

一株海洋细菌 MZ0306A1 的 16S rDNA 扩增及序列分析

闵 怀¹, 黄 备², 刘小宇³, 许强芝³, 唐静亮², 胡颖琰², 王婕妤²

(1. 浙江省环境保护科学设计研究院, 浙江 杭州 310007; 2. 浙江省舟山海洋生态环境监测站, 浙江 舟山 316004; 3. 解放军第二军医大学, 上海 200433)

摘要:PCR 技术应用于环境监测具有快速、灵敏、准确、简便、特异性强等特点, 被广泛应用于水体、气体和土壤的环境污染监测中。将此方法应用于海洋细菌监测中, 从浙江南部沿海表层海水中分离到一株海洋细菌 MZ0306A1, 利用细菌通用引物对其 16S rDNA 进行扩增。琼脂糖凝胶电泳检测目的 DNA 片段约为 1.5 kb。测序后将所测得的序列在 NCBI 网站中进行相似性搜索, 得到该细菌的结果与 *Halomonas variabilis* strain DSM 3051 的相似性最高, 为 97%, 故命名为嗜盐单胞菌属。该细菌的 16S rDNA 序列已经提交 GenBank, 序列收录号为 EU124745。

关键词: 浙江沿海; 海洋细菌; 16S rDNA 序列分析

中图分类号: S944

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2008)10-0013-05

经典的微生物分类鉴定采取的主要方法是从菌株的形态学、生理生化反应特征以及免疫学特性加以鉴定。但这些经典的方法存在一些难以克服的困难, 随着微生物分类学进入了分子生物学时代, 人们已逐渐认识到仅依靠形态、生理、生化等特征所进行的分类与鉴定缺乏基因水平(分子层面)的数据作支持, 存在一定的局限, 不能为微生物的分类与鉴定提供充分有力的证据^[1]。

原核生物核糖体 16S rRNA(16S rDNA) 基因, 是最早应用于海洋学研究的核酸分子, 也是目前用得最多的序列。Woese 等^[2] 1987 年就通过 16S rRNA/rDNA 序列对微生物及其他生物门类的系统发生学关系进行了分析, 并将地球上所有生物划分为真细菌生物域、古菌生物域和真核生物域, Pace 和 Stahl^[3] 也提出通过可以直接分析海洋细菌的 16S rRNA/rDNA 序列来确定其种属, 无需经过培养步骤。近 20 年的研究发现 16S rRNA/rDNA 基因有其特殊的优点: 首先该基因在所有的细胞生物中均存在, 同时具有相嵌的高度保守区域和可变异或高度变异的区域, 可以根据不同水平的分类来设计 PCR 引物, 根据序列的对比可以准确地确定物种之间的亲缘关系, 特别是对于较远的亲缘关系^[4]。

当前国际上已经建立了多个生物科学的核酸序列数据库(如 GenBank, EMBL, DDBJ 等)为微生物的分类鉴定提供了一个非常有用的参照系统, 通过对未知菌株进行 16S rRNA/rDNA 测序和比较分析, 可以达到分类与鉴定的目的, 而且通常将某一未知菌株的 16S rRNA/rDNA 序列与核酸序列数据库

中的已提交的 16S rRNA/rDNA 序列进行同源性比较, 便可初步确定该菌株的种属地位^[5]。

目前 16S rRNA/rDNA 序列同源性分析在海洋微生物分类鉴定工作当中发挥了很大的作用, 已经作为一种工具应用于海洋微生物的分类鉴定。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)是人类化脓感染中最常见的病原菌, 可引起局部化脓感染, 也可引起肺炎、伪膜性肠炎、心包炎等, 甚至败血症、脓毒症等全身感染。可用青霉素、红霉素类抗生素进行治疗, 但目前临床上已出现许多耐药菌株, 使金葡菌感染的治疗越发显得困难, 因此, 寻找新的抗金黄色葡萄球菌的抗生素已迫在眉睫, 本实验菌株 MZ0306A1 在抗菌活性测试中, 发现其发酵液对金黄色葡萄球菌有较强的抑制活性, 对枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)和埃希氏大肠杆菌(*Escherichia coli*)有弱抑制性(另文发表)。有可能可以开发成为新的抗生素来源。

