

文章编号: 0529-6579 (2000) 01-0068-04

海洋细菌的分子鉴定分类^{*}

戴 欣, 陈月琴, 周 惠, 周世宁, 屈良 鹄

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘 要: 从南海海底沉积物中分离到一批细菌, 克隆了其中产抗菌活性物且培养形态多变的细菌 ZS110 的 16S rDNA, 通过测定和比较 16S rDNA 的部分序列, 对 ZS110 进行了分子鉴定, 结果表明它是一株适应了海洋环境的芽孢杆菌属(*Bacillus*)的枯草芽孢杆菌种(*Bacillus subtilis*)。

关键词: 海洋细菌; 分子分类鉴定; 16S rRNA

中图分类号: Q939.1; Q751 **文献标识码:** A

目前从陆地微生物分离到的生物活性产物大部分是已知结构的化合物, 而海洋微生物作为药物的新来源, 正受到越来越多的关注。但对大量菌种的分类鉴定是一项繁琐、费时的的工作, 而且由于海洋独特的环境, 包括高盐、高压、低营养、低温等, 造就了海洋微生物有别于陆生微生物的许多特异性 (如不易培养, 形态多变且在保藏和移种过程中很容易死亡等) 而导致对它们种类区分的困难^[1], 不利于海洋微生物研究和开发的深入, 因此迫切需要建立一些简单、方便、易于操作的分类鉴定方法对海洋微生物进行分析, 使人们在一定程度上更科学、更精确、更快速找到海洋分离物的分类地位, 为海洋微生物资源的开发利用奠定基础。目前, 大分子 rRNA 已成为一个分子指标^[2], 广泛地用于各种微生物的遗传特征和分子差异的研究, 加上大量已知微生物的 DNA 都被测定并输入国际基因数据库, 成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统, 从而可以通过对未知微生物 DNA 序列的测定和比较分析, 达到对其进行快速、有效的鉴定分类的目的。我们正在进行中国南海海洋微生物的资源调查工作, 目前已从其海底沉积物中分离获得一批微生物, 并从中筛选到具有抗菌活性的细菌 ZS110, 由于该菌在不同培养条件下形态多变, 甚至在同一培养条件下菌落形态也十分不稳定, 因此本文应用 16S rRNA 作为分子指标直接对该菌进行分子分类鉴定, 并对所得数据进行分析 and 讨论。

1 材料与方法

1.1 菌种来源

从中国南海 3 个海区采集到 9 个样品, 其中海底沉积物 3 个, 底层水 3 个, 表层水 3

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870023); 中国科学院大亚湾开放实验室基金资助项目 (S9604); 华南生物科学与技术研究基金资助项目

收稿日期: 1999-10-12 作者简介: 戴欣 (1970~), 女, 讲师。

个. 从中分离获得 120 株细菌, 抗菌实验表明其中 ZS110 菌株能产生抗菌活性物^[3].

1.2 细菌 DNA 制备

将细菌接种在 ZoBell 2216E 培养基平板上, 37 °C 培养过夜. 采用细菌单菌落直接 PCR 扩增法^[4] 制备细菌 DNA, 即取一单菌落溶于 10 μ L $\rho=1\%$ SDS 溶液中, 充分振荡摇匀, 用 300 μ L TE 溶解获得 DNA 原液. 将原液分别稀释 10、100、1 000 倍作为 PCR 扩增模板.

1.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和产物纯化

应用标准的双链 PCR 反应扩增菌株的 16S rDNA 全基因片段. 采用的引物为 16(+): 5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' 和 16(-): 5' CGGCTACCTGTTCACGAC 3', 两引物间的距离约 1 500 碱基对. 20 μ L 反应液中含有: 10 $\times$ PCR 缓冲液 10%, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 200 μ mol/L, 引物各 1.2 μ g, Tag DNA 聚合酶 1 单位.

