种严重威胁人类生命安全的传染病。BA 具有易培养、易制造、成本低、极易使用等特点, 通过喷洒在空气和投放于水源中污染自然环境而广为传播, 使人与动物感染致死^[1]。目前, BA 的实验室诊断主要是细菌学检查和免疫学检测, 这些方法不但耗时长, 而且要具备相应的技术素质。此外, 虽然美国梅约公司已开发出 DNA 检测 BA 的新技术, 利用该技术在 30 min 内就能检测出信件、大楼或人身是否存在 BA。但这些测试并不很准确, 还需进一步检测验证, 这需要 6 h 至 2 d 的时间。由于基因芯片检测技术具有高通量、高集成、微型化、自动化和并行处理的特点, 使得短时间内对病原体的综合检测、分析确诊成为可能^[2]。BA 的毒力主要与毒素和荚膜有关, 毒素和荚膜分别由 pXO1 和 pXO2 质粒调控^[3]。本试验以 pXO1 质粒上的基因为靶序列, 获取 BA 检测基因芯片上的探针, 为 BA 基因芯片的制备奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 BA 疫苗株 A16R 来自兰州生物制品研究所; *E. coli* DH5α 购自天根生物技术有限公司; 克隆载体 pMD19-T Simple 购自 TaKaRa 公司。

1.2 主要试剂 Taq DNA 聚合酶、10×反应缓冲液、dNTP 及 MgCl₂ 均购自 Promega 公司; Trans2K Plus DNA 标记物购自 Transgene 公司; 质粒提取和凝胶纯化试剂盒购自 Omega 公司; DNA 提取液购自中山大学达安基因股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计及合成 根据 Genbank 中公布的炭疽杆菌 pXO1 质粒基因序列(AF065404.1), 经 Blast 比较后找出 8 段特异的序列, 用 online primer3 引物设计软件分别针对每段特异序列设计 8 套引物, 一套为检测引物(表 1), 另一套为探针制备引物。引物均由北京奥科生物技术责任有限公司合成。

1.3.2 BA 疫苗株 A16R 基因组 DNA 的提取 将 BA 疫苗株 A16R 转接到肉汤培养基中, 30 ℃ 180 r/min 恒温摇床中培养 24 h, 取菌液 0.5 mL, 12 000 r/min 离心 5 min; 去上清液, 沉淀中加入 100 mL DNA 提取液, 充分混匀, 100 ℃ 恒温处理(10±1)min; 12 000 r/min 离心 5 min, 备用。

1.3.3 pXO1 特异性基因片段的扩增 取 BA 疫苗株 A16R 裂解上清 2 mL 为模板, 分别以 8 对检测引物为引物, 扩增 pXO1 的 8 个特异性片段。PCR 反应条件: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 59 ℃ 30 s, 72 ℃ 1 min, 共 35 个循环; 72 ℃ 5 min, 4 ℃。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.3.4 BA 重组质粒的构建 回收 PCR 产物, 连接至 pMD19-T Simple 载体, 转化感受态 *E. coli* DH5α。挑取单菌落培养后提取质粒, PCR 鉴定重组子, 并送北京奥科生物技术责任有限公司测序。

1.3.5 探针的制备 以鉴定正确的重组质粒 DNA 为模板, 对应的一对探针引物为引物进行探针的扩增(表 2)。反应条件: 95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s, 59 ℃ 30 s, 72 ℃ 30 s, 共 35 个循环; 72 ℃ 5 min, 4 ℃。琼脂糖凝胶电泳进行鉴定后将扩增产

^{*} 基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863 计划”)资助项目(2006AA020902)。 [△] 通讯作者, E-mail: dywang43@163.com。

物回收后送测序。

表 1 检测引物序列

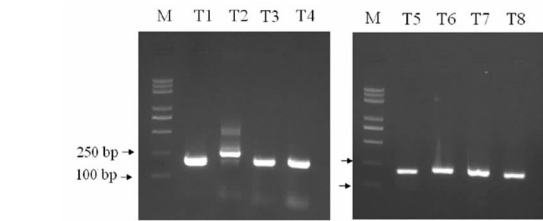
探针	编号	引物序列(5'-3')	理论 Tm 值(℃)	扩增长度(bp)
T1	Tw-11	CCG TCT TTA TCC CCC TTG TA	57.3	210
	Tw-12	GCT TTT CTG CTG CCT CTT TT	55.3	
T2	Tw-21	TTT GGC TCA ATA GGA ATC TGC	57.4	205
	Tw-22	TTT ATG CAC CGG AAG CTT TT	58.0	
T3	Tw-31	CCA TGG ACC TTC AAA AGG TGT	57.9	202
	Tw-32	TTC CGC TTC ATT TGT TCT CC	55.3	
T4	Tw-41	TCT AGC GCG AGT AAC GGA TT	57.3	209
	Tw-42	CAG GCC AAA ACT TTA ATG GTG	55.9	
T5	Tw-51	CGA AAA CAC CAA AAT CTA CCG	57.8	200
	Tw-52	TGG GGA AAA TTA CAT CTT GAA TG	58.8	
T6	Tw-61	TGA TCC TCT CCC TGA TGG AC	56.5	217
	Tw-62	TCG GAT TAT GTC ACG TCT GC	56.5	
T7	Tw-71	CAG AAA TGT TTT TGG CAG CA	57.3	212
	Tw-72	CTG CAA ATC AAA ATA CGT CCA A	58.4	
T8	Tw-81	TTC GGA ATG AAG GAA TGG AC	57.2	202
	Tw-82	TAC TGG CCA ATA TCC AAG TGC	57.9	