本实验对这株具有抗金葡菌活性的菌株 MZ0306A1 进行了 16S rDNA 序列同源性分析, 初步确定了其分类进化地位。

1 材料与方法

实验菌株 MZ0306A1 从浙江南部离岸 30 n mile

收稿日期: 2008-07-29; 修回日期: 2008-08-22

作者简介: 闵怀(1963-), 女, 浙江湖州人, 高级工程师, 学士, 主要从事环境生物学方面的研究, 电话: 0571-87996721, E-mail: minhuail963@163.com; 黄备, 通讯作者, E-mail: bighb@163.com

的表层海水中分离得到,在 2216E 培养基上菌落呈黄色、扁平圆形、质地柔软、不透明等性状。革兰染色呈阴性。

1.1 主要仪器设备

Himac CR21 高速低温离心机(Hitachi 公司,德国);DK 8D 电热恒温水浴槽(上海医用恒温设备厂);CE2021 2000 系列 PCR 仪(Stratagene 公司,美国);PAC 3000 电泳仪(Bio Rad 公司,美国);凝胶成像系统(天能公司,中国)。

1.2 实验试剂及培养基配方

Primer A : 5'-AGAGTTTGATCCTGGCT-CAG-3'(上海生物工程公司);Primer B : 5'-TTA-AGGATGGTGATGCCGCA-3'(上海生物工程公司);Taq DNA 聚合酶、dNTP 混合物、PCR Buffer ($\times 10$)、Loading Buffer($\times 6$)(TaKaRa 公司);琼脂糖、EB(国药集团,中国);吸附柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、DNA Marker(博光生物科技有限公司,中国);2216E 培养基:蛋白胨 5 g,酵母膏 1 g,磷酸高铁 0.01 g,陈海水 1 000 mL,pH7.6~7.8。

1.3 实验方法

1.3.1 发酵培养

将斜面保存的 MZ0306A1 接种到含有 2216E 的液体培养基中,25℃,120 r/min 摇床培养。3 d 后收集培养液,5 000 r/min,10 min 离心,弃上清液。

1.3.2 菌株总 DNA 的提取

发酵液离心沉淀用 0.01 mol/L、pH7.0 的 PBS 缓冲液清洗 3 次,5 000 r/min,离心 10 min,弃上清,沉淀中加入 100 μ L 无菌水,常压煮沸 10 min,12 000 r/min,离心 10 min,上清即为菌株的 DNA 抽提液,可直接作为 PCR 模板^[6]。

1.3.3 16S rDNA 基因扩增

扩增引物:采用细菌通用引物^[7]进行 PCR 扩增。正向引物 Primer A(对应于 *Escherichia coli* 的 16S rDNA 5' 端 8~27f 位置):5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3';反向引物 Primer B(对应于 *E. coli* 的 16S rDNA 5' 端 1523~1504r 位置):5'-TTAAGGATGGTGATGCCGCA-3'。

PCR 反应体系:模板 DNA(1~3 μ g),1.0 μ L;10 $\times$ buffer (含 Mg^{2+}),5.0 μ L; dNTP (each 2.5 μ mol/L),5.0 μ L; Primer A (20 μ mol/L),1.0 μ L;Primer B(20 μ mol/L),1.0 μ L;Taq 酶,1.0 μ L;ddH₂O,36 μ L;Total,50 μ L。

PCR 扩增条件:

95℃	预变性 5 min	
95℃	变性 60 s	} 共 30~35 个循环
55℃	退火 60 s	
72℃	延伸 2 min	
72℃	后延伸 10 min	

1.3.4 扩增的 16S rDNA 产物胶回收

取 4 μ L PCR 反应物用 1.5% 琼脂糖凝胶 80 V 电泳约 30 min,紫外灯下观察条带位置。若在 1.5 kb 处有相应条带,证明已成功扩增。取 40 μ L 成功扩增的 PCR 产物同法电泳,在紫外光下迅速割下目标条带,然后利用上海博光生物科技有限公司吸附柱式琼脂糖胶 DNA 回收试剂盒进行胶回收。

