

# 肠炎沙门氏菌 2种 rDNA 16 s~ 23 s 基因间隔区序列分析<sup>\*</sup>

周 惠 屈良鹄 陈月琴 陆勇军 施苏华

(中山大学生命科学学院 生物工程研究中心, 广州 510275)

**摘 要** 采用凝胶分离 PCR产物的方法,对肠炎沙门氏菌中 2种 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区进行克隆和序列分析. 肠炎沙门氏菌小 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区,全长 354个碱基对,包含 1个谷氨酸 tRNA基因. 大 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区,全长 518个碱基对,其中包含异亮氨酸和丙氨酸 2个 tRNA基因. 它们分别与大肠杆菌的 2个 rRNA操纵子 *rrnE*和 *rrnH*有较高的序列相似性. 肠炎沙门氏菌大 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区比大肠杆菌 rDNA对应的区域长 71个碱基对,这一插入片段很可能是沙门氏菌属 rDNA的一个特征序列.

**关键词** 肠炎沙门氏菌, rDNA, 核酸序列, spacer

**分类号** Q 751

沙门氏菌为革兰氏阴性杆菌,许多沙门氏菌都有致病性,能引起人和动物的肠道病变或全身感染,属于卫生检疫的病原菌. 目前,以基因序列为基础的细菌分子鉴定和分类方法已得到广泛的应用,其中最常用的分子指标是大分子 rRNA即 16 s和 23 s rRNA及其基因<sup>[1]</sup>. 根据限制性内切酶分析报道,在沙门氏菌中有 7个 rRNA操纵子<sup>[2]</sup>,每个操纵子包括 16 s, 23 s和 5 s 3种 rRNA基因. 一些沙门氏菌株的 16 s rRNA全序列和 23 s rRNA的部分序列已陆续被测出. 分析的结果表明:沙门氏菌 16 s rRNA与大肠杆菌的 16 s rRNA序列相似性达 97%以上,因此, rRNA编码区不是一个良好的鉴定沙门氏菌的分子指标.

在细菌 rRNA操纵子中,3种 rRNA基因之间的间隔序列 (Intergenic Spacer Region简称 ISR) 是一个特殊的区域,其中包含一些其它的基因如 tRNA基因和 rRNA转录后的加工信号;同时,相对 rRNA编码区而言,间隔区的序列具有较高的突变速率,因此可以作为精细的分子指标,用于一些亲缘关系十分密切的细菌的分类、鉴定和系统学研究<sup>[3]</sup>. 大肠杆菌中 7个 rRNA操纵子中的基因间隔区都已被测序,但是在沙门氏菌属中尚未有这方面的报道.

本文采用凝胶分离 PCR产物的方法,对肠炎沙门氏菌中 2种 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区进行克隆和序列分析,同时,对所发现的沙门氏菌 rRNA操纵子中一个特有的 DN A序列进行了讨论.

<sup>\*</sup> 国家杰出青年基金 (39525007) 和广东省自然科学基金 (960053) 资助项目

收稿日期: 1997-06-24 周 惠,女,44岁,讲师

## 1 材料与方法

### 1.1 沙门氏菌株和试剂

肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*, 鸭沙门氏菌 *S. anatum* 和纽波特沙门氏菌 *S. newport* 均从广州市卫生防疫站致病菌室购得. 用于从凝胶中回收 DNA片段的 DNA纯化系统 (DPS) 为本室自制.  $\gamma$ - $^{32}$ P ATP (5 000 Ci/mmol) 购于北京亚辉公司.

### 1.2 细菌 DNA的制备

将沙门氏菌株接种在普通细菌培养基 (2YT) 平板上. 于 37℃培养过夜. 细菌总 DNA提取方法参照文献 [4].

### 1.3 PCR扩增, 分子克隆和 DNA序列测定

用于 PCR扩增的 DNA引物及其序列为: P1 (5'-GGGGTG AAGTCG TAACAA GGTA 3'), P2 (5'-CCT CTG ACT GCC AGG GCA TCC 3'). 该引物经  $^{32}$ P标记后, 也用做原位杂交的探针. PCR扩增, 分子克隆均按文 [5] 操作. PCR扩增在 DNA Thermal Cycler 480 (PE公司) 上进行. 用于分子克隆的质粒载体为 pTZ19. 采用 Pharmacia DNA测序试剂盒直接测定重组质粒的 DNA序列.

### 1.4 核酸序列的计算机比较分析

大肠杆菌 rDNA序列从 Genbank中获得, 以 PC gene 6.0软件包进行序列的比较.

## 2 结果与讨论

### 2.1 肠炎沙门氏菌 2种 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区的克隆

根据细菌 16 s和 23 s rRNA的保守序列, 合成了 2个细菌 rDNA通用 PCR引物 P1和 P2. 它们可用来专一性扩增细菌 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区 (见图 1). 以 P1和 P2引物分别对肠炎、鸭、纽波特 3种沙门氏菌和大肠杆菌总 DNA进行 PCR扩增, 结果见图 2. 在大肠杆菌样品中出现 2个分子量不同的 PCR产物, 分别对应大肠杆菌中存在的大小 2种 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区 (即 L-ISR和 S-ISR). 从图 2可以看到: 在沙门氏菌中也存在大小 2种 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区. 而且, 图 2还表明, 在 3种沙门氏菌中的 L-ISR比大肠杆菌对应的 DNA片段还要多几十个碱基对.

