

抑制消减杂交技术分析牙龈卟啉单胞菌基因差异初探

林莉, 潘亚萍[△], 李琛, 赵戩

(中国医科大学附属口腔医院口腔内科, 辽宁 沈阳 110002)

[摘要] 目的: 对比牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*, *P.gingivalis*)低毒力株标准参考菌 ATCC 33277 与高毒力株 W83 之间的差异核苷酸序列, 查找高毒力株 W83 缺失基因。方法: 抑制消减杂交技术对比牙龈卟啉单胞菌低毒力株标准参考菌 ATCC 33277 与高毒力株 W83 的基因差异。以低毒力株 ATCC 33277 为 tester, 高毒力株 W83 株为 driver, 将提取的基因组 DNA 用内切酶 Rsa I 酶切, 连接特殊设计的 adaptor 进行两次消减杂交和 PCR 扩增, 并与 TA 克隆载体连接, 转化到 JM109 中, 建立差异消减文库, 经 PCR 筛选鉴定阳性克隆, 进而对部分片段进行测序和同源分析。结果: 经 SSH 筛选鉴定得到 62 个片段大小为 125~632 bp 的阳性克隆基因片段。结论: 这些差异基因为研究牙周病的发生和发展提供重要线索。

[关键词] 牙龈卟啉单胞菌; 抑制性消减杂交; 牙周病; 基因差异

[中图分类号] R781.42 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-4646(2007)06-0676-04

Studying the genetic differences of *Porphyromonas gingivalis* by suppression subtractive hybridization

LIN Li, PAN Ya-ping[△], LI Chen, ZHAO Jian

(Department of Endodontics, The Affiliated Stomatological Hospital, China Medical University, Shenyang, 110002, China)

[Abstract] **Objective:** To identify the differential genes in *Porphyromonas gingivalis* minimally toxic strain ATCC 33277 and highly toxic strain W83. **Methods:** *Porphyromonas gingivalis* minimally toxic strain ATCC 33277 (tester) and highly toxic strain W83 (driver) were compared with each other by using suppression subtractive hybridization (SSH). The chromosomal DNAs were purified from *P.gingivalis* ATCC 33277 and *P.gingivalis* W83, and digested by restriction enzyme Rsa I. The tester DNA samples were separated and ligated with adaptor 1 and adaptor 2R. The ligation efficiency was performed to verify that at least 25% of tester DNA fragments had adaptors on both ends. Two subtractive hybridization and PCR profile were performed. Tester-specific DNAs were also selectively amplified. Then the subtraction efficiency analysis was performed. The mixture of subtracted DNA fragments were ligated with pMD-18T vector and transformed to competent cells *E.coli* JM109. The differential subtraction library was established. The positive clones were identified by PCR and then sequenced, and searched homologically. **Results:** The products were obtained through subtractive hybridization and PCR amplification twice. The experimental PCR subtraction products with some distinct bands were different from unsubtraction products. The distinct bands were rich in *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277, while absent from *P.gingivalis* highly toxic strain W83. Subtractive library which had high subtractive efficiency was successfully set up and 119 positive clones were screened by SSH. The fragments from 125 bp to 632 bp were rich in *Porphyromonas gingivalis* minimally toxic strain ATCC 33277, while absent from *P.gingivalis* W83. **Conclusion:** These genes may provide an important clue for studying the mechanism of occurrence and development of periodontal disease.

[Key words] *Porphyromonas gingivalis*; suppression subtractive hybridization; periodontal disease; genetic difference

随着微生物基因组序列的大量测定, 通过比较基因组差异分析致病微生物的分子致病机制已成为新近微生物基因组研究的一大热点^[1,2]。目前用于微生物基因组差异比较的方法主要有消减杂交和代表性差异分析技术, 但都存在假阳性高、操作繁琐、特异性低等缺点。新近发展的抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH) 技术克服了上述缺点^[3,4], 现已用于几株致病幽门螺杆菌之间^[4]、大肠杆菌与伤寒沙门菌之间^[5]基因组差异

