

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0079-82

沙门氏菌 rDNA ISR 序列测定及特征分析^{*}

周 惠, 杜延平, 屈良鹄

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 以细菌 rDNA ISR 通用引物对鼠伤寒等 8 种沙门氏菌进行了 PCR 分析, 表明在沙门氏菌属的不同菌株中都存在 1 个比大肠杆菌的 L-ISR 长几十个碱基对的 L-ISR。进一步测定和分析鼠伤寒、纽波特和田纳西 3 种沙门氏菌 L-ISR 的全序列, 揭示出不同血清型的沙门氏菌具有相似的 tRNA 基因间隔区和特征性核苷酸序列。这些特征序列可以作为沙门氏菌属的分子标志, 用于沙门氏菌的分子检验和系统学鉴定。

关键词: 沙门氏菌, rDNA, 核苷酸序列, ISR

分类号: Q 751 **文献标识码:** A

沙门氏菌是引起食物中毒的常见病原菌。沙门氏菌属 (*Salmonella*) 的菌种繁多, 迄今已发现 2 000 余种。对沙门氏菌的分类和鉴定主要是根据沙门氏菌的形态、生理和生化特征以及血清反应来检验定型。在不同的培养条件下沙门氏菌的形态和抗原结构有可能发生变异, 如由于菌鞭毛的脱落而失去某些抗原。同时, 常规的沙门氏菌检验方法过程复杂, 并存在与其他相近细菌发生交叉反应的可能性, 从而影响对沙门氏菌的鉴别。

采用分子生物学方法对沙门氏菌基因序列进行分析, 为沙门氏菌的分类和鉴定提供了新的手段。大分子 rRNA 及其基因 (rDNA) 是研究细菌系统学的一个通用的分子指标, 同时也是细菌鉴别的良好目标基因^[1]。目前, 国际上已开展对各类沙门氏菌 16S rRNA 序列的比较分析, 并在以 16S rRNA 序列为基础的 rDNA 探针方面取得进展^[2]。但是, 由于细菌 16S rRNA 十分保守, 可供选择的沙门氏菌专一性序列不多。因此, 目前研究的重点已移向 rDNA 16S—23S 基因间隔区 (ISR)。对肠炎沙门氏菌 (*S. enteritidis*) 大小 2 种 rDNA ISR 的序列测定和分析, 发现在 2 个 tRNA 基因之间存在 1 个高变区; 并提出该区有可能包含沙门氏菌的特征序列^[3]。为了验证这一推测, 进一步揭示沙门氏菌属的分子特征, 对 3 种分属不同抗原组的常见沙门氏菌 rDNA ISR 区进行了序列测定和分析。

1 材料与方法

1.1 沙门氏菌株

鼠伤寒沙门氏菌 *S. typhimurium*, 纽波特沙门氏菌 *S. newport*, 田纳西沙门氏菌

^{*} 基金项目: 广东省自然科学基金 (960053); 国家杰出青年基金 (39525007)

收稿日期: 1998-04-25 第一作者简介: 周惠, 女, 45 岁, 讲师

S. tennessee, 鸭沙门氏菌 *S. anatum*, 甲型副伤寒沙门氏菌 *S. paratyphi* A, 乙型副伤寒沙门氏菌 *S. paratyphi* B, 丙型副伤寒沙门氏菌 *S. paratyphi* C, 伤寒沙门氏菌 *S. typhi* 等分别从广州市卫生防疫站和北京卫药品生物制品检定所购得。

1.2 细菌的培养及细菌 DNA 的 PCR 扩增

将细菌接种在普通细菌培养基(2YT)平板上,于 37℃培养过夜。采用细菌菌落直接进行 PCR 扩增,即取一单菌落溶于 10 μL $\rho=1\%$ SDS 溶液中,充分震荡摇匀,用 TE 溶液稀释至 500 μL,取 2 μL 做 PCR 扩增。PCR 引物的序列及在沙门氏菌 rDNA 中位置详见文[3]。PCR 扩增在 DNA Thermal Cycler 480(PE 公司)上进行。

