

同功酶电泳图谱在放线菌分类中的应用研究*

徐丽华 段若玲 张云峰 崔晓龙 陆正福 姜成林

(云南省微生物研究所, 云南大学 昆明 650091)

摘要 从国内外收集部分放线菌的典型菌种, 研究它们 6 种同功酶的凝胶电泳图谱。并进行了聚类分析。与现有分类方法比较, 讨论了同功酶图谱应用于放线菌分类的可能性及相关的问题。认为同功酶电泳图谱可以作为分类方法之一在放线菌分类中应用。

关键词 同功酶图谱, 放线菌分类

分类号 Q93.33

生物体都存在功能相同, 但分子结构和大小不同的酶, 即同功酶。这种结构和大小的不同, 反应了基因结构的不同。也就是说, 同功酶的性质可从一个侧面反应不同生物间的遗传信息和系统演化上的关系。在相同的生物种内, 同功酶应该很相似。利用电泳技术将不同结构大小的同功酶分离, 再进行活性染色, 在胶片上就显现出不同的图谱。因此, 从理论上讲, 同功酶图谱可以作为生物分类的方法之一。同功酶图谱已成功应用于高等动植物^[1], 真菌, 酵母和细菌^[2~7]的分类, 重现性好, 结果可靠。我们在进行双孢放线菌属分类研究的同时, 收集了与该属相关的不同细胞壁类型的放线菌, 研究了它们的六种同功酶凝胶电泳图谱, 并与全细胞蛋白图谱和数值分类的结果进行了比较研究。

1 材料和方法

1.1 菌种来源

本实验所用菌种大多来源于 ATCC, IFO, DSM, NRRL, CCRC 和 CCCC 等菌种保藏中心, 一部分是本室发表过的典型菌。还有一部分是本室从云南和新疆等地土样中分离到的双孢放线菌属的新菌株。

1.2 同功酶提取、凝胶电泳及染色

菌株用酵母膏-麦芽膏营养液震荡培养至对数期。4000r/min 离心 10min 收集菌体, 蒸馏水洗 2~3 次, 菌体悬于 0.1mol/L 的 Tris-HCl

(PH7.5) 缓冲液, 加 0.1mm 的玻璃砂少许, 用玻璃匀浆器匀浆 10min, 破碎细胞。15000r/min, 4℃ 离心 20min。上清液(酶液)存于 -20℃ 备用。

按 Maurer^[8]的方法制备聚丙烯酰胺凝胶。分离胶 7.5%, PH8.9, 样品胶 3.0%, pH6.7 电泳缓冲液含 0.005mol/L 的 Tris 和 0.038mol/L 甘氨酸, pH8.3。电泳条件为 10~20Am/胶板, 电泳 5~6h。

研究的同功酶有 6 种: 乙醇脱氢酶(ADH), 苹果酸脱氢酶(MDH), 谷氨酸脱氢酶(GDH), 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-PDH), 脂肪酶(EST) 和过氧化物歧化酶(SOD)。按 Wendel 等^[9~11]的方法染色。然后用 583 型干胶仪干燥胶板。用相对移行率(Rm)表示酶带的相对位置, 绘出同功酶图谱。

