

地衣芽孢杆菌 16S rRNA 基因的 TD-PCR 扩增及系统发育分析*

马 凯 刘光全 程 池**

(中国食品发酵工业研究院 中国工业微生物菌种保藏管理中心 北京 100027)

摘要 运用 16S rRNA 基因序列分析了中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)保存的 30 株地衣芽孢杆菌的系统发育关系,结果显示 24 株菌株位于地衣芽孢杆菌系统发育分支,3 株菌株位于蜡状芽孢杆菌-苏云金芽孢杆菌系统发育分支,1 株菌株位于枯草芽孢杆菌系统发育分支,2 株菌株与其它地衣芽孢杆菌菌株间序列同源性为 96.4%~97.4%,明显低于其它地衣芽孢杆菌菌株间同源性,分类地位不明确,有待进一步讨论。通过比较分析 16S rRNA 基因 5'端 500bp、3'端 500bp 以及其全基因的系统发育树,表明 16S rRNA 基因 5'端 500 bp 可以很好的代表全基因序列进行系统发育研究,可用于区分地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌分支。

关键词 地衣芽孢杆菌,TD-PCR,16S rRNA 基因,系统发育

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)04-0709-03

The TD-PCR and Phylogenetic Analysis of *Bacillus licheniformis* 16S rDNA*

MA Kai LIU Guang-Quan CHENG Chi**

(China Center of Industrial Culture Collection, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027)

Abstract 16S rDNA sequences of 30 *Bacillus* strains originally identified as *Bacillus licheniformis* from China Center of Industrial Culture Collection (CICC) were determined and analyzed. The results indicated that 24 strains are affiliated to *Bacillus licheniformis*, 3 strains are affiliated to *Bacillus cereus* and 1 strain is affiliated to *Bacillus subtilis*; the similarity levels of 16S rDNA among the rest of 2 strains and other strains of *Bacillus licheniformis*, range from 96.4% to 97.4%, further tests are needed to clarify their position. Also we testified that 5' terminal 500bp of 16S rDNA is available to differentiate the strains of *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*.

Key words: *Bacillus licheniformis*, TD-PCR, 16S rRNA gene, Phylogeny

地衣芽孢杆菌是常用工业微生物生产菌种,在纸浆发酵、高温淀粉酶生产、蛋白酶生产和氨基酸生产等领域发挥重要作用。地衣芽孢杆菌的功能基因,比如纤维素酶^[1]、蛋白酶^[2]、 α 淀粉酶^[3]、谷氨酸脱氢酶^[4]等都得到了克隆表达。由于地衣芽孢杆菌安全性高、生长快速以及抗逆能力强等特点,所以被广泛用于动物饲料添加剂和酶制剂行业^[2]。中华人民共和国农业部 658 号公告也把地衣芽孢杆菌列入安全饲料添加剂目录。目前具有肠道免疫调节功能的地衣芽孢杆菌菌剂胶囊已经上市。

芽孢杆菌属种类较多,位于芽孢杆菌属第二群^[5]的一些物种与地衣芽孢杆菌表型及生理生化特征非常接近。尤其是一些有毒的种或未证明安

全性的种,用单纯的表型分类方法不易与地衣芽孢杆菌区分,运用分子生物学方法快速有效区分地衣芽孢杆菌和相近物种显得非常重要。本文运用 16S rRNA 基因系统对 CICC 保藏的 30 株“地衣芽孢杆菌”系统发育分析。同时,比较了 16S rRNA 基因 5'端 500bp、3'端 500bp 以及 16S rRNA 全基因序列系统发育树,并通过整理数据对枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌的区分提出一些观点。

1 材料与方法

1.1 菌株来源和培养条件

实验所用菌株共 30 株,均来自 CICC^[6]。实验菌株培养所用培养基均为营养肉汁/葡萄糖培养

* 国家科技基础条件平台项目(No. 2005DKA21204)

