

海绵 *Pachychalina* sp. 体内古菌多样性非培养技术分析

方再光 黄惠琴 张开山 潘志强 鲍时翔*

(中国热带农业科学院 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘 要 采用非分离培养分析方法,即 16S rDNA 限制性酶切片段长度多态性(ARDRA)和测序方法对南海湛江海域海绵 *Pachychalina* sp. 体内的古菌多样性进行了研究。从海绵体内直接提取古菌总 DNA,以样品总 DNA 为模板,用古菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增获得 16S rDNA,回收、纯化 16S rDNA 产物并克隆到 T-Vector。进行第二次 PCR 扩增反应,且对扩增产物进行 ARDRA。在古菌 16S rDNA 的 ARDRA 图谱中,大多数克隆的酶切带谱上存在差异,随机挑选 8 个克隆子进行测序,获得古菌 16S rDNA 的部分序列,并对 16S rDNA 序列进行聚类分析构建了系统进化树,结果发现海绵体内的古菌主要属于 *Methanogenium organophilum*、*Methanoplanus petrolearius* 等古菌类。但它们与目前数据库中收录的古细菌间的相似性均不超过 90%,它们极有可能是一些新的古菌。

关键词 海绵 *Pachychalina* sp., 16S rDNA, ARDRA, 古菌多样性

中图分类号:Q931 文献标识码: 文章编号: 0001-6209(2005)01-0121-04

早期一直认为海洋古菌(Archaea)只生存于海洋的极端生境(高盐、高温、厌氧等)中^[1]。20 世纪 90 年代开始,人们发现古菌广泛地分布于大洋、近海、沿岸等非极端环境的海域,它们在海洋超微型浮游生物中占相当比例^[2],对海洋生态系统具有举足轻重的作用^[3]。此外,海洋生物体内也发现存在与之共生的古菌^[4]。

研究发现,古菌在海洋中的种类和数量分布极不平衡。一般而言,古菌大量存在于海水中,是海洋浮游生物的主要细胞组成^[5],而海洋沉积物中,除极端环境外,古菌仅占沉积物原核生物的 2.5%~8% 或更少。在类群分布上,不同海域存在不同的分布特点。有研究表明,太平洋表层海水多为广域古菌(*Euryarchaeote*),随深度增加嗜泉古菌所占比例高达 39%,而成为海洋浮游生物最丰富的细菌类群代表;相反,南极大地深海的浮游生物中,均存在海洋特有的古菌类型,以及其他一些新古菌的系统类型^[6],并已从各海域中分离获得许多新属种的古菌。其中产甲烷古菌(*Methanogenic archaeobacteria*)与硫酸还原古菌(*Archaeobacteria sulfate Reduces*)是海洋厌氧环境中碳硫循环的主要贡献者。

海绵动物作为一种最为古老的原生动物,对海洋生态系统具有重要的作用,海绵体内含有丰富的微生物资源,约占海绵生物总量的 40%,因此研究海绵体内微生物资源的多样性具有十分重要的意义。厚脂海绵(*Pachychalina* sp.)是一种在南海海域中较常见的海绵,本研究的主要目的是调查海绵 *Pachychalina* sp. 体内古菌群落组成,建立古菌 16S rDNA 的系统进化树,获得不依赖古菌人工分离培养方法的海绵古菌群落组成的多样性。

1 材料和方法

1.1 主要材料

PCR 扩增试剂购自鼎国生化试剂公司;古细菌通用引物 27F、915R、T7 和 SP6 由上海生工生物工程技术有限公司合成;UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司;pGEM-T 载体为 Promega 公司产品;银染试剂为国产分析纯。

1.2 样品采集

海绵采自南海湛江海域,经中国科学院海洋研究所鉴定为 *Pachychalina* sp.。用灭菌的塑料袋在水下采集海绵,用无菌水将表面清洗干净,−70℃ 处理 24h,然后低温真空干燥。

1.3 总 DNA 的提取和纯化

称取 1.5g 干燥的海绵组织,用 Webster 等^[6]采用的方法提取细菌基因组 DNA。

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增反应

根据古菌 16S rDNA 的保守序列,合成一对古菌特异性引物(通用引物):正相引物 25F(5'-CTGGTTGATCTGCCAG-3')和 915R(5'-GTGCTCCCCGCCAATTCCT-3')。在进行 PCR 反应前,将 PCR 反应混合物(不含模板 DNA)用限制性内切酶 *Alu* I 37℃ 处理 1h,然后 60℃ 处理 15min。PCR 反应体系:5.0μL 10×PCR Buffer,1.0μL 10mmol/L dNTPs,1.0μL 10mmol/L 引物 25F,1.0μL 10mmol/L 引物 915R,2U *Taq* 酶,总体积为 50μL。PCR 扩增条件:94℃ 3min;94℃ 50s,52℃ 1min,72℃ 1.5min,30 个循环;72℃ 10min。

