

ITS 序列同源性在苏云金芽孢杆菌分型中的应用研究*

辛玉华 东秀珠** 吴明强***

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要: PCR 扩增了苏云金芽孢杆菌 9 个亚种的 16S-23S rRNA 基因转录间隔(ITS)片段,它们的长度均为 144 碱基;序列同源性分析结果指出这 9 个亚种及其它亚种的 ITS 序列高度相似,说明 16S-23S rRNA 基因的 ITS 序列不适用于苏云金芽孢杆菌亚种的分型。

关键词: rRNA 基因, ITS 序列, 苏云金芽孢杆菌分型

中图分类号: Q93-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0178-04

COMPARATIVE SEQUENCE ANALYSIS OF ITS FOR THE DIFFERENTIATION OF *BACILLUS THURINGIENSIS* SUBSPECIES

XIN Yu-Hua DONG Xiu-Zhu WU Ming Qiang

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Abstract: The 16S to 23S ribosomal intergenic spacer (ITS) fragments of *Bacillus thuringiensis* subspecies were amplified by PCR. The PCR products of 9 subspecies were shown to be only one per subspecies and all were identical in sizes (144bp). Sequence analyses also showed quite high similarities among all the amplified ITS fragments, indicating that ITS sequence comparison is not a suitable tool for differentiating *Bacillus thuringiensis* subspecies.

Key words: rRNA gene, ITS sequences, *Bacillus thuringiensis*

苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)是一种产芽孢的革兰氏阳性杆菌,在芽孢形成期可产生一种或多种蛋白的伴孢晶体,能够杀死鳞翅目、双翅目和鞘翅目昆虫的幼虫^[1]。因而被作为生物杀虫剂广泛用于农、林害虫的生物防治中。

苏云金芽孢杆菌与蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的生理生化特征十分相似,但前者产生杀虫蛋白和广泛的应用性而被分为一个独立的种。苏云金芽孢杆菌亚种或型的划分主要是依据其鞭毛抗原的血清型^[2]。1994 年法国巴斯德研究所“国际昆虫病原芽孢杆菌中心”公布了 45 个 H 型共 58 个 H 型亚种^[3],1996 年又增至 55 个

血清型^[4]。不同血清型的杀虫谱和毒力不同。然而血清学方法的工作量大,且不能用于无鞭毛的菌株,同时蜡状芽孢杆菌与约 30% 苏云金芽孢杆菌的鞭毛抗血清有交叉反应。因而近年来人们尝试着将多种化学分类和分子生物学的手段用于苏云金芽孢杆菌的分型,如多位点酶电泳(MME)、脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析基因组及随机引物 PCR(AP-PCR)的 DNA 指纹图谱法。

* 中国科学院回国人员择优基金和中国科学院微生物研究所所长基金资助

** 通讯作者

*** 现为华东理工大学硕士研究生

收稿日期:1999-02-16, 修回日期:1999-09-21

16S-23S rRNA 基因间隔序列 (ITS) 被认为在生命进化中所承受的选择压力较小, 序列变化较大, 是用于细菌种间或种内分型的理想工具。Jensen 等 (1993) 通过 16S-23S rDNA 的 ITS 多态性对包括 8 个属和 28 个种或血清型的 300 株细菌进行了快速鉴定^[5], 这些细菌包括李斯特氏菌、葡萄球菌、大肠埃希氏菌、沙门氏菌等。他们的结论是 (1) 16S-23S rRNA 基因间隔序列 (ITS) 适用于种及以下的分类单位的划分; (2) 由于不同细菌 rRNA 基因的拷贝数目不同, 及不同的 rRNA 基因的 ITS 的长度不同, 它们所产生的 ITS 带谱也不同。Leblond-Bourget 等 (1996) 分析了 20 种双歧杆菌的 16S-23S rRNA 的 ITS 序列同源性, 结果表明同一种不同株之

间的 ITS 的最大差异是 13%^[6]。

本研究选择了苏云金芽孢杆菌 9 个参考标准血清型的菌株, 对其 16S-23S rDNA 的 ITS 进行了序列同源性分析, 并与其他血清型已发表序列进行比较, 结果表明苏云金芽孢杆菌不同血清型间的 16S-23S rDNA 的 ITS 序列差别很小, 不足以设计鉴别亚种的核酸探针, 也不适于亚种的分型。