的比较, 并筛选得到一些与致病和遗传分化相关的基因片段。因此, 本研究利用 SSH 技术分析致病与非致病牙龈卟啉单胞菌基因组之间的差异, 为牙龈卟啉单胞菌致病相关基因的筛选和中国致病微生物基因资源的开发提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 菌株与试剂

牙龈卟啉单胞菌低毒力株 ATCC 33277 由北京口腔医院微生物研究所提供, 高毒力株 W83 由美国佛罗里达大学牙科学院口腔生物研究所 Lamont RJ 教授惠赠。菌株于 BHI 培养基中厌氧培养 5 d 备用。宿主菌 *E.coli* JM 109, pGEMT-18 Vector 和 PCR

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30371542);

辽宁省自然科学基金资助项目(20052117)

[作者简介] 林莉(1970-), 女, 副教授, 博士。

△Corresponding Author's E-mail: yap_nancy@yahoo.com

产物纯化试剂盒购自 TakaRa 公司. 基因组 DNA 提取试剂盒购自 Qiagen 公司, SSH 所用试剂为 Clontech 公司的 PCR select bacterial genomic subtraction kit。其余常规试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 抑制消减杂交

采用 Clontech 公司的 PCR select bacterial genomic subtraction kit, 原理详见文献^[3,4]。

1.2.1 酶切反应: ATCC 33277 标准菌株 (tester) 及 W83 菌株 (driver) 基因组 DNA 应用 Rsa I 内切酶 37℃ 消化过夜后 -20℃ 保存。

1.2.2 接头连接: 酶切后与 2 种接头 Adaptor1 和 2R 连接, 16℃ 反应过夜。接头连接效率分析: 特异性引物序列: *P. gingivalis* 特异性引物 P1: 5'-TGTA-GATGACTGATGCTGAAAACC-3'; P2: 5'-ACGTCATC CACACCTTCCTC-3'。PCR 循环条件为 72℃ 2 min 延伸接头, 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 45 s, 56℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 进行 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并测灰度值。

1.2.3 两轮消减杂交: 用过量的酶切后 driver DNA 样品与上述两份连有接头的 tester DNA 样品进行第 1 次消减杂交, 分别得到 4 种产物。然后混合上述两份杂交样品, 同时加入新的变性 driver DNA 进行第二轮消减杂交。

第一轮 PCR 循环条件: 75℃ 1 min, 加 Taq 酶, 72℃ 5 min 延伸接头, 94℃ 变性 30 s, 66℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 进行 30 个循环。第二轮 PCR 循环条件: 75℃ 1 min, 加 Taq 酶, 72℃ 5 min 延伸接头, 94℃ 变性 30 s, 68℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 进行 17 个循环, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测两次 PCR 产物, -20℃ 保存 PCR 产物。

1.2.4 消减效率分析: 特异性引物序列同上。PCR 循环条件: 75℃ 1 min, 加 Taq 酶, 72℃ 5 min 延伸接头, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 68℃ 延伸 2 min, 分别进行 18 个、21 个、24 个、27 个循环。每个循环分别取出 5 μl, 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 并测灰度值。

应用于 SSH 的寡核苷酸 (adaptor 和 primer) 序列如下: Adaptor1: 5'-CTAATACGACTCAC-TATAGGGCTCGAGCGGCCCGGGCAGGT-3'; 3'-GCCCGTCCA-5'; Adaptor2R: 5'-CTAATACGACTCAC TATAGGGCAGCGTGGTCGGGCCGAGGT-3'; 3'-GCCGCTCCA-5'。PCR primer1: 5'-CTAATACGACTCAC TATAGGGC-3'。nested primer 1: 5'-TCGAGCGGC-

CGCCCCGGGCAGGT-3'。nested primer 2R: 5'-ACCG TGGTCGGGCCGAGGT-3'。

1.3 载体连接及转化

二次 PCR 产物经凝胶纯化后与 pMD-18T 载体连接并转化至大肠杆菌 JM109 感受态细胞中, 通过 X-Gal、IPTG、氨苄青霉素筛选阳性克隆, 建立消减文库。挑白色克隆, 以 nested primer 1 和 nested primer 2R 为引物行菌落 PCR 扩增以鉴定阳性克隆。