1.3 全细胞蛋白凝胶电泳

按 Jackman^[12]的方法进行。

1.4 数值分类原始特征

按姜成林等^[13]的方法进行形态特征、培养特征及生理生化实验, 共选用 82 项原始特征。

1.5 聚类分析

同功酶图谱、全细胞蛋白图谱及数值分类资料分别用 UPGMA 聚类分析程序进行处理, 绘制树状图^[13]。

* 国家自然科学基金资助项目

1997-11-25 收稿

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

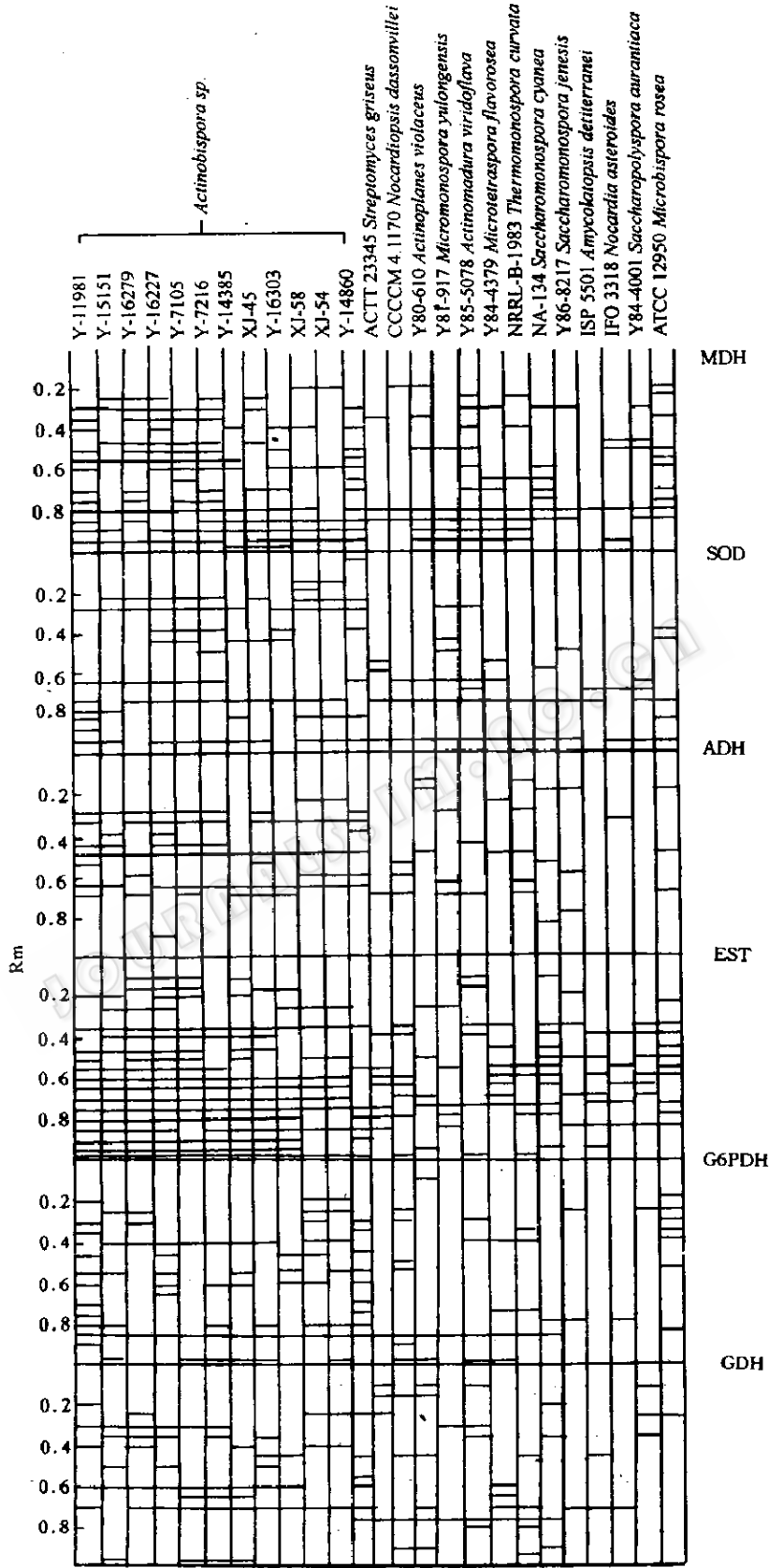


图1 25株放线菌的6种同功酶凝胶电泳图谱

2 结果及讨论

2.1 各种同功酶的凝胶电泳图谱

25株放线菌的6种同功酶凝胶电泳图谱示于图1。

在所测定的6种酶中;EST酶谱图酶带最丰富,一株菌中最多的有18条带,最少的有5条带,有14条酶带是大多数双孢放线菌共有的。其中有12株双孢放线菌具有Rm值为0.35,0.75,0.95的三条酶带,有11株双孢放线菌都有0.6,0.65,0.70,0.85酶带。在此项检测中双孢放线菌属的菌株具有极高的相似性,通过聚类分析,该属的菌株分布非常集中,其他相关属也均聚集在一起。

其次是MDH酶图谱。在一株菌中最多的有13条酶带,最少的仅有1条酶带。Rm值0.80的酶带为24株实验菌共有。此外在双孢放线菌属中,有11株菌具有Rm和0.95的酶带,有9株菌具有Rm0.60和0.85的酶带,聚类分析的

结果双孢放线菌属被分割为两大群,其他相关菌属分散在中间。

在SOD酶图谱里,25株实验菌中有22株具有Rm值0.75和0.95两条酶带。12株双孢放线菌中有11株具有Rm值0.30的酶带,有10株具有0.75和0.95酶带,聚类分析的结果,在双孢放线菌群中分散插入两株其他属的菌株,其他的相关菌属集中在一起。