1.3 分子克隆和 DNA 序列测定

采用凝胶分离 PCR 产物的方法^[3]对沙门氏菌中不同大小的 rDNA ISR 进行分离,以 DPS 系统回收纯化。以 Klenow DNA 聚合酶对 PCR 产物进行修饰补平,然后克隆到 pTZ19 的 *Sma* I 位点上。采用 Pharmacia DNA 测序试剂盒和 35S- α -dATP 标记方式,直接测定重组质粒的 DNA 序列。每种沙门氏菌至少测定 2 个不同的克隆子。

1.4 核酸序列的计算机分析

以 Blast 程序进行同源序列分析。大肠杆菌 rDNA 序列从 Genbank 中获得,以 PC gene 6.0 软件包进行序列的排列和比较分析。

2 结果与讨论

2.1 单菌落直接 PCR 扩增方法

采用单菌落直接 PCR 扩增方法,减少了细菌 DNA 提取过程中可能带来的其他细菌(尤其是大肠杆菌)的污染,并且有快速、简便、重复性好等优点。同时,还采用 DNA 酶预处理 PCR 反应溶液,可以有效地去除 Taq 酶中可能受到的大肠杆菌 DNA 的污染。

2.2 沙门氏菌 rDNA ISR 的 PCR 分析

选择 *S. typhimurium*, *S. newport*, *S. tennessee*, *S. anatum*, *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *S. paratyphi* C, *S. typhi* 等 8 种沙门氏菌进行研究,分别代表 A, B, C, D 和 E 5 组沙门氏菌。以细菌 ISR 通用引物 P1 和 P2 对这些沙门氏菌进行了 PCR 扩增,结果见图 1。这 8 种沙门氏菌中,都可以专一性地扩增出 2 条相对分子质量不同的 PCR 产物,分别对应于沙门氏菌中大小不同的 2 种 rDNA ISR 即 L-ISR 和 S-ISR。这一结果与对肠炎等 3 种沙门氏菌的 PCR 分析^[3]完全一致,它表明在沙门氏菌属的不同菌株中

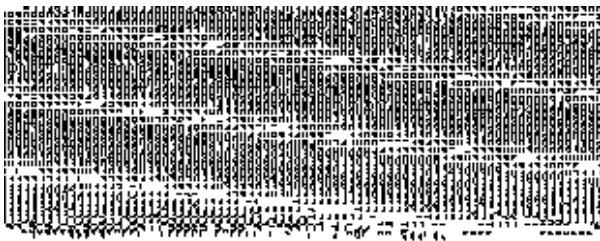


图 1 8 种沙门氏菌的 PCR 分析结果

Fig. 1 The results of PCR from eight *Salmonella* species

- 0 大肠杆菌; 1 伤寒沙门氏菌; 2 丙型副伤寒沙门氏菌;
- 3 乙型副伤寒沙门氏菌; 4 甲型副伤寒沙门氏菌;
- 5 鸭沙门氏菌; 6 纽波特沙门氏菌; 7 田纳西沙门氏菌;
- 8 鼠伤寒沙门氏菌; M 2 kb marker

都存在 1 个长度相近的 L-ISR。虽然在大肠杆菌中也存在大小不同的 2 种 rDNA ISR,但是从图 2 中可以清楚地看到,沙门氏菌的 L-ISR 比大肠杆菌的 L-ISR 长几十个碱基对。

2.3 鼠伤寒等 3 种沙门氏菌 rDNA ISR 序列测定及分析

将鼠伤寒、纽波特和田纳西 3 种沙门氏菌的 PCR 产物以 φ 为 1% 琼脂糖凝胶分离. 割取 L-ISR 的 PCR 带, 进行分子克隆和 DNA 序列测定. 3 种沙门氏菌的 L-ISR 已被全部测出 (图 2), 田纳西沙门氏菌的长度为 515 碱基对, 纽波特沙门氏菌为 513 碱基对, 伤寒沙门氏菌为 503 碱基对. 每个 L-ISR 中都包含异亮氨酸和丙氨酸 tRNA 基因.

