

3 株杂色鲍致病菌——副溶血弧菌的 16S-23S rDNA 间区序列的分析

邓先余 王智学 何建国*

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘 要 :以细菌的 16S rDNA 3'端和 23S rDNA 5'端的高度保守区为引物,扩增了 3 株杂色鲍致病菌——副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)的 16S-23S rDNA 间区,克隆到 pGEM-T 载体上,测序。用 BLAST 和 DNASTar 软件对 16S-23S rDNA 间区序列及其内的 tRNA 基因进行比较分析。结果表明副溶血弧菌 ZSU008 和 ZSU009 测出的 16S-23S rDNA 间区均有 6 条,间区类型也相同,分别为 IGS^{GLAV}、IGS^{GLV}、IGS^{AG}、IGS^{IA}、IGS^G 和 IGS⁰。其中 IGS^{GLAV} 最大,包含 tRNA^{Glu}、tRNA^{Lys}、tRNA^{Ala} 和 tRNA^{Val} 基因;IGS^{GLV} 包含 tRNA^{Glu}、tRNA^{Lys} 和 tRNA^{Val} 基因;IGS^{AG} 包含 tRNA^{Ala} 和 tRNA^{Glu} 基因;IGS^{IA} 则为 tRNA^{Ile} 和 tRNA^{Ala} 基因;IGS^G 仅包含 tRNA^{Glu} 基因;而 IGS⁰ 最小,未包含任何 tRNA。菌株 ZSU010 测出的 16S-23S rDNA IGS 序列有 5 条,除缺少 IGS^{AG} 外,其余的 IGS 类型均与 ZSU008 和 ZSU009 相同。与 GenBank 内的副溶血弧菌 IGS 序列比较,发现副溶血弧菌所有类型的 IGS 的 tRNA 基因两端的非编码区具有较高的种内同源性。16S-23S rDNA 间区结构的差异为建立一种新的副溶血弧菌检测方法奠定了基础。

关键词 :副溶血弧菌, 16S-23S rDNA 间区, tRNA 基因

中图分类号 :Q78 **文献标识码** :A **文章编号** :0001-6209(2004)03-0304-05

细菌的 16S-23S rDNA 间区(Intergenic Spacer, IGS)大多数包含编码不同的 tRNA 基因,大小不一和进化速率比 16S rDNA 大 10 多倍^[1],近年来在细菌系统分类,特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面倍受关注,不少学者相继报道了荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)^[2]、霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)^[3]、拟态弧菌(*Vibrio mimicus*)^[3]、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)^[4]、气单胞菌属(*Aeromonas*)^[5]和河口弧菌(*Vibrio aestuarianus*)等弧菌^[6]的 16S-23S rDNA IGS,并据之建立了相应的菌株^[2]、种^[3,4,6]及属间^[5]特异的分子鉴定手段。

副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)是一种广布于世界各地的海湾和海岸线区域以及海产品中的嗜盐菌。此菌在一定的环境因子作用下可引起鱼、虾、贝类等海产品发病或大面积死亡,同时可通过受污染的海产品感染人类,引发肠道急性传染病。近年来,我国沿海地区常有因副溶血性弧菌引起海产品发病或大面积死亡以及人类食物中毒的报道^[7-10]。因此,为了预防此菌引起的病害暴发,有必要建立快速有效的检测方法。弄清副溶血弧菌的 16S-23S rDNA

IGS 的结构,有利于阐明此菌的核糖体 RNA 操纵元的进化路径及建立新的检测鉴定方法。日本学者 Maeda 等^[11]报道了一株副溶血弧菌的 16S-23S rDNA IGS 的结构差异,但因只有一株菌,无法进行此菌 16S-23S rDNA IGS 的种内分析比较,进而建立此菌的分子鉴定方法。笔者在本文中克隆、测序并分析了 3 株副溶血弧菌共 17 个 16S-23S rDNA IGS 片段,以期阐明副溶血弧菌不同菌株间 16S-23S rDNA IGS 的关系,为建立一种新的检测方法奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 3 株副溶血弧菌均由本实验室分离并保藏,其中菌株 ZSU008、ZSU009 分别分离自广东汕尾粤顺鲍鱼养殖公司的患病杂色鲍、死亡杂色鲍,副溶血弧菌 ZSU009 分离自该公司未过滤的养殖海水。经人工感染试验证实了 3 株菌均对鲍有一定的致病力,感染鲍表现的症状也相同。