1.4 斑点杂交

分别以 Rsa I 消化的 *P.gingivalis* ATCC 33277 株 DNA 和 W83 DNA 经地高辛标记的探针, 将经颜色和氨苄青霉素抗性筛选的阳性克隆扩增的 PCR 片段转移至尼龙膜上, 与之杂交, 洗膜后用显色剂显色, 验证这些阳性克隆扩增的 PCR 片段是否确实来自 *P.gingivalis* ATCC 33277 或 W83 的菌体。

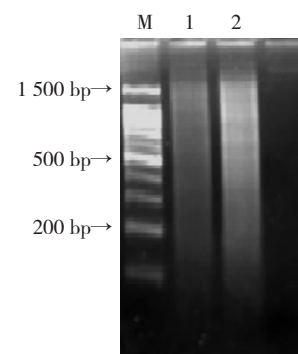
1.5 测序和同源性比较

将上述菌落 PCR 已鉴定阳性克隆转入 SOC 液体培养基 2.5 ml 中, 37℃ 摇菌 200 转/min 过夜, 取出 1 ml 送至 Invitrogen 生物公司测序, 同时菌液加 15% 的无菌甘油, 立即放入 -80℃ 保存菌种, 将所测序列通过 Internet 在 GenBank 中进行同源性比较分析。

2 结果

2.1 酶切

Rsa I 酶切后的 ATCC 33277 株基因组 DNA (tester) 和 W83 基因组 DNA 电泳图片显示呈现 smear 状条带, 范围在 0.1~2 kb 之间, 符合本实验要求, 如图 1 所示。



M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1: W83DNA 酶切后;

2: ATCC33277DNA 酶切后

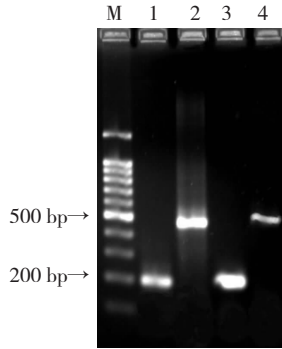
图 1 Rsa I 酶切后的电泳结果

Fig.1 Rsa I -digested genomic DNA

2.2 SSH 结果

2.2.1 接头连接效率检测: 如图 2 所示, 在 2、4 泳道扩增出大小在 400~500 bp 的片段, 经 Blast 分析, 输

入 *P.gingivalis* 特异性引物上游, 剪贴一段 *P.gingivalis* 基因序列, 通过 NEB Cutter 查找离上游引物最近的 Rsa I 酶切位点, 本实验的位点为 396 bp 和 430 bp 处, 证明出现的条带为目的带。比较不同泳带产物的量, 按照说明书上方法检查连接效率达 25 % 以上。

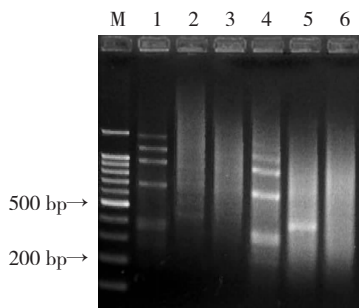


M: 100bp DNA Ladder Marker; 1: 以连接 adaptor 1 的 tester 为模板, 用特异的 Pg 引物扩增的产物; 2: 以连接 adaptor 1 的 tester 为模板, 用特异的 Pg 上游引物和 PCR primer 1 扩增的产物; 3: 以连接 adaptor 2R 的 tester 为模板用特异的 Pg 引物扩增的产物; 4: 以连接 adaptor 2R 的 tester 为模板, 用特异的 Pg 上游引物和 PCR primer 1 扩增的产物

图 2 接头连接效率检测

Fig.2 Results of ligation efficiency analysis

2.2.2 消减及 PCR 结果: 上述 Rsa I 酶切的 tester 分别与 adaptor 1 和 adaptor 2R 连接产物与变性 driver 进行 2 轮消减和 2 轮 PCR 得到消减 PCR 混合物。如图 3 所示, 消减之前的 tester PCR 产物和消

