

# 深海细菌的分子鉴定分类

曾润颖 赵 晶

(国家海洋局第三海洋研究所 厦门 361005)

**摘要:** 从东太平洋海底 5,300m 深的沉积物中分离到一批嗜冷细菌, 克隆了其中 13 株细菌的 16S rRNA 基因, 通过其序列的测定和比较, 对这 13 株细菌进行了分子鉴定, 结果表明它们分属于副球菌, 假单胞菌, 盐单胞菌和假交替单胞菌 4 个不同的菌属, 同时进行了系统发育分析。

**关键词:** 深海细菌, 分子分类鉴定, 16S rRNA

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 06-0012-05

## MOLECULAR IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF DEEP SEA PSYCHROPHILIC BACTERIA FROM EAST-PACIFIC SEDIMENT

ZENG Run-Ying ZHAO Jing

(The Third Institute of Oceanography SOA, Xiamen 361005)

**Abstract:** Many psychrophilic bacteria were isolated from east-pacific sediment which is 5,300m in depth. The genera of 13 isolations were identified and classified based on the comparison and phylogenetic study of 16S rRNA gene sequences. The results indicated that they belong to four genera including *Parococcus*, *Pseudomonas*, *Halomonas* and *Pseudocalteromonas*.

**Key words:** Deep sea bacteria, Molecular identification, 16S rRNA

海洋微生物活性物质的开发正受到越来越多的关注, 而深海独特的环境, 包括高盐、高压、低营养、低温(高温)等, 使深海微生物能产生具有特殊功能的活性物质, 例如在工业上能够得到广泛应用的低(高)温酶, 具有特殊功效的药用因子等。但由于其不同的生长特性而导致菌种鉴定很难进行, 不利于深海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、易于操作的鉴定方法对深海微生物进行分析, 为深海微生物资源的开发利用奠定基础。目前 16S rRNA 已经成为细菌系统分类研究中最常用也是最有效的分子指标, 被广泛地应用于各种微生物的遗传特性和分子差异的研究<sup>[1]</sup>, 同时国际上也建立了多个微生物 16S rRNA 序列数据库, 成为对微生物鉴定分类非常有用的参照系统。通过对未知微生物 16S rRNA 序列的测定和比较分析, 可以快速有效地进行分类与鉴定。我们从东太平洋海底 5,300m 深的沉积物中分离到一批细菌, 其最适生长温度均在 10℃~25℃, 采用传统的生化指纹方法无法对其进行分类与鉴定, 因此, 本文应用 16S rRNA 作为分子指标对这些细菌进行分子分类鉴定, 并对其系统发育情况进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种: 分离自东太平洋中国开辟区海底 5,300m~5,600m 深采集的海底沉积物。

收稿日期: 2001-09-13, 修回日期: 2001-10-07

**1.1.2 试剂与仪器:** 酵母膏 (Yeast Extract) 为 Oxoid 公司产品, 蛋白胨 (Tryptone) 为 BBI 进口分装, 盐酸胍 (Guanidine Hydrochloride)、琼脂糖为 Amersco 公司产品, 所用核酸内切酶、连接酶均为 MBI 公司产品。

低温摇床 (4℃ ~ 60℃) 为 New Brunswick Scientific 公司产品, PCR 仪为 Biometra 公司产品, 凝胶成像系统为 UVP 公司产品。

## 1.2 方法

**1.2.1 菌株分离与保存:** 采用减半的 2216E 培养基 (酵母膏 1g, 蛋白胨 5g,  $\text{FePO}_4$  0.025g, 琼脂 15g, 用经沙滤后的自然海水配制, pH8.0, 定容至 1L) 进行分离培养, 培养温度为 4℃。纯化后的单菌落用上述培养基 (不加琼脂) 10℃ 摇培后加入 15% (v/v) 甘油, 于 -80℃ 超低温冰箱中保存。