1.1.2 试剂 :Taq DNA 聚合酶, dNTPs, DL2000 分子量标准购自 TaKaRa 公司; pGEM-T 载体试剂盒购自

基金项目 :国家 863 计划(2001AA622020)广东省科技厅专项资助项目(2KB05301N)

* 通讯作者。Tel/Fax :86-20-84110976 ; E-mail :lsbr05@zsu.edu.cn

作者简介 :邓先余(1972-)男,湖南怀化人,博士研究生,研究方向为水生经济动物病害与分子生物学。E-mail :dengxy2002@sina.com

收稿日期 :2003-07-08, 修回日期 :2003-12-08

Promega 公司 ;*E. coli* TG1 由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养 将 3 株副溶血弧菌分别用肉汤液体培养基于 30℃ 220r/min 振荡培养 18 ~ 20h。

1.2.2 模板 DNA 的制备 取 1.5mL 菌液 ,4000r/min 离心 5min ,得菌体 ,弃净上清。用 500μL 无菌水重悬。100℃ 水浴裂解 10min。8000r/min 离心 10min ,取上清备用。

1.2.3 PCR 扩增反应 :引物依据文献[12]设计合成 :正向引物 F 5'-AAGTCGTAACAAGGTA-3' ,对应于 *Escherichia coli* 16S rDNA 上的保守序列(位置为 1491 ~ 1506) ,反向引物 R :5'-GGTACTTAGATGTTTCAG-TTC-3' ,对应于 *E. coli* 23S rDNA 上的保守序列(位置为 188 ~ 208)。50μL PCR 反应体系内含 :3.0μL 10 × buffer [100mmol/L Tris-HCl(pH9.0) ,500mmol/L KCl ,MgCl₂ 15mmol/L ,1% Triton-X100] ,引物各 0.5μmol/L ,dNTPs 各 250μmol/L ,*Taq* DNA 聚合酶 2 U 模板 DNA 约 50ng。反应在热循环仪上进行 ,循环参数为 :94℃ 3min ,94℃ 60s ,60℃ 45s ,72℃ 90s ,循环 35 次 ,72℃ 10min。取 10μL 进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳 ,凝胶成像系统下分析结果。

1.2.4 PCR 产物的连接、转化和测序 :取经纯化的 PCR 产物进行连接和转化。按照 pGEM-T 载体系统操作手册进行。随机挑选圆滑的白色菌落 ,提取质粒 ,送上海申友生物工程公司进行 DNA 测序。

1.2.5 序列比较分析 :序列分析利用 BLAST 在线同源性查询软件查询所测片段序列的属性 ,DNASTAR 软件包中的 Editseq 程序对 16S-23S rDNA 间区序列及其内的 tRNA 基因进行分析 ,用 Megalign 软件与 Maeda 等^[11]报道的副溶血弧菌 IFO12711 的相对应序列进行比较分析。本文所测的序列在 GenBank 的序列登陆号为 AY245222-AY245238。

2 结果和讨论

用细菌 16S-23S rDNA 间区两端的保守序列做引物 ,在退火温度 60℃ 情况下 PCR 扩增结果表明 3 株副溶血弧菌均能扩增至少 2 条大小不同的带 ,大小分别在 800bp 和 550bp 左右 (图 1) ,这表明副溶血弧菌菌株间的 16S-23S rDNA 间区带谱是有差异的。另外 ,各带的密度不一(表现为在紫外灯下的明暗度不同) ,说明各间区在菌体内的拷贝数亦可能不相同。