在ADH酶图谱中,12株双孢放线菌均具有Rm值0.50酶带,有11株菌具有0.65酶带。G6PDH酶图谱的0.85处有19株实验菌具有此酶带,12株双孢放线菌中有11株具此酶带。GDH酶图谱0.70处,12株双孢放线菌中有11株具有此酶带,有10株双孢放线菌具有0.60酶带。

比较6种同功酶各单一酶谱的聚类结果表明,在EST酶图谱中双孢放线菌属不同种的分布最集中,其次是SOD、ADH和GDH酶谱;在双孢放线菌属内同一个种的不同菌株间的聚类

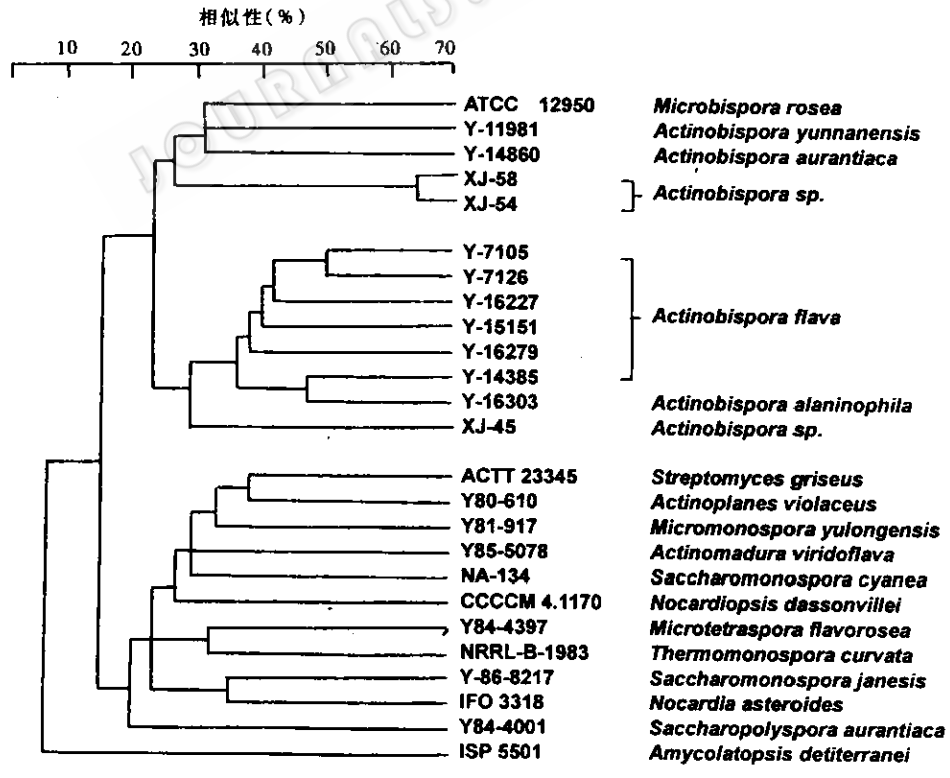


图2 25株放线菌的6种同功酶图谱UPGMA树状图

以 EST 酶谱最佳, MDH 和 GDH 酶谱次之, 其他几种酶谱的种群分布较分散。

综合 6 种同功酶全部结果的树状图(图 2)可以看出, 在 6% 的相似性水平上, 所有的 25 株实验菌可分为两个群和一个单株群。在 26% 相似性水平上, 全部双孢放线菌属的 12 株菌聚集为一群, 并形成 IA 和 IB 两个亚群。其它相关菌属则集中在第二群和一个单株群中, 并且相同细胞壁类型的不同菌属分布也比较集中。

2.2 与全细胞蛋白图谱的比较

23 株放线菌的全细胞蛋白聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)图谱聚类分析结果(图略)表明, 在 56% 相似性水平上, 全部实验菌可分为 3 个大群和 6 个单株群。9 株双孢放线菌分散于 3 个大群和一个单株群中。与同功酶聚类树状图比较的结果表明: 在全细胞蛋白图谱树状图中, 尽管菌株间总体相似性水平较高, 但聚类分群的效果欠佳。9 株双孢放线菌被分散在各群中, 且相同细胞壁类型的不同菌属分布也很分散。因此我们认为同功酶图谱做为分类方法之一, 较全细胞蛋白电泳图谱更有效。