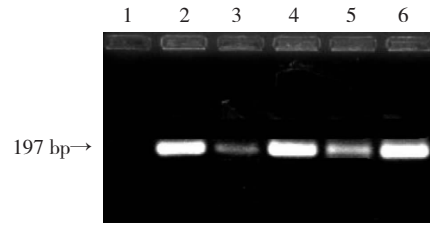


M: 100 bp DNA Ladder Marker; 1~3: 第一次 PCR 产物; 4~6: 第二次 PCR 产物; 1, 4: 泳道为消减对照 PCR 产物; 2, 5: 泳道为 tester PCR 产物; 3, 6 泳道为未消减对照 PCR 产物

图 3 消减后的 PCR 产物电泳图

Fig.3 The PCR products of subtracted

减后的 PCR 产物电泳图谱带型明显不同。后者的差异强化带代表 tester 独有而 driver 缺如的片段。按照说明书上方法进行消减效率分析, 结果见图 4。比较不同泳带产物的量, 按照说明书上方法检查消减效率符合要求。



以消减的二次 PCR 产物(1,3,5 泳道)和未消减对照 DNA(2, 4,6 泳道)为模板, 用特异的 Pg 引物扩增, 1,2 泳道为 18 个循环; 3,4 泳道为 21 个循环; 5,6 泳道为 24 个循环的产物

图 4 消减效率分析电泳图

Fig.4 Analysis of subtraction efficiency using *P. gingivalis* primers

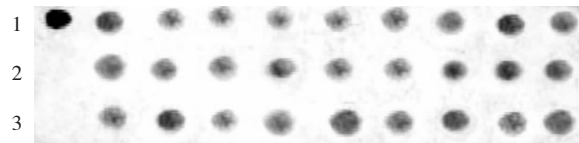
2.3 测序和同源性比较结果

将所得序列在 Gen Bank 中用 BLAST 进行同源性比较, 经分析测序得到 62 个大小在 125~632 bp 之间的不同片段, 除一个片段 Blast 结果与 ATCC 33277 同源, 其它 61 个片段在 GenBank 中皆无同源序列, 其功能有待进一步分析。

2.4 斑点杂交结果

分别以 Rsa I 消化的 *P.gingivalis* ATCC 33277 DNA 和 W83 株 DNA 经地高辛标记的探针, 将经颜色和氨苄青霉素抗性筛选的阳性克隆扩增的 PCR 片段转移至尼龙膜上, 与之杂交, 结果发现 62 个 PCR 片段皆与 ATCC33277 探针产生杂交信号, 与 W83 探针没有杂交信号, 图 5 显示的是其中 27 个 PCR 片段与 ATCC33277 探针的杂交结果。

1	A24	A25	A26	A29	A32	A35	A33	A71	A72
2	A74	A75	A76	A77	A78	A79	A81	A82	A83
3	A84	A86	A88	A52	A53	A54	A60	A61	A62



1: 以 ATCC 33277 基因组 DNA 为阳性对照; 2: 以 W83 特有片段(反向实验得出)PCR 产物为阴性对照; 3: 以 PBS 液为空白对照

图 5 27 个 PCR 片段与 ATCC 33277 探针的斑点杂交结果

3 讨论

消减杂交技术应用最多, 也最有意义的就是鉴定细菌等原核生物的致病基因岛, 筛选出只存在于毒力株而不存在于非毒力株的短序列, 然后标记这些序列探针, 在一系列代表性菌株中检测其特异性。SSH 是建立在抑制性 PCR 基础上的一种高效

消减杂交技术,最早应用于真核生物 mRNA 差异表达的研究中。因其具有操作简单且筛选效率高等优点被 AKOPYANTS 等^[4]改良,1998 年应用于原核生物基因组差异比较的研究中。AKOPYANTS 等首次将该方法进行改良并用于细菌基因组比较分析,为病原体中未知的毒力基因(致病岛)筛选和微生物基因组差异、分子进化的研究提供了重要技术手段。现已用于几株致病幽门螺杆菌之间^[4]、大肠杆菌与伤寒沙门菌^[5]之间基因组差异的比较,并筛选得到一些与致病和遗传分化相关的基因片段。