** 通讯作者 Tel: 010-64666552, E-mail: cheng100027@163.com

收稿日期: 2006-11-27, 修回日期: 2007-01-07

基^[6]。保藏菌种活化后划线纯化,挑取单菌落接种到20mL液体培养基中,30℃ 200r/min培养15h。

1.2 试剂

Taq酶、dNTPs、DNA marker 购自天为时代生物有限公司;GoldView 购自北京塞百盛基因技术有限公司;溶菌酶、蛋白酶 K、CTAB、SDS 购自北京华绿渊生物技术发展公司。

1.3 基因组 DNA 提取和 16S rRNA 基因的扩增及检测

基因组 DNA 提取方法参照文献 [7]。16S rRNA 基因序列扩增引物由上海生物工程有限公司合成。引物序列如下:正向引物 27F:5'-AGAGTTTGATC-CTGGCTCAG-3';反向引物 1541R:5'-AAGGAGGTG-ATCCACCC-3^[8]。运用 TD-PCR 扩增,反应程序:95℃ 5min;95℃ 1min,58℃ 1min,-0.5℃/cycle,72℃ 1min,20 cycles;72℃ 5min;94℃ 1min,48℃ 1min,72℃ 1min,15 cycles;72℃ 5min;4℃ 保存。反应体系为 100 μL:Taq(5U/μL)0.8 μL;10×PCR Buffer (Mg²⁺ Plus)10 μL;dNTP Mixture(2.5 mmol/L/each)8 μL;模板 DNA 2.5ng;引物 1(10 μmol/L)2μL,引物 2(10 μmol/L)2μL,超纯水补足至 100 μL。

1.4 序列测定、分析及系统发育树的构建

纯化后的 PCR 产物用 ABI3700 基因测序仪测序。测序由上海基康生物工程有限公司完成。测序结果用 Chromas 软件参照正反序列图谱人工校对。由 GenBank 获得芽孢杆菌属相关菌株 16S rRNA 基因序列,以 Clustal X^[9]进行序列比对后,用 MEGA3.1 的 Neighbor-Joining 法构建系统发育树^[10],并进行 1000 次 Bootstraps 检验。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取、PCR 扩增与序列测定

提取的基因组 DNA 片段大于 23kb,满足 PCR 扩增的需求。基因组 DNA 稀释 50~100 倍后用于 PCR 扩增,采用降落 PCR(TD-PCR)扩增 16S rRNA 基因序列,目的条带约为 1.5 kb(图 1)。PCR 产物纯化后进行序列测定,由上海生工公司完成。

2.2 序列分析和系统发育树的构建

以蜡状芽孢杆菌 *B. cereus* ATCC 14579^T 为外群,构建了 30 株“地衣芽孢杆菌”、部分枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌的 16S rRNA 基因系统发育树,序列一致长度为 1371bp(图 2)。系统发育树显示 3 个

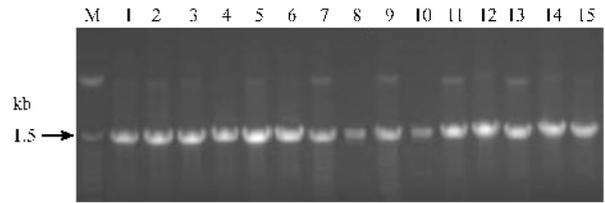


图 1 供试芽孢杆菌代表菌株 16S rRNA 基因 TD-PCR 扩增结果图示

系统发育分支:26 株地衣芽孢杆菌与 *B. licheniformis* DSM13^T 聚为一群;CICC 10020 与 *B. subtilis* NCDO1469^T 聚为一群;CICC 10059、CICC 10184、CICC 10185 与 *B. cereus* ATCC 14579^T 聚为一群。24 株地衣芽孢杆菌与 *B. licheniformis* DSM13^T[10] 16S rRNA 基因序列同源性大于 99.0%;CICC 10094 和 CICC 10180 间序列同源性为 98.8%,与其它菌株间序列