1.3.5 序列测序

序列测定委托上海英骏工程公司完成。

1.3.6 GenBank Blast 相似性搜索和系统进化树的构建

将所测得的序列提交 GenBank,并在 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行相似性搜索。选取相似性较高的 19 个典型序列与 MZ0306A1 的 16S rDNA 序列进行比对,构建系统进化树,确定菌株进化位置。

2 实验结果

2.1 PCR 电泳检测结果

取 4 μ L PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测,电泳结果如图 1,目的片段约为 1.5 kb,说明已成功扩增。

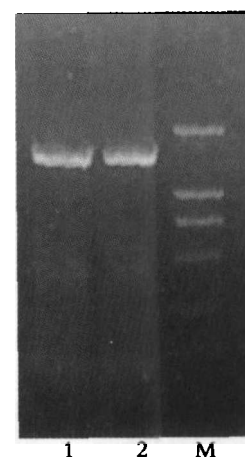


图 1 菌株 MZ0306A1 的 16S rDNA PCR 扩增产物的电泳图

Fig. 1 PCR product of 16S rDNA of strain MZ0306A1
M. DNA Marker;1,2. 16S rDNA PCR 扩增产物

M. DL2000 Marker;1,2. PCR product of 16S rDNA

2.2 序列测定结果

菌株的 16S rDNA 序列有 1 416 bp, 具体核苷酸序列见图 2。

2.3 序列分析结果

将测得的菌株 MZ0306A1 的 16S rDNA 序列提交 GenBank, 得到序列接受号为 EU124745。将其序

列与数据库中的数据进行 BLAST, 与 *Halomonas variabilis* strain DSM 3051 的相似性最高, 为 97%, 可以认为该菌株属于盐单胞菌属。选择了 19 个同源性较高的典型菌株序列, 利用 Clustal X 进行多序列比对, 再利用 MEGA 4.0 绘制进化树如图 3 所示。

```
TTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGGTCTAGCTTGCTAGACGCTGACGAGCGGCG
GACGGGTGAGTAATGCATAGGAATCTGCCCGGTAGTGGGGGATAACCTGGGGAAACCC
AGGCTAATACCGCATACTGCTACGGGAGAAAGGGGGCTTCGGCTCGCGCTATCGGAT
GAGCCTATGTCGGATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCACCAAGGCGACGATCCGT
AGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATCGGGACTGAGACACGGCCCGAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGCAACCCTGATCCAGCCATGCCG
CGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGCGAGGAAGAACGCCTGG
CGGTTAATACCCGCCAGGAAAGACATCACTCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTG
CCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAG
CGCGCGTAGGTGGCTTGATAAGCCGGTTGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAACG
GCATCCGGAAGTGTGAGGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAGGTAGAAATCCCGGTGTAGC
GGTGAATGCGTAGAGATCGGGAGGAATACCAGTGGCGAAGGCGGCCTTCTGGACTG
ACACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT
CCACGCCGTAAACGATGTCGACCAGCCGTTGGGTGCCTAGCGCACTTTGTGGCGAAGT
TAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAAT
TGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGA
ACCTTACCTACCCTTGACATCCTGCGAACCCGGAAGAGATTCCGGGGTGCCTTCGGGA
ACGCAGAGACAGGTGCTGTCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTAA
GTCCCGTAACGAGCGCAACCCTTGTCCTTATTTGCCAGCGAGTAATGTTGGGAAGTCTA
AGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCC
CTTACGGGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGTTGCGAACTCGC
GAGAGCAAGCCAATCCCAGAAAGCCGGTCTCAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGA
CTCCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCC
CGGGCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGACTGCACCAGAAGTGGTTA
GCAAACGCAAGAGGGCGTCACCACGGGCGG
```