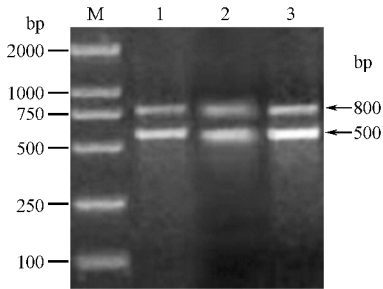


图 1 3 株副溶血弧菌 16S-23S rRNA 间区的 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图

Fig.1 Electrophoresis of the PCR-amplified 16S-23S rDNA spacers in 3 strains of *Vibrio parahaemolyticus*

M. DL2000 marker ; 1. ZSU008 ; 2. ZSU009 ; 3. ZSU010.

每株副溶血弧菌测定 15 个不同的 IGS 克隆。每个克隆片段末端的序列与高度保守的 16S 和 23S rDNA 末端序列一致 ,表明扩增的产物的确为 16S-23S rDNA IGS。为方便分析 ,对这部分序列 ,本文分别保留了 16S rDNA 3' 末端和 23S rDNA 5' 起始端的各 5 个碱基。用 BLAST 查询所测片段序列的属性结果(表 1)表明 ,3 株副溶血弧菌均测出 5 ~ 6 条大小不等的 16S-23S rDNA IGS 序列 ,各 IGS 内含有的 tRNA 基因数目为 0 ~ 4 个不等。其中菌株 ZSU008 和 ZSU009 测出的 16S-23S rDNA IGS 均有 6 条 ,且类型也相同 ,分别为 IGS^{GLAV}、IGS^{GLV}、IGS^{AG}、IGS^{IA}、IGS^G和 IGS⁰。其中最大的为 IGS^{GLAV} ,依次包含 tRNA^{Glu}、tRNA^{Lys}、tRNA^{Ala}和 tRNA^{Val}基因(从 3' 到 5') ;IGS^{GLV}则包含 tRNA^{Glu}、tRNA^{Lys}和 tRNA^{Val}基因 ;IGS^{AG}包含 tRNA^{Ala}和 tRNA^{Glu}基因 ;IGS^{IA}包含 tRNA^{Ile}和 tRNA^{Ala}基因 ;IGS^G仅包含 tRNA^{Glu}基因 ,而 IGS⁰未包含任何 tRNA 基因。菌株 ZSU010 测出的 16S-23S rDNA IGS 序列共有 5 条带 ,除缺少 IGS^{AG}外 ,其余的 IGS 均与 ZSU008 和 ZSU009 相同。这可能因为送出测序的克隆是随机挑选的 ,而且数目亦非足够多的缘故。尽管测出的每一个间区都代表了来自一个 *rrn* 操纵元 (*rrn operon*) 的序列 ,但是每一菌株的 *rrn* 操纵元数目并不能确定 ,因为并非所有的间区都能被克隆上 ,并被挑出测序^[13]。另外 ,由于各 IGS 在菌体内的拷贝数可能不相同 ,某些低拷贝的 IGS 经扩增后 ,密度较低 ,在紫外灯下不可见 ,但经克隆后 ,可能被挑出测序 ,因此测出序列的 IGS 带的数目往往比电泳图谱上可见带的数目要多 ,这一现象与 Maeda 等^[11]报道的基本一致。

除菌株 ZSU010 少了 IGS^{AG}外 ,3 株菌的其余间区类型与 Maeda 等^[11]报道的菌株 IFO12711 的 16S-23S rDNA IGS 类型完全一致。

表 1 3 株副溶血弧菌的 16S-23S rDNA 间区大小及其 tRNA 成分

Table 1 The size and tRNA composition of the 16S-23S rDNA intergenic spacers of 3 strains of *Vibrio parahaemolyticus*