1.5 克隆、转化、酶切和银染

PCR 扩增产物使用 DNA 快速纯化回收试剂盒进行纯化,

* 通讯作者。Tel 86-898-66890695;Fax 86-898-66890978;E-mail bshxhq@yahoo.com.cn

作者简介 方再光(1975-)男,博士研究生,主要从事南海海域海洋微生物方向的研究。E-mail zabslont@hotmail.com

收稿日期 2004-04-07,修回日期 2004-07-09

再与 pGEM-T 载体连接,连接产物转入感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli* XL1)。挑取阳性菌株用 pGEM-T 载体克隆位点两端的引物 T7 和 SP6 进行 PCR 扩增反应,反应体系: 5.0 μ L 10 \times PCR Buffer, 1.0 μ L 10mmol/L dNTPs, 1.5 μ L 10mmol/L 引物 T7, 1.5 μ L 10mmol/L 引物 SP6, 单个阳性菌落, 1.0 μ L 2U/ μ L *Taq* 酶, 总体积为 50 μ L; PCR 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s 60 $^{\circ}$ C 1min 72 $^{\circ}$ C 1.5min 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段, 并用内切酶 *Hae* III 37 $^{\circ}$ C 酶切回收产物 3h。将酶切反应产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳, 采用两步银染法进行银染^[8]。

1.6 16S rDNA 测序和序列分析

从转化子中随机挑取 8 个古菌的阳性克隆进行测序, 古菌 16S rDNA 的序列编号依次为: Ar. 1、Ar. 3、Ar. 4、Ar. 9、Ar. 10、Ar. 11、Ar. 21、Ar. 23。测序工作由上海晶泰生物技术有限公司完成。采用 CLUSTALW 软件进行多序列匹配排列, 再使用 Treeconv(1.3b) 和 PHYLIP(v 3.57) 软件构建系统发育树。

2 结果

2.1 DNA 提取和 PCR 扩增

本实验从海绵体内提取得了比较满意的细菌总 DNA, DNA 大小约为 21.0kb。用通用引物 25F 和 915R 在含古菌基因组 DNA 模板的反应体系中扩增得到了目的片段, 而在用内切酶 *Alu* I 处理过的对照中扩增不出这一条带, 说明无明显非特异性扩增现象, 而且所扩增到的 16S rDNA 是真实可靠的(图 1-A: 1~3 为不同模板浓度上 PCR 扩增反应结果)。在阳性克隆子中, 用引物 T7 和 SP6 进行 PCR 反应, 扩增到一条大小约为 1.1kb 左右目的带(图 1-B, T-vector 上引物 T7 和 SP6 之间的 DNA 片段大小约为 209bp)。

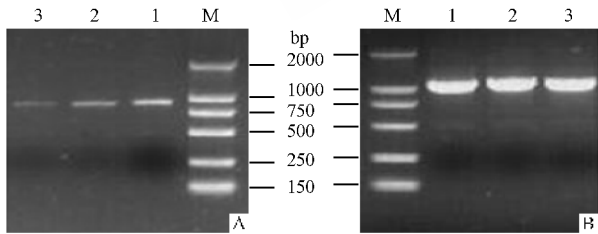


图 1 (A)古菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物 (B)16S rDNA 的再次克隆结果

Fig.1 (A) PCR amplification of total DNA with archaeal 16S rDNA universal primers; (B) Secondary PCR amplification of archaeal 16S rDNA with T7 and SP6

M: DNA Marker DL2000; 1~3 of (A): PCR amplification of archaeal 16S rDNA; 1~3 of (B): Secondary PCR amplification of Archaeal 16S rDNA.

2.2 银染

用引物 T7 和 SP6 从阳性克隆子中扩增目的片段, 并分别回收、纯化这些目标产物。然后用内切酶 *Hae* III 进行酶切, 采用两步银染法, 在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上获得了部分产

物的银染图谱(图 2)。实验结果揭示: 在所选择参与酶切分析研究的阳性克隆子中, 大多数阳性克隆所包含的古菌 16S rDNA 序列的 ARDRA 带型存在差异。根据阳性克隆所包含的古菌 16S rDNA 的 ARDRA 银染酶切图谱, 在一定程度上说明海绵体内的古细菌具有多样性。为了更好地揭示海绵体内古菌群落组成情况, 对阳性克隆所包含的古菌 16S rDNA 序列进行了测序分析。

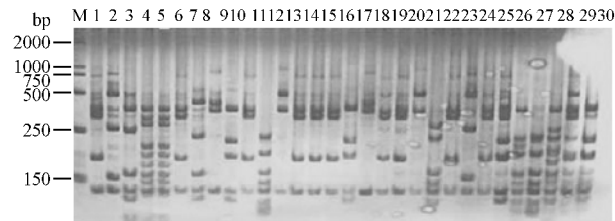


图 2 古菌 16S rDNA 的 ARDRA 银染结果

Fig.2 the silver-staining result of 16S rDNA restricted by *Hae* III
M: DNA Marker DL2000; 1~30: The bands of 16S rDNA restricted by *Hae* III.