图 2 菌株 MZ0306A1 的核苷酸序列

Fig. 2 The nucleotide sequence of the strain MZ0306A1

3 讨论

细菌的 RNA 尤其是 16S rRNA 具有高度保守性, 因此常通过比较细菌间 16S rRNA 的序列差异来揭示细菌之间差异及分类。1991 年国际细菌分类系统学委员会规定确定新的属、种必须进行 16S rRNA 序列分析或 RNA-DNA 杂交工作。对于微生物的分类鉴定, 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%, 可以认为属于不同的属^[8,9]。本实验中菌株

MZ0306A1 的 16S rDNA 序列与核酸数据库中的 *Halomonas variabilis* strain DSM 3051 的相似性最高, 可以认为该菌株是属于盐单胞菌属, 但由于其相似度小于 98%, 说明其有可能属于一个新种, 有待于进一步的研究, 包括 DNA-RNA 杂交等实验进行确认。

另外, 有关海洋环境中分离到盐单胞菌已有一些报道, 中国药科大学汪辉等^[10]从江苏连云港海域分离到一株细菌, 通过生化鉴定属于盐单胞菌属的某一种, 并且经实验分析该细菌的代谢产物具有一

定的抗菌活性和免疫增强功能,这与作者的研究结果很相似。很可能该类细菌在我国东南沿海广泛存

在,它的生物学和生态学特征有待于更进一步的研究工作。

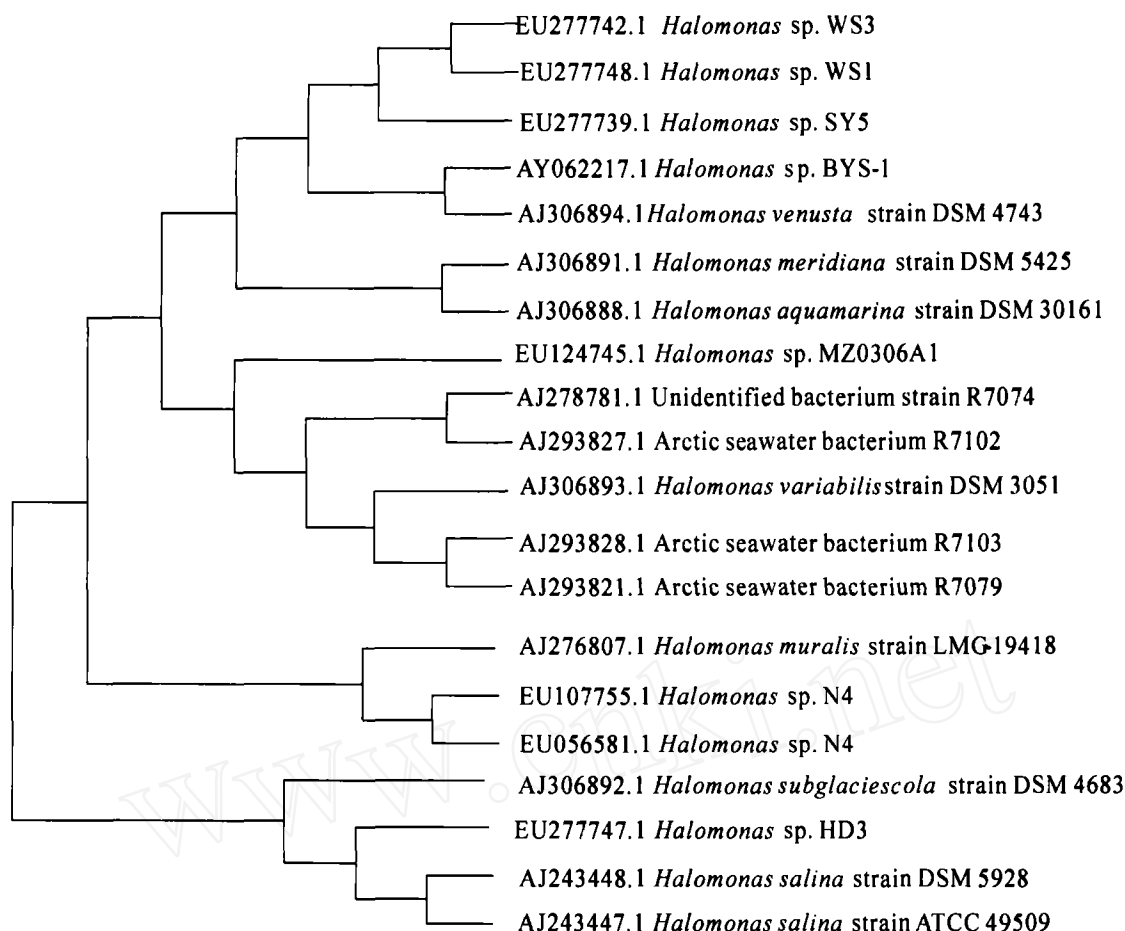


图3 MZ0306A1 的系统发育进化树

Fig. 3 The evolutionary tree of the strain MZ0306A1

参考文献:

- [1] 张会敏,冯友军.一株野生细菌的 16S rDNA 序列分析与系统发育树的构建 [J]. 生物信息学, 2005, 3(1): 1-4.
- [2] Woese C R. Bacterial evolution [J]. *Microbiol Rev*, 1987, 51: 221-271.
- [3] Pace N R, Stahl D A, Lane D L, *et al.* The analysis of natural microbial populations by rRNA sequences [J]. *Adv Microbiol Ecol*, 1986, 9: 1-55.
- [4] Martinez G J, Silvia G A, Ana I A, *et al.* Use of the 16S-23S ribosomal genes spacer region in studies of prokaryotic diversity [J]. *Microbiol Meth*, 1999, 36: 55-64.
- [5] 洪义国,孙谦,张云波,等. 16S rRNA 在海洋微生物系统分子分类鉴定及分子检测中的应用 [J]. 海洋水产研究, 2002, 23(1): 57-63.
- [6] 邹玉霞,张培军.大菱鲆出血症病原菌的分离和鉴定 [J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 89-93.
- [7] William G, Susan M Barns, Dale A, *et al.* 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study [J]. *J Bacteriology*, 1991, 173(2): 697-703.
- [8] Devereux R, He S H, Doyle C L, *et al.* Diversity and origin of *Desulfovibrio* species: phylogenetic definition of a family [J]. *J Bacteriol*, 1990, 172: 3 609-3 619.