**1.2.2 细菌染色体 DNA 制备:** 1mL 细菌培养液经 3,000r/min 离心 30s 后去除上清, 菌体加入 200μL 6mol/L 盐酸胍后混匀, 室温放置 2min 进行裂解。往裂解液中加入 200μL 酚/氯仿/异戊醇 (25:24:1) 混合溶液进行抽提。抽提液经 15,000r/min 离心 2min 后取上层水相移入新管。往水相中加入等体积异丙醇沉淀 5min, 然后 15,000r/min 离心 1min, 吸去上清, 沉淀用 70% 乙醇洗两次, 放置超净台内吹干。加入 200μL TE 溶液溶解, 同时加入 2μL RNase (浓度为 10μg/μL), 于 37℃ 酶解 1h。往溶液中加入等体积异丙醇和 2μL 1mol/L  $\text{MgCl}_2$ , 室温放置 10min 后 15,000r/min 离心 2min, 除去上清, 沉淀用 70% 乙醇洗两次, 放置超净台内吹干, 溶解于 20μL TE 溶液后于 -20℃ 保存。

**1.2.3 16S rRNA 基因的 PCR 扩增和产物纯化:** 引物的选择参照文献 [2], 目前根据大肠杆菌的基因组序列设计出了多对用于 16S rRNA 序列扩增的引物。已有的研究发现深海沉积物中的微生物在常压下进行培养时假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 占优势<sup>[3]</sup>, 因此我们选用了其中的 27f (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3', 对应于 *E. coli* 16S rDNA 的 8 ~ 27 位) 和 1542r (5' AAGGAGGTGATCCAGCC 3', 对应于 *E. coli* 16S rDNA 的 1,525 ~ 1,542 位) 进行扩增, 该对引物能够扩增出近乎全长的 16S rRNA 序列, 长度约为 1,500bp。

25μL PCR 反应液中含有: 10 × PCR 缓冲液 2.5μL, 2mmol/L dNTP 2.5μL, Taq DNA 聚合酶 1unit, 引物各 1μL, 模板 2μL, 重蒸水 15μL。反应条件为: 94℃ 1min, 55℃ 1min, 68℃ 1.5min, 循环 40 次, 68℃ 延伸 10min。PCR 产物经低熔点琼脂糖电泳检测, 用玻璃粉纯化法从胶上回收纯化<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 PCR 产物克隆<sup>[4]</sup>:** pBluescript 质粒经 *EcoRV* 完全酶切后去磷酸化, 与经末端磷酸化后的 PCR 产物混合, 加入  $T_4$  DNA 连接酶 16℃ 连接过夜 (约 12h)。连接产物转化到 *E. coli* 感受态细胞中, 通过蓝白斑筛选, 挑选阳性转化菌。

**1.2.5 阳性转化菌的鉴定:** 用灭菌牙签挑取筛选皿上的白色菌落, 在 10μL 无菌水中打匀, 99℃ 加热 15min, 裂解液直接作为模板, 采用 pBluescript 质粒上的 T7 和 T3 引物进行菌落 PCR。PCR 反应条件为: 94℃ 1min, 53℃ 1min, 72℃ 1.5min, 循环 30 次, 72℃ 延伸 10min, PCR 产物用琼脂糖电泳检测。

提取经 PCR 扩增验证后的转化菌的质粒, 通过 *EcoRI* 和 *HindIII* 完全双酶切进行进一步验证, 两步验证中均能产生 1,500bp 左右片段的为阳性转化菌。将插入了 16S rRNA 基因的质粒送至上海基康生物技术有限公司进行测序。