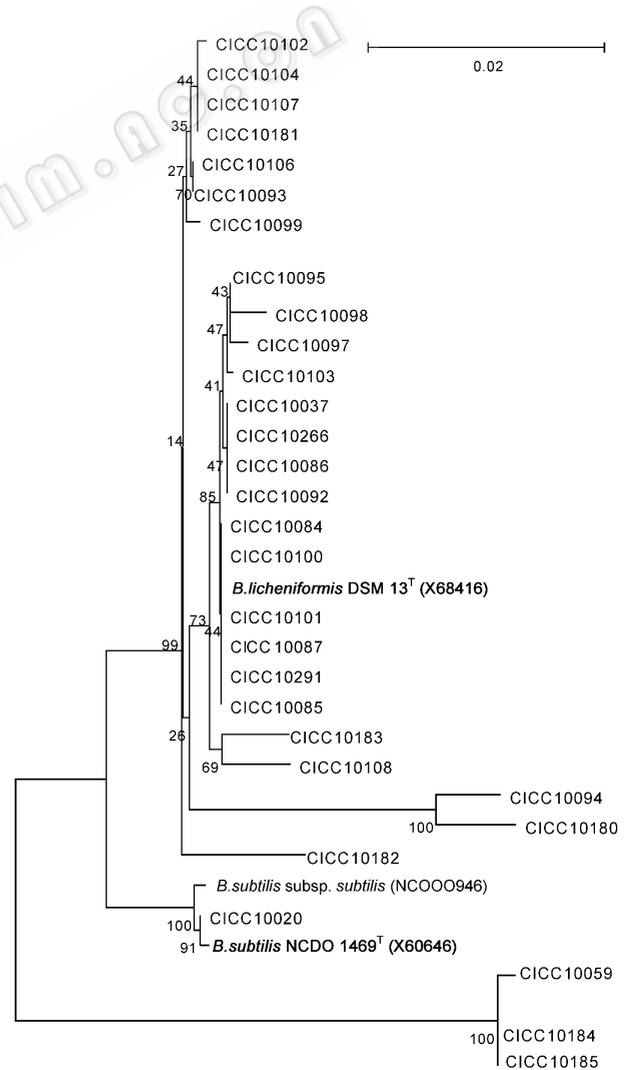


图 2 地衣芽孢杆菌菌株和相关菌株

16S rRNA 基因的系统发育树

同源性为 96.4% ~ 97.4% , 与 *B. subtilis* NCDO1469^[10] 间序列同源性分别为 95.9% 和 96.0% ;CICC 10059、CICC 10184 和 CICC 10185 与 *B. cereus* ATCC 14579^T 的序列同源性均大于 99.0%。

2.3 部分和全长 16S rRNA 基因系统发育分析比较

分别利用 1371bp、5'端 500bp 以及 3'端 500bp 的 16S rDNA 序列分析了地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌菌株间的系统发育关系。3 个系统发育树显示相似的拓扑结构,地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌菌株形成 3 个独立分支。图 3a 显示 26 株地衣芽孢杆菌与 *B. subtilis* NCDO1469^[10] 间序列同源性为 97.4% ~ 98.5% , 平均为 97.9% ;图 3b. 显示 26 株地衣芽孢杆菌与 *B. subtilis* NCDO1469^T 间序列同源性为 96.8% ~ 98.5% , 平均为 96.4% ;图 3c 显示 26 株地衣芽孢杆菌与 *B. subtilis* NCDO1469^T 间序列同源性为 98.5 ~ 98.7% , 平均为 98.6%。结果表明 16S rRNA 基因序列 5'端 500bp 可以代表全基因序列进行系统发育分析,且其分辨率高于全基因序列。