PCR 扩增条件: 94 °C 预变性 4 min 后, 接以 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 30 次, 最后在 72 °C 保温 10 min. 扩增得到的产物经 DNA 纯化系统纯化.

1.4 PCR 产物的克隆

PCR 产物经末端补平磷酸化并与载体 pTJ19 连接后转化到 *E. coli* TG1 菌株中, 培养至对数生长期, 用 QIAprep Spin Miniprep Kit (50) 提取并纯化质粒 DNA, 该 DNA 直接用作测序的模板.

1.5 测 序

采用 ABI PRISM™ 377DNA Sequencer 进行序列测定, 引物序列为 16(+): 5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3' 和 N3R: 5' T(GA)CGCATTTACCGCTACAC3'.

1.6 序列的数据处理

将序列数据与 Genbank 中已存在的细菌 16S rRNA 基因序列应用 BLAST 程序进行相似性比较.

2 结果与讨论

2.1 单菌落直接 PCR 扩增法

采用单菌落直接 PCR 扩增法, 减少了海洋细菌 DNA 提取过程中可能带来的其他细菌尤其是陆生微生物的污染, 且具有快速、简便、重复性好等优点. 结果表明, 单菌落裂解后所获得的 DNA 原液、稀释 10 倍、100 倍、1 000 倍均可直接进行 PCR 扩增, 但稀释 1 000 倍后扩增效果较差, 电泳结果见图 1.

2.2 PCR 扩增与序列分析结果

以细菌 16S rRNA 通用引物对 ZS110 菌进行 PCR 扩增, 得到一约 1 500 碱基对长的片段 (图 1). 16S rRNA 基因的 PCR 扩增产物经 DPS 系统纯化, 经末端补平磷酸化并连接到 pTZ 19 上, 通过限制性内切酶等方法检查转化子后测定重组质粒的 DNA 序列, 共测得 ZS110 16S rDNA 680 碱基对核苷酸序列 (对应 *E. coli* 16S rDNA 的 8~682 位). 将所测得序列输入 GENBANK, 以 BLAST 程序进行比较分析, 发现它与芽孢杆菌属 (*Bacillus* sp.) 很自然地组成一群, 尤其与芽孢杆菌属中枯草芽孢杆菌种 (*Bacillus subtilis*) 的 16S rRNA 序列的相似性最大 (99%), 相似性比较见图 2. 从而确定 ZS110 为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌种.



图 1 ZS110 菌 16S rDNA PCR 扩增结果

Fig.1 16S rDNA PCR result of ZS110

M: 2 000 bp marker; 1, 2: 原液;
3, 4: 稀释 10 倍; 5, 6: 稀释 100 倍;
7, 8: 稀释 1000 倍; C: 空白对照



图 2 ZS110 菌 16S rDNA 部分序列的排列比较

Fig.2 Sequence alignment of partial 16S rDNA from ZS110 in Genbank

B. subtilis: Genbank 登记号 X60646; 5' - 49 位: 不确定; 54 位: 缺失

rDNA 结构既具有保守性，又具有高变性。保守性能够反映生物物种的亲缘关系，为系统发育重建提供线索；高变性则能揭示出生物物种的特征核苷酸序列，是属种鉴定的分子基础；目前 rRNA 已成为细菌系统分类研究中最有用也是最常用的分子指标^[2]。由图 3 可见，选用的 PCR 扩增引物及测序引物对应的序列是 16S rRNA 中高度保守的序列，其中 PCR 引物 16(+) 和 16(-) 扩增分离物的 16S rRNA 全基因，选择位于 8~27(f) 和 683~702(r) 的 16(+) 和 N3R 保守序列作为测序引物，可准确测定 16S rDNA 5' 部分序列。根据核糖体 16S rRNA 结构变化规律，在所测定的区域中包括了 V1、V2、V3 和 V4 4 个高变区，尤其是 V2 这一高变区，由于进化速度相对较快，其中所包含的信息，足够用于物种属及属以上分类单位的比较分析。因此，测定 16S rDNA 部分序列即可达到对分离物的分子鉴定的目的。