- [9] Dean D O, James R. Identification of a gene, closely linked to dnaK, which is required for high-temperature growth of *Escherichia coli* [J]. *J Gen Microbiol*, 1991, 137(6): 7-1 271.
- [10] 汪辉,周长林.盐单胞菌的分离鉴定和活性研究 [J]. 药学进展, 2005, 29(6): 266-230.

The 16S rDNA amplification and sequence analysis of a marine bacterium MZ0306A1

MIN Huai¹, HUANG Bei², LIU Xiao-yu³, XU Qiang-zhi³, TANG Jing-liang², HU Hao-yan², WANG Jie-yu²

(1. Environment Science Research and Design Institute of Zhejiang, Hangzhou 310007, China; 2. Zhejiang Provincial Zhoushan Marine Ecological Environmental Monitoring Station, Zhoushan 316004, China; 3. Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Received: Jul. ,29,2008

Key words: the seaboard of Zhejiang province; marine bacterium; 16S rDNA sequence analysis

Abstract: PCR technique used in environmental monitoring has the character of rapidity, accuracy, simplicity and a strong peculiarity, which can be widely used in water, air and soil environmental pollution monitoring. This technique was used in marine bacteria monitoring in this paper. A marine bacterium MZ0306A1 was isolated from the surface layer of seawater of the southern Zhejiang province seaboard. The 16S rDNA sequence was gained by PCR using the general 16S rDNA primers. The 1.5% agarose electrophoresis showed the target fragment was about 1.5 kb. Neighbor-joining phylogenetic trees were drawn by comparing the results of 16S rDNA sequencing with sequences of described species in the BLAST server of the National Center for Biotechnology Information (NCBI). The strain MZ0306A1 was 97% similar to the *Halomonas variabilis* strain DSM 3051, which was named as *Halomonas* sp. The 16S rDNA sequence of MZ0306A1 had been submitted to the GenBank and the accession number was EU124745.