**1.2.6 序列分析:** 通过互联网, 将序列提交 EMBL (欧洲分子生物学实验室) 数据库,

应用 FASTA3 程序与数据库中已有的细菌 16S rRNA 序列进行相似性比较分析。

序列的比较及系统发育分析采用 DNAMAN (Version 5.1) 软件进行。

## 2 结果与讨论

### 2.1 序列分析结果

将所测得的序列通过互联网输入 EMBL 数据库, 以 FASTA3 程序进行比较分析, 根据序列同源性比较所得的结果见表 1。

表 1 深海微生物 16S rRNA 序列鉴定结果

菌株	与已知种的最大同源性 (%)		与未知种的最大同源性 (%)		
1-17	<i>Paracoccus marcusii</i>	99.582	—		
1-27	<i>Pseudoalteromonas haloplankti</i>	97.207	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	RE10F/5	99.022
1-22	<i>Pseudoalteromonas haloplankti</i>	96.848	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	RE10F/5	98.711
2-5	<i>Pseudoalteromonas antarctica</i>	96.123	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	RE10F/5	97.326
DY-A	<i>Pseudomonas veronii</i>	96.161	—		
1-14	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	91.715	—		
1-1	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	88.652	—		
2-1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	96.174	—		
1-21	<i>Halomonas meridiana</i>	97.832	Slope Strain DIII A		99.589
1-5	<i>Halomonas desiderata</i>	90.663	<i>Halomonas</i> sp. ML-028		92.936
1-13	<i>Halomonas meridiana</i>	90.524	—		
2-6	<i>Halomonas meridiana</i>	94.286	<i>Halomonas</i> sp.		96.418
1-11	<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	83.374	<i>Shewanella</i> sp.		84.330

根据序列比较结果, 除了 1-11 和 1-1 菌株外, 其余的 11 株菌均与数据库中同一属的细菌具有大于 90% 的同源性, 由此可以确定它们的菌属, 其中 1 株属于副球菌属 (*Paracoccus*), 3 株属于假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*), 4 株属于假单胞菌属 (*Pseudomonas*), 4 株属于盐单胞菌属 (*Halomonas*)。

除了菌株 1-17 外, 其余的菌株与数据库中已知菌中的同源性均不超过 98%, 但是 1-21 与 1-27 两株细菌与数据库中未知种名的菌种之间具有大于 99% 的相似性。一般认为, 16S rRNA 序列同源性小于 98%, 可以认为属于不同的种, 同源性小于 93% ~ 95%, 可以认为属于不同属<sup>[5,6]</sup>。因此, 所测定的 13 株细菌中, 1-17, 1-21, 1-27 的菌株的种名可以确定, 而其余 10 株菌可确定菌属, 但属于数据库中尚未收录的新种。

菌株 1-14, 1-5, 1-13, 1-1 和 1-11 与数据库中所有序列的最大同源性均低于 93%, 1-1 和 1-11 分别只有 88.652% 和 84.330%, 但是除了 1-11 外, 其余 4 株深海细菌与数据库中的序列比较结果表明, 与它们同源性最大的前 20 株细菌均为同一菌属, 因此它们的菌属可以得到认定, 如表 1。而与 1-11 同源性最大的前 20 株菌中包含了假交替单胞菌属 (*Pseudoalteromonas*), 施瓦氏菌属 (*Shewanella*), 交替单胞菌属 (*Alteromonas*), 无色杆菌属 (*Achromatium*) 以及多株未鉴定的海洋细菌, 因此其菌属的确定有赖于系统发育的分析及其它的鉴定。

### 2.2 深海细菌系统发育分析

#### 2.2.1 深海细菌的系统发育分析: 对所测定的 13 株细菌以及数据库与它们同源性最大

的 18 株细菌的 16S rRNA 全序列进行遗传距离计算, 并根据遗传距离得到系统发育图, 见图 1。由图 1 可以看出, 所有 13 株细菌在系统发育树中分成 *Pseudomonas*, *Halomonas*, *Parococcus*, *Pseudoalteromonas* 4 个分支。其中根据序列同源性比较无法确定的 1-11 菌株与 2-5, 1-22, 1-27 处在同一个分支内, 因此可以确定它为 *Pseudoalteromonas* 菌属。

从系统发育树上还可以看出,同一菌属中,来自深海的细菌处在相对独立的分支中,其原因可能是由于深海细菌在物种进化中受到深海环境的影响所致。

**2.2.2.2** 1-11 的系统发育位置: 对 1-11 及与其同源性最大的 6 株细菌的 16S rRNA 全序列进行遗传距离计算, 并根据遗传距离作图, 图 2 给出了以 16S rRNA 全序列为基础的系统发育图。图 2 表明 1-11 和 *Pseudoalteromonas* 菌属的几株细菌处在同一个大的分支内, 但 1-11 处于一个相对独立的分支中, 而且它与数据库中 *Pseudoalteromonas* 菌属细菌的序列同源性均比较低, 因此有可能是新的种, 需要进一步通过分子杂交、G + C mol% 测定等试验进行具体的鉴定。