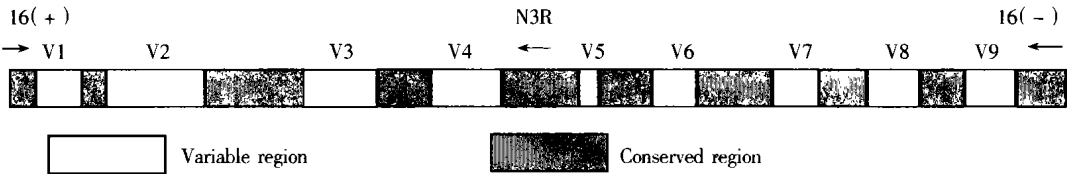


图 3 16S rRNA 基因结构模式图^[5]

Fig.3 Diagram of 16S rRNA gene structure

菌株 ZS110 分离自海洋沉积物，该菌在不同培养条件下形态多变，甚至在同一培养条件下菌落形态也十分不稳定。因此，在研究初期曾被误认为放线菌，通过以 16S rRNA 作为分子指标，进行分子相似性比较，从而将它定位于芽孢杆菌属、枯草芽孢杆菌种。进一步对该菌生理特性的研究表明其生长需要 Na⁺，而且能耐受高浓度的 NaCl (ρ=20%)，

加之该菌的良好生长需要全海水, 另外某些生理生化特征也与枯草芽孢杆菌模式菌株不同(如卵磷脂酶阳性等), 因此我们可以认为筛选到的 ZS110 是一株适应海洋环境的枯草芽孢杆菌。

3 结 语

由于 16S rRNA 序列的保守性和存在的普遍性, 以及核酸序列本身的稳定性, 序列分析的重现性极高, 基于当今分析技术的改进, 应用 16S rRNA 作为分子指标, 可以实现快速、微量、准确、简便地对微生物进行分类鉴定。分子分类正在从研究的目的过渡到作为研究的手段。随着分子分类的理论和方法的日趋成熟, 它已逐步成为微生物资源调查和环境生态研究一种强有力的工具。本工作正是探讨这一方法在我国海洋微生物的资源调查和开发研究中应用。

参考文献:

- [1] ROBINA B S, SHEWAN J M. The present status of some aspect of marine microbiology[J]. *Adv Biol*, 1968, 95~126.
- [2] DELONG E F, WICKHAM G S, PACE N R. Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells[J]. *Science* 243: 1360~1363.
- [3] 周世宁, 林永成, 姜广策, 等. 产生活性物质的海洋放线菌的分离及生理特征[A]. 香港科技大学理学院及海洋与大气研究中心. '97 海岸海洋资源与环境学术研讨会论文集 C. 香港: 香港科技大学理学院, 1998. 60~64.
- [4] 周惠, 杜延平, 屈良鹄. 沙门氏菌 rDNA ISR 序列测定及特征分析[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1999, 38(1): 79~82.
- [5] GRAY M W, SANKOFF D, CEDERGREN R J. On the evolutionary descent of organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA[J]. *Nucleic Acid Res*, 1984, 12(14): 5837~5851.

Molecular Identification and Classification of Marine Bacteria from South China Sea

DAI Xin^{*}, CHEN Yue-qin, ZHOU Hui, ZHOU Shi-ning, QU Liang-hu

Abstract: Many bacteria were isolated from the marine of South China Sea. The 16S rDNA amplified from one of these isolations, which produces antibiotics (strain ZS110), was cloned. As molecular criteria, 680 nucleotides sequence of 16S rDNA were determined and analyzed. The results indicate that ZS110 is *Bacillus subtilis*.

Keywords: marine bacteria; molecular identification; 16S rRNA

^{*} School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China