Strains	Sources	IGS type	tRNA gene contained in the IGS	IGS length/bp
ZSU 008	Infected abalone	IGS ⁰	No	281
		IGS ^G	Glu (UUC)	480
		IGS ^{AG}	Ala (GGC) , Glu (UUC)	546
		IGS ^{IA}	Ile (GAU) , Ala (UGC)	527
		IGS ^{GLV}	Glu (UUC) , Lys (UUU) , Val (UAC)	672
		IGS ^{GLAV}	Glu (UUC) , Lys (UUU) , Ala (UGC) , Val (UAC)	710
ZSU 009	Dead abalone	IGS ⁰	No	282
		IGS ^G	Glu (UUC)	480
		IGS ^{AG}	Ala (GGC) , Glu (UUC)	546
		IGS ^{IA}	Ile (GAU) , Ala (UGC)	530
		IGS ^{GLV}	Glu (UUC) , Lys (UUU) , Val (UAC)	672
		IGS ^{GLAV}	Glu (UUC) , Lys (UUU) , Ala (UGC) , Val (UAC)	710
ZSU 010	Sea water	IGS ⁰	No	282
		IGS ^G	Glu (UUC)	480
		IGS ^{IA}	Ile (GAU) , Ala (UGC)	529
		IGS ^{GLV}	Glu (UUC) , Lys (UUU) , Val (UAC)	671
		IGS ^{GLAV}	Glu (UUC) , Lys (UUU) , Ala (UGC) , Val (UAC)	710

与副溶血弧菌标准菌株 IFO12711 的对应序列进行比较分析结果(表 2)表明 4 株副溶血弧菌内相同 IGS 类型的序列同源性达到 94.2% ~ 99.4% ,其中菌株 ZSU008 的 IGS^{IA} 与 ZSU009、ZSU010 的 IGS^{IA} 相差最大,各有 16 个碱基不同;而菌株 ZSU009 的 IGS^G 与 ZSU008、ZSU010 的相差最小,仅各有 2 个碱基不同。相同 IGS 类型中的少数碱基差异可能是由于个别碱基替代或缺失而导致,几乎所有报道过的细菌 16S-23S rDNA IGS 中都有类似情况发生^[13]。而不同 IGS 类型的序列同源性达到 54.1% ~ 90.4% ,其中 ZSU009 的 IGS^{AG} 与 ZSU010 的 IGS^{GLV} 同源性最小,为 54.1% ;而 ZSU009 , ZSU010 的 IGS⁰ 与 IFO12711 的 IGS^{GLV} 同源性最大,达 90.4% 。

另外 4 株菌的不同类型的 IGS 两端紧邻 16S 和 23S 的区域分别有 40 和 209 个左右的碱基序列基本一致,这表明这些非编码 tRNA 的区域可能为种内比较保守的区域,推测可以成为设计针对副溶血弧菌的特异性引物和探针的靶区。

间区 tRNA 基因序列分析的结果表明:14 个

tRNA^{Ala} 基因中,除了菌株 ZSU008 的 IGS^{IA} 多缺失 2 个碱基外,4 株菌的 IGS^{GLAV} 和 IGS^{IA} 中的 tRNA^{Ala}(UGC) 基因序列完全一致,包括反密码子的第一个碱基在内,各有 12 个碱基与菌株 IFO12711 的 IGS^{AG} 的 tRNA^{Ala}(GGC) 基因不同,而与 ZSU008、ZSU009 的 IGS^{AG} 的 tRNA^{Ala} 基因有 13 个碱基相区别。15 个 tRNA^{Glu} 基因中,4 株菌的 IGS^{GLV} 与 IGS^{AG} 中的 tRNA^{Glu} 基因完全相同,IGS^G 的 4 个 tRNA^{Glu} 基因也完全相同,但它们与 IGS^{GLV} 和 IGS^{AG} 中的 tRNA^{Glu} 基因有一个碱基的区别,而与菌株 ZSU008、ZSU009 和 ZSU010 的 IGS^{GLAV} 中的 tRNA^{Glu} 基因有 2 个碱基不同。4 个 tRNA^{Ile} 基因中,ZSU009 和 ZSU010 的 IGS^{IA} 的 tRNA^{Ile} 基因相同,各有 4 个碱基与 IFO12711 的不同,与 ZSU008 则有 3 个不同。而 8 个 tRNA^{Lys} 基因中,菌株 ZSU008 和 ZSU009 中的 IGS^{GLAV} 的 tRNA^{Lys} 基因相同,均有 1 个碱基与其它的 tRNA^{Lys} 基因不同,菌株 ZSU010 的 IGS^{GLAV} 则有 2 个碱基与其它的不同。4 株副溶血弧菌的 8 个 tRNA^{Val} 基因序列完全相同。