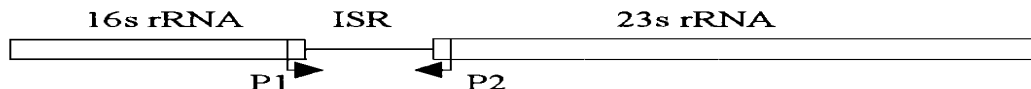


图 1 用 P1和 P2 DNA引物 PCR扩增细菌 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区示意图

Fig. 1 Diagram of PCR amplification of bacteria rDNA 16 s~ 23 s spacer by using P1 and P2 DNA primer

将肠炎沙门氏菌的 2种 PCR产物从凝胶中分别切出, 以 DPS系统回收、纯化, 并连接到 pTZ19的 *Sma*I 位点上, 通过原位杂交和限制性内切酶等方法检查转化子, 获得 PSA-1和 PSA-2两种重组质粒, 它们分别包含肠炎沙门氏菌 L-ISR和 S-ISR DNA片段.

### 2.2 沙门氏菌 2种 rDNA 16 s~ 23 s基因间隔区序列及分析

采用末端终止法分别测定了 PSA-1和 PSA-2质粒的 DNA序列, 结果见图 3. 肠炎沙门氏菌 L-ISR 全长 518 b, 包含异亮氨酸和丙氨酸 2个 tRNA基因. 肠炎沙门氏菌 S-ISR



表明, 在沙门氏菌不同的 rRNA 操纵子中, 由于受到的功能压力不同, 序列变异的程度并不一样. 沙门氏菌 L-ISR 中这一高变区的发现, 不仅对于研究沙门氏菌 rRNA 前体的加工信号序列有重要的价值, 而且为沙门氏菌属专一性 rDNA 探针的研究提供了分子基础.

|     |            |            |            |            |            |            |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|     | Ile tRNA   |            |            |            |            |            |
| Sal | TCAGGCCTAC | CAAATTTTCC | CTGAATACTG | CGTTGTGAAA | TAACTCACAT |            |
| Ec  | -----      | -----G-A   | -G-C-A-T-T | G*****     | *****      |            |
| Sal | ACTGATGTAT | GCTTCGTTAT | TCCACGCCTT | GTCTCAGGAA | AAATTATCGG |            |
| Ec  | *****      | *****      | *****      | *****      | *****      |            |
|     | Ala tRNA   |            |            |            |            |            |
| Sal | TAAAGAGGTT | CTGACTACAC | G**AT      | GGGGC      | TATAGCTCAG | CTGGGAGAGC |
| Ec  | **-----    | *-T-A---T  | -TT--      | -----      | -----      | -----      |

图 4 肠炎沙门氏菌与大肠杆菌 rDNA 中的高变区

Fig. 4 The high divergent rDNA spacer region between *S. enteritidis* and *E. coli*

Identities are denoted by hyphens and deletions by stars

### 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. 微生物遗传学综述文集. 上海: 复旦大学出版社, 1993. 65~ 73
- 2 Lehner A F, Harvey S, Hill C W. Mapping and spaces identification of rRNA operons of *Salmonella typhimurium*. J Bacteriol, 1984, 160 682~ 686
- 3 Jensen M A, Hubner R J. Use of homoduplex ribosomal DNA spacer amplification products and heteroduplex cross-hybridization products in the identification of *Salmonella* serovars. Appl Environ Microbiol, 1996, 62 (8): 2741~ 2746
- 4 Nath K. A rapid DNA isolation procedure from petri dish grown clinical isolates. Nucleic Acids Res, 1990, 18 6462
- 5 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd ed). New York Cold spring harbor laboratory press, 1989
- 6 Apinon D, Miczak A. RNA processing in prokaryotic cells. Bioessays, 1993, 15 113~ 120

## Cloning and Sequence Analysis of Two Types of rDNA 16 s~ 23 s Intergenic Spacer from *Salmonella enteritidis*

Zhou Hui\* Qu Lianghu Chen Yueqin Lu Yongjun Shi Suhua

**Abstract** Two types of rDNA 16s~ 23s intergenic spacer from *S. enteritidis* were cloned and sequenced by using agarose gel separation of PCR products. The small rDNA spacer, containing a Glu tRNA gene, is 354 b in length; while the large rDNA spacer is 518 b long due to the existings of Ile and Ala tRNA genes within it. By computer analysis, the two rDNA spacers were found to be closely related to *E. coli* rRNA operon *rrnE* and *rrnH*, respectively. Moreover, a 71 b insert, which is most probably a characteristic of genus *Salmonella*, was discovered in the high divergent region of the large rDNA spacer of *S. enteritidis*.

**Keywords** *Salmonella enteritidis*, rDNA, sequence, spacer

\* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275