将 3 种沙门氏菌序列与肠炎沙门氏菌序列^[3] 以及大肠杆菌 rDNA 操纵子 *mH* 的 ISR 序列进行比较分析 (图 2). 可看到 4 种沙门氏菌的 L-ISR 的长度十分接近, 但是与大肠杆菌的 L-ISR 却有明显的差别. 这一长度差别主要发生在 2 个 tRNA 基因的间隔区 (简称为 D

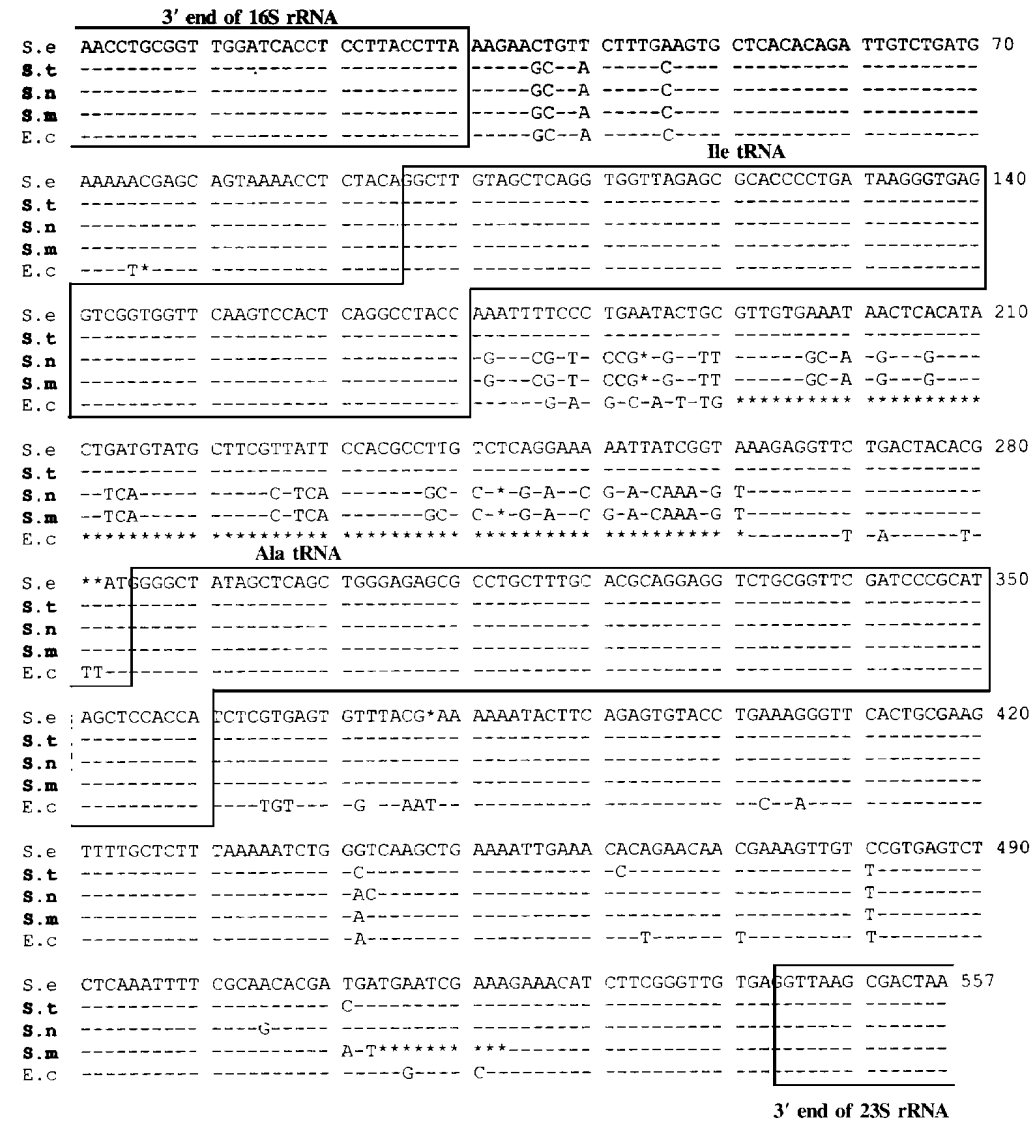


图 2 4 种沙门氏菌 rDNA ISR 全序列排列比较

Fig. 2 Sequence alignment of rDNA ISRs from four *Salmonella* species and *E. coli*
S e 肠炎沙门氏菌; S t 田纳西沙门氏菌; S n 纽波特沙门氏菌; S m 鼠伤寒沙门氏菌; E c 大肠杆菌
相同的核苷酸以短划代表, 星号表示缺失