表 2 4 株副溶血弧菌 16S-23S IGS 序列相似性

Table 2 IGS sequences similarities among 4 strains of *Vibrio parahaemolyticus*

009	010	12711	008	009	010	12711	008	009	12711	008	009	12711	008	009	12711	008	009	12711	008	009	12711	008	009	12711
IGS ⁰	IGS ⁰	IGS ⁰	IGS ^G	IGS ^G	IGS ^G	IGS ^G	IGS ^{AG}	IGS ^{AG}	IGS ^{AG}	IGS ^{IA}	IGS ^{IA}	IGS ^{IA}	IGS ^{GLV}	IGS ^{GLV}	IGS ^{GLV}	IGS ^{GLV}	IGS ^{GLAV}	IGS ^{GLAV}	IGS ^{GLAV}	IGS ^{GLAV}	IGS ^{GLAV}	IGS ^{GLAV}	IGS ^{GLAV}	IGS ^{GLAV}
96.9	96.9	96.9	86.6	86.3	85.6	87.3	85.9	84.5	88.0	88.7	83.2	82.5	87.6	90.0	89.3	86.9	89.0	85.2	85.2	81.4	87.3	008	IGS ⁰	
	98.6	97.6	88.7	88.4	87.7	89.0	87.3	86.6	89.4	87.0	83.2	84.2	89.0	87.7	86.6	84.2	90.4	86.6	86.6	82.9	88.7	009	IGS ⁰	
		97.3	88.4	88.0	87.3	88.7	87.0	86.3	89.7	86.6	82.9	83.6	88.7	88.0	87.3	84.6	90.4	86.3	86.3	82.5	88.4	010	IGS ⁰	
			87.7	87.3	86.6	88.4	86.3	86.6	88.7	85.6	82.2	83.2	88.7	87.3	86.6	83.9	90.1	86.3	86.3	82.5	88.4	12711	IGS ⁰	
				99.4	98.8	90.0	83.9	83.7	84.9	65.9	64.1	64.7	68.2	75.5	74.9	73.7	77.1	80.6	80.6	78.6	81.8	008	IGS ^G	
					99.4	98.8	83.7	83.5	84.7	65.7	63.9	64.5	70.6	75.5	74.9	73.7	77.1	80.6	80.6	78.6	81.8	009	IGS ^G	
						98.4	83.3	82.9	84.3	65.5	63.3	64.1	70.2	75.1	74.5	73.3	76.7	80.2	80.2	78.2	81.4	010	IGS ^G	
							84.7	84.3	85.7	69.6	64.7	65.5	68.8	75.9	75.3	74.1	77.8	80.8	81.0	79.2	82.9	12711	IGS ^G	
								98.7	98.0	66.3	63.0	63.8	67.5	63.5	63.5	54.5	64.9	70.5	70.5	61.7	71.6	008	IGS ^{AG}	
									97.5	66.3	62.6	63.5	67.5	63.1	63.1	54.1	64.6	70.1	70.1	61.2	71.2	009	IGS ^{AG}	
										67.6	64.3	65.1	68.8	63.7	54.9	55.0	65.1	71.2	71.2	62.2	72.3	12711	IGS ^{AG}	
											94.2	94.2	97.8	67.4	66.5	63.5	66.5	75.6	75.6	73.6	76.5	008	IGS ^{IA}	
												97.4	94.4	60.9	60.7	60.0	61.3	65.7	65.2	63.7	66.1	009	IGS ^{IA}	
													95.2	60.7	60.5	59.7	62.0	66.6	66.4	64.9	67.2	010	IGS ^{IA}	
														66.2	65.3	57.6	67.7	77.3	77.3	67.1	78.1	12711	IGS ^{IA}	
															99.4	97.9	98.8	79.8	79.8	78.0	80.9	008	IGS ^{GLV}	
																97.5	98.4	79.3	79.3	77.6	80.5	009	IGS ^{GLV}	
																	96.9	78.4	78.6	77.5	79.4	010	IGS ^{GLV}	
																		80.7	80.7	78.9	81.8	12711	IGS ^{GLV}	
																			99.3	97.6	98.9	008	IGS ^{GLAV}	
																				98.1	98.9	009	IGS ^{GLAV}	
																					97.2	010	IGS ^{GLAV}	