牙龈卟啉单胞菌能够产生多种与牙周炎破坏有关的侵袭性因子,如胶原酶、蛋白酶、透明质酸酶、超氧化物歧化酶、碱性磷酸酶、纤毛蛋白酶等。PCR 方法检测发现该菌几乎存在于所有年龄组,与慢性牙周炎、侵袭性牙周炎、牙周脓肿、牙髓感染等有关,是牙周病、尤其是慢性牙周炎病变区或活动部位最主要的优势菌,而健康龈沟内很少,它的存在与牙周炎治疗之后复发和病情加重有关^[6]。本实验选择 ATCC 33277 株与 W83 株分别作为低毒力株与高毒力株的代表来进行全基因组基因序列的对比,一方面是因为之前一些学者已经对比过它们的某些基因,另一方面 W83 株的基因组序列已经被成功测定,一些已知的毒力因子得到了补充和证实^[7]。本实验中 Rsa I 酶切后的 ATCC 33277 基因组 DNA (tester) 和 W83 株基因组 DNA 电泳图片显示呈现 smear 状条带,范围在 0.1~2 kb 之间,符合实验的要求,显示内切酶 Rsa I 适用于本实验所用菌株;消减之前的 tester PCR 产物和消减后的 PCR 产物电泳图谱带型明显不同,消减后的差异强化带暗示低毒力株 ATCC 33277 与高毒力株 W83 之间的确存在着基因差异,这些差异基因有可能与致病性的改变密切相关;本研究中良好的接头连接效率和消减效率也显示了 SSH 技术在牙龈卟啉单胞菌研究中的可行性和有效性。本研究得到的消减后的 PCR 产物通过载体连接和转化并进行测序分析后得到 62 个基因片段,它们是毒力株 W83 所缺乏的基因,除

一个片段 Blast 结果与 ATCC 33277 同源,其他 61 个片段在 GenBank 中皆无同源序列,可能是 ATCC 33277 的全基因组序列并没有被成功测定,GenBank 中没有相关信息,这些基因其功能需要进一步分析。

某一菌株所具有的而另一菌株缺乏(或不相同)的基因可能决定某些重要的遗传特征,如决定了细菌的表面结构、致病性、药物抗性,以及不同的限制和修饰系统等。因此分离、比较及鉴定这些差异表达的基因,可为揭示生命活动规律、探索疾病的发生及宿主防御机制等提供强有力的证据。本研究所得的牙龈卟啉单胞菌高毒力株 W83 缺失的基因为研究牙周病的发生和发展提供了重要的线索。

参考文献:

- [1] ALM RA, LING LS, MIR DT, et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori* [J]. *Nature*, 1999, 397(6715): 176-180.
- [2] SUBRAMANIAN G, KOONIN EV, ARAVIND L. Comparative genome analysis of the pathogenic spirochetes *Borrelia burgdorferi* and *Treponema pallidum* [J]. *Infect Immun*, 2000, 68(3): 1633-1648.
- [3] DIATCHENKO L, LAU YF, CAMPBELL AP, et al. Suppression subtraction hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue specific cDNA probes and libraries [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 6025-6030.
- [4] AKOPYANTS NS, FRADKOV A, DIATCHENKO L, et al. PCR-based subtractive hybridization and differences in gene content among strains of *Helicobacter pylori* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 13108-13113.
- [5] BOGUSH ML, VELIKOVORSKAYA TV, LEBEDEV YB, et al. Identification of differences between *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* genomes by suppressive subtractive hybridization [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 262(3): 721-729.
- [6] 曹采芳. 牙周病学[M]. 2版, 北京: 人民卫生出版社, 2000: 50-51.
- [7] KAREN E NELSON, ROBERT D FLEISCHMANN, ROBERT T DEBOY, et al. complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *porphyromonas gingivalis* strain W83 [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(18): 5591-5601.

[收稿日期] 2007-04-19

(编辑 裘孝琦)