表 2 探针引物序列

探针	编号	引物序列(5'-3')	理论 Tm 值(℃)	扩增长度(bp)
T1	Tn-11	TTC CTC CCC TTT TAC TTC TA	51.4	99
	Tn-12	GAG AAT AAG AGA AAA GAT GAA G	47.9	
T3	Tn-31	ATA CGA AGT TAA ATT ACT CCC T	50.1	110
	Tn-32	TGG ATG ATT ATG CTG GAT ATC	52.6	
T4	Tn-41	GAT AAA ACA TTC TCT CCG GA	51.9	115
	Tn-42	GGG CAA GAA TTT GAT AAA GT	51.6	
T8	Tn-81	CTA CAG AAG ACA ATT AAG ACC	46.1	120
	Tn-82	CAA CAA TTA TAT GGG TGT ACT C	49.7	

2 结 果

2.1 特异性基因片段扩增产物的鉴定 PCR 扩增产物经琼脂凝胶电泳分析,可见与理论值大小基本一致的 8 条清晰可见的特异性条带,见图 1。



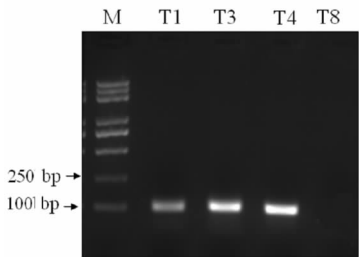
M: Trans2K Plus DNA 标记; T1~T8: pXO1 质粒上 8 条特异性片段。

图 1 pOX1 质粒特异性基因片段 PCR 扩增产物电泳图

2.2 重组质粒 pMD19-Tx 的鉴定 重组质粒 pMD19-Tx 基因测序结果与 Genbank 中公布的序列比对后显示, T1、T3、

T4、T8 号克隆序列完全正确, T5 有 1 个碱基的突变, T2、T6、T7 号测序不成功。

2.3 探针的制备 以成功构建的 pMD19-T1、pMD19-T3、pMD19-T4、pMD19-T8 质粒为模板, 设计合成的探针引物进行探针的扩增。结果显示, T1、T3、T4 均能够扩增出特异性的探针条带, T8 未能扩增出条带。T1、T3 和 T4 经基因测序显示序列完全正确, 见图 2。



M: Trans2K Plus DNA 标记; T1、T3、T4、T8: pXO1 质粒上 4 条特异性探针片段。

图 2 探针片段 PCR 扩增产物电泳图

3 讨 论

BA、蜡样芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、假真菌样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌按 Bergey 分类均属于杆菌科需氧芽孢杆菌属, 它们之间具有高度同源性, 因此, 在其染色体上设计引物进行检测常存在交叉反应^[4]。BA 具有 2 个致病相关的质粒 pXO1 和 pXO2, 虽然质粒的稳定性较染色体差, 易缺失, 但它们是 BA 与其他菌株的一个重要区别, 且如果 2 个质粒均缺失, 则该菌对人基本不存在危害^[5]。所以本研究选用 pXO2 质粒缺失的无荚膜弱毒株 A16R(中国使用的 BA 疫苗株) 为模板, 选取 pXO1 质粒为靶基因设计 8 个特异性序列进行 BA 基因检测芯片探针的扩增。

该研究从 BA pXO1 质粒中扩增了 8 个特异性片段, 连接入 pMD19-T Simple 载体, 经过基因测序确定成功构建了 4 个重组质粒。以成功构建的 4 个重组质粒为模板, 成功扩增了 3 个探针片段, 为后续的 BA 基因芯片的制备奠定了基础。

参考文献

[1] 王惠萱, 杨光辉, 陈忠明, 等. 现代医院检验科实用管理与技术 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2006: 792-793.

[2] 陈志, 曾照芳. 基因芯片技术的最新进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(3): 249-251.

[3] 丁玉仙. 炭疽芽孢杆菌的研究进展 [J]. 吉林医学, 2010, 31(8): 1086-1087.

[4] Qi Y, Patra G, Liang X, et al. Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of Bacillus anthracis [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(8): 3720-3727.

[5] Shahid S, Park JH, Lee HT, et al. Comparative proteome analysis of Bacillus anthracis with pXO1 plasmid content [J]. J Microbiol, 2010, 48(6): 771-777.

(收稿日期: 2011-02-11)