008 = ZSU 008 ; 009 = ZSU 009 ; 010 = ZSU 010 ; 12711 = IFO12711.

近年来 ,随着细菌基因组学研究的发 展 ,越来越多的细菌 (主要为病原菌) 全序列被测定。作为细菌基因组的一部分 ,16S-23S rDNA IGS 的相关信息也越来越丰富。Lee 等^[5]于 2002 年报道了 10 种弧菌的 7 类 IGS ,即 IGS^{GAV}、IGS^{IAV}、IGS^{GV}、IGS^{IA}、IGS^G、IGS^A和 IGS⁰。经核 对比较 ,我们发现其中的两种类型有 误 ,即 IGS^{GAV} 实际上为 IGS^{GLAV} ,IGS^{GV} 实为 IGS^{GLV}。经 BLAST 比较 ,发现到目前为止 ,IGS^{GLAV} 仅在副溶血弧菌、河流弧菌(*V. fluvialis*)、黑美人弧菌(*V. nigrisulchritudo*)、美人鱼弧菌(*V. damsela*)和创伤弧菌(*V. vulnificus*)中出现。霍乱弧菌(*V. cholera*)也具有包含 4 个相同 tRNA 基因的 IGS ,但其 tRNA 基因在 IGS 中的顺序与前三者不同 ,依次为 tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val}-tRNA^{Ala}^[14] ,可能是基因重排的结果。IGS^{GLV} 则除了在上述 6 种弧菌中发现外 ,还在拟态弧菌(*V. mimicus*)^[3]、河口弧菌(*V. aestuarianus*)、解蛋白弧菌(*V. proteolyticus*)、杀鲑弧菌(*V. salmonicida*)等

弧菌的 IGS 中发现过^[5]。而在迄今所报道的以及本实验室测出的众多弧菌科的 16S-23S rDNA IGS 中 ,IGS^{IA}、IGS^G 和 IGS⁰ 这 3 种类型出现的频率较高 ,又因它们在某些属种内的序列同源性较高 ,而属种间差异明显 ,故常被用做设计属内或种间特异性引物的靶区^[5]。至于哪类 IGS 适合作设计副溶血弧菌的特异性引物的靶区 ,有待于进一步比较更多的副溶血弧菌菌株及其近缘种和远缘种的 IGS 序列。

致谢 感谢中国水产科学院南海水产研究所王江勇博士生 ,汕尾粤顺鲍鱼养殖公司吴忠业经理等人在菌株样品采集中给予的大力帮助 ,感谢殷志新博士在本文撰写过程中提出的许多宝贵意见。

参 考 文 献

[1] 焦振泉 ,刘秀梅 . 细菌分类与鉴定的新热点 : 16S-23S rDNA 间区 . 微生物学通报 2001 ,28(1) : 85 - 89
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