2.3 古细菌 16S rDNA 测序以及系统发育分析

古菌 16S rDNA 共 49 个高度保守区, 其中在位点 250~915 之间的序列共有 23 个, 此外, 位点 500~545 处的 rRNA 功能区具有高度的保守性。因此, 介于 250~750 位点的古细菌 16S rDNA 可以比较准确地说明海绵体内古细菌在系统发育属的进化关系。我们对参与实验的古菌阳性克隆的 16S rDNA 的 25~915bp 区域进行了测序, 所测序列大小为 700bp, 介于古细菌 16S rDNA 的 25~700 位点之间, 含有古菌 16S rDNA 丰富的保守区。测序获得的 9 条古细菌的 16S rDNA 序列与 NCBI 网站所提供数据库中的古细菌 16S rDNAs 序列进行 BLAST 分析, 找到了与之相似性最高的古细菌。

用 Phylip's Drawgram 作图软件绘制 *Pachychalina* sp. 体内古细菌与 GenBank 数据库搜索到的、与之相似性最高的古细菌的系统发育树, 在系统树中(图 3), 它们可以分成 4 个不同的分支, 其中 Ar. 1、Ar. 11 和 Ar. 4 在系统发育树中属于同一个分支, 三者 16S rDNA 序列的相似性为 93%~96%, 它们与其余古细菌克隆子 16S rDNA 序列的相似性都小于 80%; Ar. 3 与嗜器官产甲烷菌(*Methanogenium organophilum*)古细菌属的古细菌构成一个分支; Ar. 9 与亨氏甲烷螺菌(*Methanospirillum hungatei*)古细菌属的古细菌构成一个分支; Ar. 23、Ar. 21 与嗜油产甲烷菌(*Methanoplanus petrolearius*)古细菌属的古细菌构成一个分支; Ar. 10 与别的古细菌之间没有什么相似性, 它与 RDP 数据库中古细菌 16S rDNA 序列的相似值仅为 0.12, 因此不参与系统发育树的构建。

3 讨论

用分子生物学的方法来研究海绵体内的细菌多样性, 是一种快速、简便和有效的方法。目前, 国内外研究微生物多样性最常用的分子生物学方法有细菌 16S rDNA 测序法、荧光原位杂交(FISH)和 16S rDNA 扩增片段限制性酶切分析