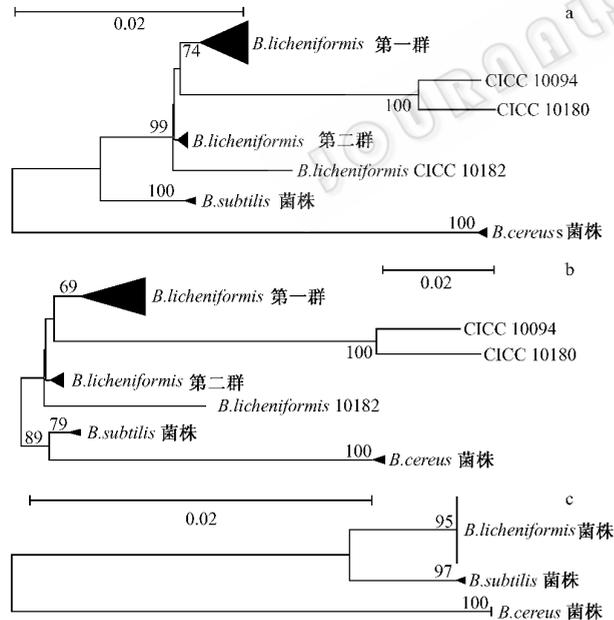


图 3a 1371bp 16S rRNA 基因序列显示的地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌的系统发育关系

图 3b 5'端 500bp 16S rRNA 基因序列显示的地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌的系统发育关系

图 3c 3'端 500bp 16S rRNA 基因序列显示的地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌的系统发育关系

3 讨论

本研究运用 16S rRNA 基因分析了 CICC 保存的 30 株“地衣芽孢杆菌”的系统发育关系,结果显示:24 株菌株位于地衣芽孢杆菌系统发育分支,3 株菌株位于蜡状芽孢杆菌 - 苏云金芽孢杆菌系统发育分支,1 株菌株位于枯草芽孢杆菌系统发育分支,2 株与其它地衣芽孢杆菌菌株间序列同源性为 96.4% ~ 97.4% , 明显低于其它地衣芽孢杆菌菌株间同源性,分类地位不明确,有待进一步讨论。通过比较分析 16S rRNA 基因 5'端 500bp、3'端 500bp 以及全基因的系统发育树,表明 16S rRNA 基因 5'端 500 bp 序列可以代表其全基因序列进行系统发育研究,可用于区分地衣芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌以及蜡状芽孢杆菌 - 苏云金芽孢杆菌。

同时,16S rRNA 基因系统发育分析显示:16S rRNA 基因序列的系统发育分析可以有效区分地衣芽孢杆菌 - 枯草芽孢杆菌群、蜡状芽孢杆菌 - 苏云金芽孢杆菌群,但是两群内种间同源性较高,前者为 98% 左右,后者大于 99%。所以建议在区分这些相似性较高的种时最好考虑表型特征,例如把是否厌氧生长作为区分地衣芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌的重要特性,把形态学观察作为区分蜡状芽孢杆菌 - 苏云金芽孢杆菌的重要特征。

参考文献

- [1] 刘永生,冯家勋,段承杰,等.广西农业生物科学,2003,22:195~200.
- [2] 王海丰,张义正.四川大学学报,2002,39:948~951.
- [3] 刘永生,张杰,马庆生.沈阳农业大学学报,2003,34(4):284~287.
- [4] 朱冰,愈冠翹,朱家壁,等.中国科学(C辑),2000,30:401~411.
- [5] Ash C, Fergus G P, Collins M, D. Antonie van Leeuwenhoek, 1993, 64: 253~260.
- [6] 食品与发酵工业,中国工业微生物菌种目录.2001,增刊,27:4~5.
- [7] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. In: Ausubel F M, Bent R, eds. Current Protocols in molecular biology, New York: J Wiley, 1987.
- [8] 周煜.生物技术通讯,1999,10:297~305.
- [9] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T. J Nucleic Acids Research, 1994, 22:4673~4680.
- [10] Pettersson B, Shyama K, de S Mathias U, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 50: 2181~2187.