- [2] Gill S , Belles-Isles J , Brown G , *et al.* Identification of variability of ribosomal DNA spacer from *Pseudomonas* soil isolates. *Can J Microbiol* , 1993 , **40** : 541 – 547 .
- [3] Chun J , HuQ A , Colwell R . Analysis of 16S-23S rRNA intergenic spacer regions of *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* . *Appl Envir Microbiol* , 1999 , **65** (5) : 2202 – 2208 .
- [4] 张灵霞 , 庄玉辉 . 应用 PCR 扩增对分枝杆菌分类鉴定及标本检测的研究 . 微生物学通报 2001 , **28** (1) : 55 – 58 .
- [5] Kong R Y C , Pelling A , So C L , *et al.* Identification of oligonucleotide primers targeted at the 16S-23S rDNA intergenic spacers for genus- and species-specific detection of *Aeromonas* . *Marine Pollut Bullit* , 1999 , **38** (9) : 802 – 808 .
- [6] Lee S K Y , Wang H Z , Law S H W , *et al.* Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences . *Marine Pollut Bullit* , 2002 , **44** : 412 – 420 .
- [7] 唐开天 . 一起副溶血弧菌食物中毒的调查 . 中国公共卫生 , 1994 , **10** (3) : 134 .
- [8] 刘军仪 陈振鸿 阎 兵 , 等 . 文蛤副溶血弧菌病的研究 . 微生物杂志 , 1996 , **16** (4) : 1 – 5 .
- [9] 王 军 苏永全 张蕉南 , 等 . 1999 年春季东山九孔鲍暴发性病害研究 . 厦门大学学报 (自然科学版) , 1999 , **38** (5) : 641 – 644 .
- [10] 郭静霞 , 曲 芬 鲍春梅 , 等 . 副溶血弧菌肠炎 91 例 . 人民军医 , 2002 , **45** (10) : 601 – 602 .
- [11] Maeda T , Takada N , Furushita M , *et al.* Structural variation in the 16S-23S rRNA intergenic spacers of *Vibrio parahaemolyticus* . *FEMS Microbiol Lett* 2000 , **192** : 73 – 77 .
- [12] Gürtler V , Stanisich V A . New approach to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region . *Microbiol* , 1996 , **142** : 3 – 16 .
- [13] Gürtler V . The role of recombination and mutation in 16S-23S rDNA spacer rearrangements . *Gene* , 1999 , **238** : 241 – 252 .
- [14] Heidelberg J F , Eisen J A , Nelson K E , *et al.* DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholera* . *Nature* , 2000 , **406** : 477 – 483 .

Analysis of The 16S-23S rDNA Intergenic Spacers (IGSs) of 3 Strains of *Vibrio parahaemolyticus* , A Pathogen of Abalone (*Haliotis diversicolor*)

DENG Xian-Yu WANG Zhi-Xue HE Jian-Guo *

(School of Life Sciences , Zhongshan University , Guangzhou 510275 , China)

Abstract : Using the conserved sequences flanking the 3' end of the 16s and the 5' end of the 23S rDNAs as PCR primers , the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of 3 strains of *Vibrio parahaemolyticus* , which is a pathogen of abalone (*Haliotis diversicolor*) , were amplified and cloned with pGEM-T vector. Different clones were selected to be sequenced and the sequences were analysed with the software BLAST and DNASTAR. Analysis of the IGS sequences suggested that both of the strain ZSU008 and ZSU009 contain six types of polymorphic 16S-23S spacers , namely , IGS^{GLAV} , IGS^{GLV} , IGS^{AG} , IGS^{IA} , IGS^C and IGS⁰ ; but the strain ZSU010 lacks IGS^{AG} . Among these six IGS types , IGS^{GLAV} is the biggest type , including the cluster of tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Ala}-tRNA^{Val} ; IGS^{GLV} , including that of tRNA^{Glu}-tRNA^{Lys}-tRNA^{Val} ; IGS^{AG} , tRNA^{Ala}-tRNA^{Glu} ; IGS⁰ is the smallest , which has no tRNA gene . Multiple alignment of all the IGS sequences of these 3 strains with those of *V. parahaemolyticus* IFO12711 available from GenBank revealed some regions of similarity in the non-coding regions flanking the tRNA genes within all the IGS types . The structure variation of the spacers lays a foundation for developing a diagnostic method for *V. parahaemolyticus* .

Key words : *Vibrio parahaemolyticus* , 16S-23S rDNA intergenic spacers , tRNA gene

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2001AA622020) ; Special Funds of Departments of Sciences and Technology of Guangdong Province (2KB05301N)

* Corresponding author . Tel/Fax : 86-20-84110976 ; E-mail : lsbr05@zsu.edu.cn

Received date : 07-28-2003