### 3 结语

传统的菌种鉴定是选用不同的代谢底物作为碳源, 将菌株利用碳源的能力作为鉴定指标, 该方法建立在 37℃ 时菌株能够正常生长的前提之上。而深海微生物的最适生长温度在 10℃ ~ 25℃, 在 37℃ 无法正常生长或根本无法生长, 我们在采用 BIOLOG 微生物鉴定系统对其进行鉴定时, 无法获得其在 37℃ 时对底物的利用情况, 因此无法参照数据库对这些微生物进行分类与鉴定。通过 16S rRNA 序列同源性的比较, 并结合系统发育分析, 对深海微生物进行了种属分类的新种。随着数据库的完善与发展, 其种属分类与鉴定。

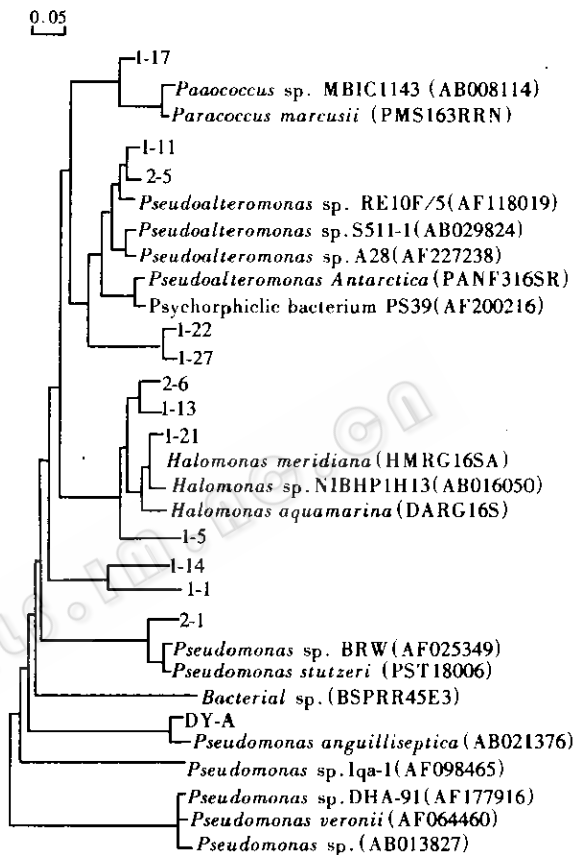


图 1 深海细菌系统发育树

参照菌株来自 EMBL 数据库, 括号内为 EMBL 序列注册号

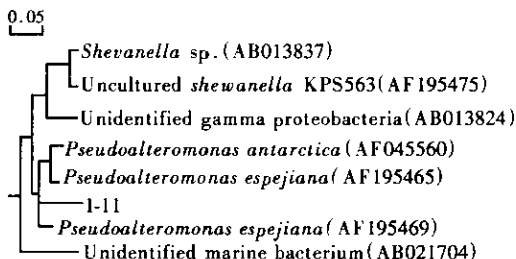


图 2 菌株 1-11 在系统发育树中的位置

参照菌株来自 EMBL 数据库, 括号内为 EMBL 序列注册号

应用 16S rRNA 作为分子指标, 可以实现快速、微量、准确地对微生物进行分类鉴定, 同时还可以对环境中的不可培养的微生物进行鉴定和分类, 实现环境微生物多样性的无偏研究, 目前随着分子分类的理论和方法的日趋成熟以及数据库的日趋完善, 它已经逐步成为微生物资源调查和环境生态研究的一种强有力的工具。本文利用该方法对深海微生物进行了分子分类鉴定, 将为深海微生物资源调查和开发研究提供有益的信息。

### 参考文献

- [1] Delong E F, Wickham G S, Pace N R, *et al.* Science, 1989, **243** (4896): 1360 ~ 1363.
- [2] William G W, Susan M B, Dale A P, *et al.* J Bacteriol, 1991, **173** (2): 697 ~ 703.
- [3] Miki Y, Chiaki K, Lina L, *et al.* JAMSTEC J Deep Sea Res, 1998, (14): 561 ~ 571.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等著, 金冬雁等译, 分子克隆实验指南 (第二版), 北京: 科学出版社, 1998.
- [5] Devereux R, He S H, Doyle C L, *et al.* J Bacteriol, 1990, **172**: 3609 ~ 3619.
- [6] Fry N K, Warwick S, Saunders N A, *et al.* J Gen Microbiol, 1991, **137**: 1215 ~ 1222.