区)。在这一区域中, 4 种沙门氏菌的 L-ISR 相对大肠杆菌 *mmH* 的 ISR 有 69 或 71 碱基对的插入。并且, 插入区的上下游序列还伴有较多的核苷酸突变。而在 rDNA ISR 其它区域, 4 种沙门氏菌与大肠杆菌的序列却有很高的序列相似性(90%以上)。因此, D 区是沙门氏菌区别于大肠杆菌的主要特征区域。对 D 区的分析可以进一步揭示沙门氏菌之间的差异, 从图 2 中还可以看到, 虽然 4 种沙门氏菌在 D 区的序列长度几乎一致, 但仍可以分成两种序列类型, 即鼠伤寒和纽波特沙门氏菌为一种类型, 而田纳西和肠炎沙门氏菌为另一种类型。对甲型副伤寒等沙门氏菌的 rDNA ISR 的部分序列分析也得到相同的结论(待发表)。通过 Internet 联网分析 Genbank, 在大肠杆菌 7 个 rDNA 操纵子序列以及其它已测出的细菌序列中, 没有发现沙门氏菌 D 区类似序列。因此, 这些序列有可能是沙门氏菌的特征性核苷酸序列。

虽然沙门氏菌的种类繁多, 但是已有 DNA 杂交等实验表明, 大部分沙门氏菌在遗传基础上是密切相关的一种细菌^[4]。通过对鼠伤寒等沙门氏菌 rDNA ISR 序列分析, 揭示出不同血清型的沙门氏菌具有相似的 D 区长度和两种特征性核苷酸序列。这些序列明显地区别于大肠杆菌和其它细菌, 可以作为沙门氏菌属的分子标志。由于这一序列长达 100 多个核苷酸, 因此在沙门氏菌的分子检验和系统学鉴定中将有重要的应用价值。

参考文献:

- [1] 屈良鹄. 微生物系统发育的分子遗传学研究概述. 见: 微生物遗传学综述文集. 上海: 复旦大学出版社. 1993. 65~73
- [2] LIN C K, TSEN H Y. Use of two 16S DNA targeted oligonucleotides as PCR primers for the specific detection of *Salmonella* in food J Appl Bacteriol, 1996. 80 (6): 659~666
- [3] 周惠, 屈良鹄, 陈月琴, 等. 肠炎沙门氏菌两种 rDNA 16S—23S 基因间隔区序列分析. 中山大学学报(自然科学版), 1997, 36 (5): 74~77
- [4] LAGATOLLA C, DOIZANI L, TONIN E, et al. PCR ribotyping for characterizing *Salmonella* isolates of different serotypes J Clin Microbiol, 1996. 34 (10): 2440~2443

Sequencing and Characteristics Analysis of rDNA ISR from *Salmonella typhimurium*, *S. newport* and *S. tennessee*

ZHOU Hui^{*}, DU Yanpin, QU Lianghu

Abstract: The rDNA ISR of eight *Salmonella* species were analyzed by using PCR amplification, and difference in sequence length of the L-ISR between *Salmonella* and *E. coli* was revealed. rDNA L-ISR sequences were completely determined from *S. typhimurium*, *S. newport* and *S. tennessee*. It showed that, by sequence comparison, various serotypes of *Salmonella* displayed two kinds of characteristic sequences in a divergent region which was totally absent in *E. coli*, resulting in the length difference of L-ISR between *Salmonella* and *E. coli*. These characteristic sequences will represent the molecular markers of *Salmonella* and play an important role in *Salmonella* detection and identification.

Keywords: *Salmonella*, rDNA, sequence, ISR

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China