1 材料与方法

1.1 菌株

实验中所有的苏云金芽孢杆菌标准菌株 (表 1) 由南开大学生命科学院微生物系任改新教授提供。

表1 用于ITS序列分析的苏云金芽孢杆菌标准菌株的亚种和序列

苏云金芽孢杆菌亚种 (H血清型)	ITS序列来源
<i>B. thuringiensis</i> subsp. yunnanensis (H20)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. shandongiensis (H22)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. japonensis (H23)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. neoleonensis (H24)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. coreanensis (H25)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. silo (H26)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. mesicanensis (H27)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. monterrey (H28)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. amagiensis (H29)	本研究
<i>B. thuringiensis</i> subsp. kurstaki coll. 1.20.91	Bourque <i>et al.</i> ^[9]
<i>B. thuringiensis</i> subsp. kurstaki coll. 3.5290	Bourque <i>et al.</i> ^[9]
<i>B. thuringiensis</i> subsp. kurstaki coll. 1.9.90	Bourque <i>et al.</i> ^[9]
<i>B. thuringiensis</i> HD225	Genbank/EMLB/DDBJ
<i>B. thuringiensis</i> DSM2049	Genbank/EMLB/DDBJ
<i>B. cereus</i> ATCC14576	Genbank/EMLB/DDBJ

1.2 染色体 DNA 的提取和纯化

用 5mL 过夜培养的苏云金芽孢杆菌的肉汁培养液接种于 200mL 肉汁培养基中, 30℃ 摇床培养 6h, 加入 80 万单位的青霉素后继续培养 2h, 然后离心 (5000r/min) 收集菌体。DNA 的提取和纯化按照 Marmur (1961) 的方法进行^[7]。

1.3 PCR 扩增 16S-23S rRNA 的 ITS 片段

PCR 的正反向引物 RI 和 RII 由微生物所生物技术中心合成。RI: 5' ACGCCAGCTGCTGGATCACCTCCTTTCT3' 相应于 *E. coli* 16S

rDNA 的 1525~1443 碱基片段, RII: 5' ACGC CAGCTGCTGGTGCCAAGGCATCCA3' 相应于 *E. coli* 23S rDNA 的 23~40 碱基片段。50μL 的 PCR 反应体系包括 200ng 的染色体 DNA 模板, 正反向引物 RI 和 RII 各 50pmol, dTTP、dATP、dCTP 和 dGTP 各 50μmol, 2U 的 Taq DNA 聚合酶及 Taq DNA 聚合酶的缓冲液 (2.5mmol/L Mg⁺⁺)。PCR 扩增条件是, 94℃ 变性 1min, 52℃ “退火” 1min, 72℃ 延伸 1min, 共 30 个循环。PCR 反应由 Thermolyn DNA 扩增

Bc ATCC14576	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATA-AAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT 60
Bt HD225	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATA-AAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
Bt DSM2049	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H20	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H21	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H22	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H23	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H24	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H25	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H26	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATA-AAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H27	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
H28	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
k1. 20. 91	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATA-AAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
K3. 5290	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT
K1. 9. 90	ATGGAGAATTGATGAACGCTGTTTCATCAATATAAGTTTCCGTGTTTCGTTTGTTCAGTT

Bc ATCC14576	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG 120
Bt HD225	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
Bt DSM2049	TTGAGAGA-CTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAA-CTAGATAACAGTGTAG
H20	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H21	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H22	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H23	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H24	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTGCGCTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H25	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H26	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H27	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
H28	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
k1. 20. 91	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
K3. 5290	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG
K1. 9. 90	TTGAGAGAACTATCTCTCATATATAAATGTATGTTCTTTGAAAAGTAGATAACAGTGTAG

Bc ATCC14576	CTCATATTTTTTAATTTTAAGTTT 144
Bt HD225	CTCATATTTTTTAATTTTAGTTT
Bt DSM2049	CTCATATTTTTTAATTTT-AGTTT
H20	CTCACATTTTTTAATTTT-AAATT
H21	CTCATATTTTTTAATTTT-AGTTT
H22	CTAATATTTTTAAATTTT-AGTTT
H23	CTCATATTTTTTAATTTT-AGTTT
H24	CTCATATTTTTTAATTTT-AGTTT
H25	CTCATATTTTTTAATTTTAGTTT
H26	CTCATATTTTTTAATTTTAAGTTG
H27	CTCATATTTTTTAATTTTAGTTT
H28	CTCATATTTTTTAATTTT-AGTTT
k1. 20. 91	TTGATATTTTTTAATTTTAGTTT
K3. 5290	TTGATATTTTTTAATTTTAGTTT
K1. 9. 90	TTGATATTTTTTAATTTTAGTTT
	* * ***** * * *

