

## 极端嗜盐菌 16S rDNA 的 PCR 扩增<sup>\*</sup>

周培瑾 徐毅 马允卿 刘宏迪

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘要** 四株嗜盐菌 *Haloarcula vallismortis*(EM201)、*Haloferax denitrificans*(EM303)、A<sub>5</sub> 和 B<sub>2</sub> 已通过一对特定引物用 PCR 技术从总 DNA 中扩增出各自的 16SrDNA 片段,分子大小在 1.47kd 左右。DNA 杂交也表明这些 PCR 产物具有嗜盐菌的同源性。

**关键词** 嗜盐菌, 16S rRNA, PCR 技术

嗜盐菌是一类生长在高浓度 NaCl 环境中的微生物,由于这种特殊性,使人们对它们越来越感兴趣。但因以前的分类研究方法比较注重表型,所以其分类地位比较混乱。16S rRNA 在进化上十分保守,因此常被用来作为进化上的分析指标。以往分离这种 16S rRNA 或其基因是非常复杂、繁琐和耗时的,所以从事这种研究工作的报道比较少。通过 PCR 技术<sup>[1,2]</sup>,只用几个小时即可将 16S rDNA 扩增出来,这样即可为分类提供一定数据,又为测序工作打下良好的基础。

嗜盐菌 16S rDNA 在此方面的工作尚未见报道,我们就是在这种情况下,从事以下工作的。

### 1 材料和方法

#### 1.1 菌株

*Haloarcula vallismortis* (EM201) 和 *Haloferax denitrificans* (EM303) 来自美国 ATCC, A<sub>5</sub> 和 B<sub>2</sub> 分离自我国新疆艾丁湖及乌宗布那克盐湖。

#### 1.2 方法

**1.2.1 嗜盐菌总 DNA 提取:** 取 10ml 嗜盐菌培养液,离心,去掉上清液,用少许 20% NaCl 溶液悬浮菌体,然后加入 9ml TE 缓冲液和一定量的蛋白酶 K (50μg/ml), 37℃ 保温 1 小时,用 1:1 的酚:氯仿抽提数次,最后乙醇沉淀,干燥待用。

**1.2.2 PCR<sup>[3]</sup>:** 变性温度 94℃, 延伸温度 70℃, 复性温度 50℃; 延伸时间 3 分钟, 变性和复性时间各 1 分钟。反应体积 100μl: H<sub>2</sub>O 65μl, 10× 缓冲液 10μl, DMSO 4μl, 4× dNTP (2.5mmol/L) 8μl, 引物 I 4μl, 引物 II 4μl, 模板 4μl (1μg), Taq DNA 聚合酶 1μl (2u), 最后加入 50μl 石蜡油, 反应 36 个循环。反应完毕后, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分析结果。

**1.2.3 DNA 杂交:** 以 PCR 产物作为探针与嗜盐菌总 DNA 杂交, 同时用 *E. coli* 和利斯特氏菌 (*Listeria*) 作为对照菌<sup>[3]</sup>。

\* 国家自然科学基金重点资助项目

本文于 1992 年 6 月 18 日收到。

2 结果和讨论

核酸分析尤其是 16 S r RNA 序列分析已经成为细菌分类的一个重要指标<sup>[1]</sup>。以前 RNA 的分离非常复杂,现在通过 PCR 方法的发明和发展<sup>[2,6]</sup>,已使 RNA 的分析变得比较简单。通过嗜盐菌核酸序列保守区的分析对比,得到了一对适用于嗜盐杆菌 16S r RNA PCR 扩增的共用引物:<sup>[7-9]</sup>

引物 I:5' ATTCGGTTGATCCTGCCGGA 3'

引物 II:5'AGGAGGTGATCCAGCCGCAG 3'

使用这对引物,已将 A<sub>5</sub>、B<sub>2</sub>、EM201 和 EM303 的 16S r DNA 片段扩增出来,其分子大小约为 1.47kb 左右(图 1)

这一 DNA 片段通过 1%的低熔点琼脂糖凝胶分离出来,然后以 A<sub>5</sub>和 B<sub>2</sub>的 PCR 产物制备的<sup>32</sup>P 标记探针,与 A<sub>5</sub>、B<sub>2</sub>、EM201 和 EM303 菌株的总 DNA 进行杂交,其结果如图 2 所示。嗜盐菌 16S r DNA 的 PCR 产物只与其本身的基因有同源性而与其它真细菌的 DNA 基因无同源性,也就是说,这些 PCR 产物只能来自嗜盐菌本身的 DNA,再加上嗜盐菌引物的特殊性和 PCR 产物的分子大小,可以确定这些产