2.3 与数值分类的比较

29 株放线菌的数值分类结果(图略)是在 57% 相似性水平上所有 15 个菌属的 29 株实验菌可分为 3 个大群和一个单株群。在 76% 相似水平上, 集中了全部双孢放线菌菌株, 分别在 95%、90%、80% 和 77% 相似水平上, 形成两个亚群和两个单株群。其他相关菌属的菌株分布于另外的亚群或大群中。与同功酶聚类树状图比较, 数值分类树状图中各实验菌的相似性较高, 双孢放线菌属的菌株均呈紧密结合状, 其它相关属中同一属内的菌株也紧密地排列在一起。虽然在同功酶聚类树状图中, 全部菌株的相似性水平普遍很低, 但同一菌属内的菌种分布仍比较集中, 属内同一个种的不同菌株在树状图中聚集较好, 结果近似于数值分类树状图。此外相同细胞壁类型的不同菌属分布也较集中。

以上三种分类方法的结果综合比较如下:

	数值分类	全蛋白图谱	同功酶图谱
电泳条带	—	极多, 较难分辨	较少、较易分辨
重现性	最好	较差	较好
相似性水平	最高	较高	较低
聚类效果	最好	较差	好
分类效果	最佳	较差	好

综上所述, 所测定的 6 种同功酶图谱, 就单独一种酶谱的聚类效果而言, 以 EST, SOD 和 ADH 为佳; 而 6 种同功酶谱综合起来, 酶带总数就达 80 多条, 综合进行聚类分析, 分类效果就好得多, 且与数值分类结果很接近。因此同功酶图谱可以作为放线菌分类的方法之一。它比全细胞蛋白图谱的重现性好得多。同功酶图谱测定具有方法简单, 试剂便宜, 不需要特殊仪器等优点, 适合于一般实验室开展分类工作。特别值得注意的是在做同功酶图谱时, 菌龄、酶液制备和电泳条件均应尽可能标准化, 以保证结果的重现性和可靠性。因此我们建议将同功酶图谱作为放线菌分类方法之一, 结合其他分类方法, 综合起来进行分类研究。

致谢 Williams S T 教授, Lechevalier H A 教授和 Lechevalier M P 教授, Labeda D P 教授, Stackebrandt E 教授, 阮继生教授, 胡润茂教授, 分别赠送部分放线菌的典型菌株, 李启任教授和田永强同志参加部分工作, 在此表示衷心谢意。

参 考 文 献

- [1] Tanksley S D, Orton T J. Isozymes in plant genetics and breeding Part A, Amsterdam: Elsevier, 1983.
- [2] Berchev K, Izmirov K. Experimentia, 1967, 23:961~962.
- [3] Douglas H C, Grindall D P, Markin J S. J Bacteriol, 1969, 99:287~290.
- [4] Garber E D. Isr J Med Sci, 1974, 10:268~277.
- [5] Yamazaki M, Komagata K. Int J Syst Bacteriol, 1981, 31:361~381.
- [6] Sidenberg D G, Lachance M A. Int J Syst Bacteriol, 1983, 33:822~828.
- [7] 许晓东, 陈文新. 微生物学通报, 1996, 23(3): 131~

- 135.
- [8] Maurer H R. Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide electrophoresis. 2nd. Berlin, W. G (Eds.). New York. 1971.
- [9] 王中仁. 植物等位酶分析. 北京: 科学出版社, 1996.
- [10] Weeden N F, Wendel J F. Genetics of plant isozymes in Soltis, D E, & Soltis P S (Eds.), *Isoenzymes in plant biology* portland, Oregon, Dioscorides Press. 1986, 46~72.
- [11] Wendel J F, Weeden N F. Visualization and interpretation of plant isozymes. In Soltis, D E & Soltis, P S (Eds.), *Isozymes in plant biology*. Portland, Oregon, Dioscorides Press. 1989, 5~45.
- [12] Jackman P G H. Bacterial taxonomy based on electrophoretic whole-cell protein pattern. In chemical methods in bacteria systematics. 1985. 115~129. Edited by Goodfellow M & Minnikin D E. London: Academic Press.
- [13] 姜成林, 徐丽华, 许家雄. 放线菌分类学. 昆明: 云南大学出版社, 1995, 92~104.

A STUDY ON APPLICATION OF ISOENZYME PATTERNS IN ACTINOMYCETE CLASSIFICATION

Xu Lihua Duan Ruoling Zhang Yunfeng Cui Xiaolong
Lu Zhengfu Jiang Chenglin

(Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming, Yunnan 650091)

Abstract The comparative studies of numerical classification, electrophore pattern of protein and six isoenzymes of whole cell of 12 strains of the genus *Actinobispora* and the type strains of 13 related genera were carried out. The result indicated that isoenzymes pattern is a simple and convenient method, and the method can be used in Actinomycete classification.

Key words Isoenzymes pattern, Actinomycete Classification