图1 苏云金芽孢杆菌9个亚种(Bt20, Bt22~29)、kurstaki亚种、Bt HD225、DSM2049及蜡状芽孢杆菌ATCC14576的16S-23S rDNA的ITS序列比较

仪(Barnstead Thermolyn, Dubuque, 美国)完成。Taq DNA 聚合酶和 dNTP 均购于华美北京生物工程公司。

1.4 16S-23S rDNA 的 ITS 序列测定

16S-23S rDNA ITS 的 PCR 产物按经典的方法^[8]经 1.5% 的琼脂糖电泳分离和电泳脱纯化后,在微生物所生物技术中心的 ABI373A-18 DNA 测序仪上进行序列测定。

1.5 序列相似性分析

通过软件 Clustalw (版本 1.5)将测定的 ITS 序列及从 Genbank/EMBL/DDBJ 得到的有关序列进行校准并排,并计算序列间的相似性。

2 结果与讨论

苏云金芽孢杆菌 9 个亚种的 16S-23S rDNA 的 ITS 的 PCR 产物只有一个,且测序结果标明它们的长度均为 144 个碱基(图 1),尽管已知一些芽孢杆菌的种含有多拷贝的 *rrn* 操纵子,并且在枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)中测定有两种长度不同的 16S-23S rDNA 的 ITS 片段^[10]。大肠杆菌中含有 7 个 *rrn* 操纵子,有两种长度不同的 16S-23S rDNA 的 ITS 分别为 480 和 540 个碱基,并且在不同的 *rrn* 操纵子的 ITS 含有不同的 tRNA 基因;金黄色葡萄球菌不同菌株的 ITS 长度各不相同,从 425 至 705 碱基不等^[8];但蜡状芽孢杆菌不同菌株的 ITS 的指纹图谱却十分一致^[11]。

从图 1 可知,所测定的苏云金芽孢杆菌不同亚种的 16S-23S rDNA 的 ITS 的序列高度相似(相似性在 97% 以上),虽然少数位置的碱基在不同亚种间有差异,但不足以设计特异性探针用于亚种的鉴别,显然 16S-23S rDNA ITS 的序列比较不适于苏云金芽孢杆菌种内的分型。由图 1 还可看到苏云金芽孢杆菌和蜡状芽孢杆菌间的 16S-23S rDNA ITS 的序列也高度相似,进一步表明了二者密切的亲缘关系。

尽管如此,苏云金芽孢杆菌基因组 DNA 的

RAPD(或 AP-PCR)指纹图谱却差异很大^[12],可作为区分苏云金芽孢杆菌不同亚种的有效工具。由此可见,尽管与相邻的 16S 和 23S rRNA 基因相比,ITS 属于“高度可变”的片段,但与其他基因组片段相比,这段序列仍较为保守,适用于鉴别种间或更高级的分类阶元。另外,由于人类对不同种群细菌研究的程度不同,对它们分类阶元划分的标准也不尽相同,因而用于一种类群细菌的有效鉴别方法并不意味着适用于另一类群的同等级的分类阶元。如 ITS 可有效地鉴别双歧杆菌同一种的不同菌株,但却不能区别苏云金芽孢杆菌不同亚种。

参 考 文 献

- [1] 刘崇乐,傅贻玲,任改新等. 苏云金杆菌研究的五十年. 北京: 科学出版社, 1962, 1~11.
- [2] Barjac H de, Bonnefou A. Entomophaga, 1962, 7:5~31.
- [3] Catalogue of strain No. 1, Collection of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus*, International Entomopathogenic Bacillus Center. Institut Pasteur, France. 1994.
- [4] Catalogue of strain No. 1, International Entomopathogenic Bacillus Center. Institut Pasteur, France. 1996.
- [5] Jensen M, Webster J A, Straus N. Appl Environ Microbiol, 1993, 59(4):945~952.
- [6] Leblond-Bourget N, Phillippe H, Mangin I et al. Inter J System Bacteriol, 1996, 46(1):102~111.
- [7] Marmur J. J Mol Biol, 1961, 3:208~218.
- [8] 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1996, 318~321.
- [9] Bounque S N, Valero J R, Lavoie M C et al. Appl Environ Microbiol 1995 61:1623~1626.
- [10] Green C J, Stewart G C, Hollis M A et al. Gene, 1985, 37:261~266.
- [11] Daffonchio D, Borin S, Frova G et al. Inter J system Bacteriol, 1998, 48:107~116.
- [12] Brousseau R, Saint-Onge A, Prefontaine G et al. J Appl Environ Microbiol, 1993, 59:114~119.