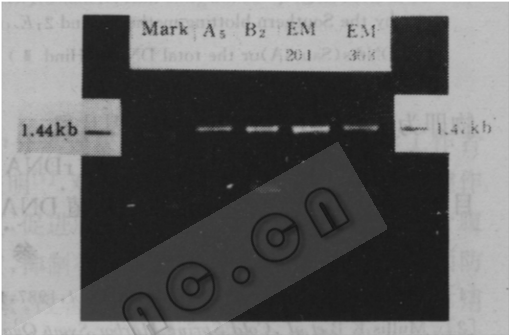


图 1 不同菌株的 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳  
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR products from strains

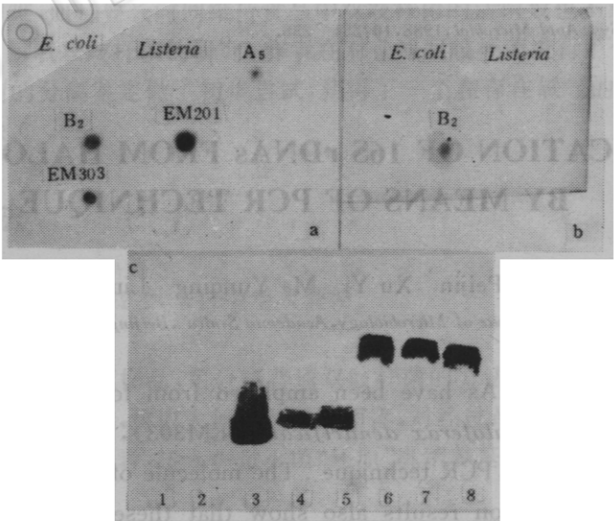


图 2 16S rDNA/DNA 杂交的放射自显影图

Fig. 2 Autoradiographs of 16S rDNA/DNA hybridization

(a) 用 A<sub>3</sub> 的 PCR 产物制备的<sup>32</sup>P 标记探针<sup>32</sup>P probe made from A<sub>3</sub> PCR product;(b) 用 B<sub>2</sub> 的 PCR 产物制备的<sup>32</sup>P 标记探针<sup>32</sup>P probe made from B<sub>2</sub> PCR product;(c) A<sub>3</sub> 菌 PCR 产物的<sup>32</sup>P 探针与 A<sub>3</sub>、B<sub>2</sub> 和 EM201 菌总 DNA 的 Southern blotting。1 和 2 分别是 *E. coli* 和 *Listeria* 的总 DNA; 3、4 和 5 分别是 A<sub>3</sub>、B<sub>2</sub> 和 EM201 菌的总 DNA (Sau 3A 酶切); 6、7 和 8 分别是 A<sub>3</sub>、B<sub>2</sub> 和 EM201 菌的总 DNA (Hind III 酶切)。Hybridization of A<sub>3</sub> strain PCR product (<sup>32</sup>P) and total DNAs of Halobacteria A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> and EM201 strains by the Southern blotting method. 1 and 2; *E. coli* and *Listeria*'s total DNAs; 3, 4 and 5 or 6, 7 and 8; The total DNAs (Sau 3A) or the total DNAs (Hind III) from A<sub>3</sub>, B<sub>2</sub> and EM201 respectively.

物即为嗜盐菌 16S rRNA 的基因片段。

这种实验方法不但简化了 16S rDNA 的分离, 而且也为今后的测序工作奠定了基础。目前尚未发现用 PCR 技术在嗜盐菌 DNA 中扩增 16S rDNA 成功的例子的报道。

### 参考文献

- [1] Mullis K B, Faloona F. *Methods Enzymol*, 1987, **155**:335.
- [2] Mullis K B *et al.*, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 1986, **51**:263--273.
- [3] Sambrook J *et al.*, *Molecular Cloning*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [4] 郑宏大, 等(译). 科学, 1986, **10**:35--47.
- [5] Saiki R K *et al.*, *Science*, 1988, **239**:487--491.
- [6] Barry T *et al.*, *Biotechnology*, 1990, **8**:233--236.
- [7] Gupta R *et al.*, *Science*, 1983, **221**:656--659.
- [8] Hui L, Dennis P P, *J Biol Chem*, 1985, **260**:899--906.
- [9] Oren A *et al.*, *Syst Appl Microbiol*, 1988, **10**:251--258.

## AMPLIFICATION OF 16S rDNAs FROM HALOBACTERIA BY MEANS OF PCR TECHNIQUE

Zhou Peijin Xu Yi Ma Yunqing Liu Hongdi

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

**Abstract** The 16S rDNAs have been amplified from four halobacteria *Haloarcula vallismortis* (EM201), *Haloferax denitrificans* (EM303), A<sub>3</sub> and B<sub>2</sub> through a set of specific primers using the PCR technique. The molecule of the PCR products is about 1.47 kb. The hybridization results also show that these PCR products have DNA homology with halobacteria.

**Key words** Halobacteria, 16S rRNA, PCR technique