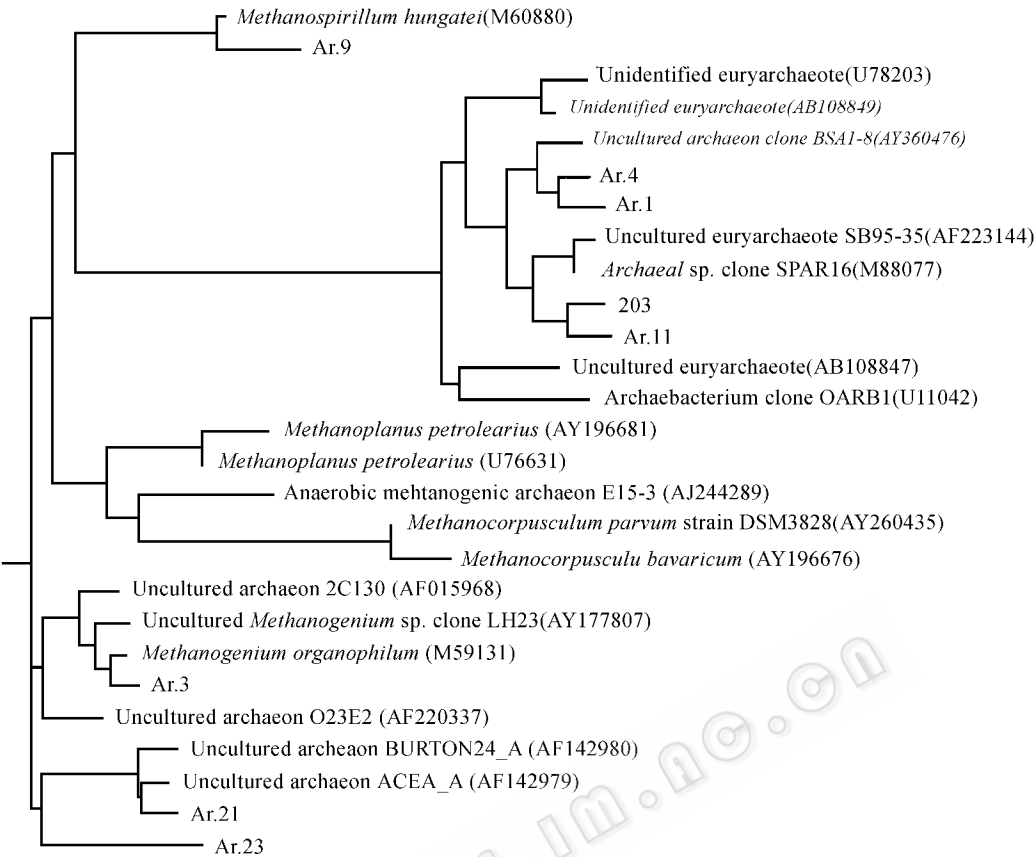


图 3 以 16S rDNA 序列为基础的厚指海绵 *Pachychalina* sp. 体内古细菌系统树

Fig.3 Phylogenetic tree of the archaea associated with the marine sponge *Pachychalina* sp. Evolutionary distances were calculated by the method with Kimura 2-parameter calculation model and the topology was inferred by the neighbor-joining method based on bootstrap analysis of 100 replicates.

(ARDRA),它们都能准确反映出环境样品中细菌的多样性^[6,7]。我们采用 16S rDNA 限制性酶切片段长度多样性分析方法对海绵 *Pachychalina* sp. 体内古菌的多样性进行了初步的研究,虽然单纯根据阳性克隆所包含的古菌 16S rDNA 的 ARDRA 银染酶切图谱,不能准确反映海绵体内微生物的多样性,但也在一定程度上说明海绵体内的古细菌具有多样性。

古菌 16S rDNA 序列分析方法在海洋古细菌的多样性和系统发育关系的研究中得到了广泛的应用。如范华鹏等^[8]研究了西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性,Christina 等^[9]研究了产自 Santa Barbara 海域海绵体内 crenarchaeon 的多样性。我们根据厚指海绵 *Pachychalina* sp. 体内古细菌 16S rDNA 的 8 个转化克隆子,对它们 16S rDNA 的 25 ~ 750 位点间的序列进行系统发育分析得知,海绵 *Pachychalina* sp. 体内古细菌主要属于 *Methanogenium organophilum*、*Archaeoglobus fulgidus*、*Methanoplanus petrolearius*、*Methanospirillum hungatei* 和 *Thermoplasmales acidophilum* 等 5 个古细菌属。其中 Ar.9 与亨氏甲烷螺菌属 *Methanospirillum hungatei* str. JF1 DSM 864 (T)^[10]的相似性为 98.8%,Ar.3 与嗜器官产甲烷菌属 *Methanogenium organophilum* str. CV DSM 3596 (T)^[11]的相似性

为 96.6%;Ar.21、Ar.23 与从油井中发现的嗜油产甲烷菌 *Methanoplanus petrolearius* SEBR 4847 (T)^[12]的相似性为 93.5% ~ 94.3%;Ar.1、Ar.11 属于嗜酸热原体属,但与嗜酸热原体属古细菌中已鉴定的 *Thermoplasmales acidophilum* clone SB95-72^[13]古细菌的相似性只有 86.5%,因此,认为它们是 *Thermoplasmales acidophilum* 古细菌属的一些新类型。

致谢 在该研究中,得到中国科学院海洋研究所李锦和教授和李新正教授的帮助,在此表示感谢。

参 考 文 献

[1] Munson M A , Nedwell D B , Embley T M . Phylogenetic diversity of Archaea in sediment samples from a coastal salt marsh . *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** : 4729 - 4733 .
[2] Karner M B , DeLong E F , Karl D M . Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean . *Nature* , 2001 , **409** : 507 - 510 .
[3] Orphan V J , Hinrichs K U , Ussler W , et al . Comparative analysis of methane-oxidizing archaea and sulfates-reducing bacteria in anoxic marine sediments . *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** : 1922 - 1934 .

[4]

Schleper C , Delong E F , Preston C M , *et al.* Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J Bacteriol* , 1998 , **180** : 5003 – 5009.

[5]

Lopez-Garcia P , Moreira D , Lopez-Lopez A , *et al.* A novel haloarchaeal-related lineage is widely distributed in deep oceanic regions. *Environ Microbiol* , 2001 **3** : 72 – 78.

[6]

Webster N S , Wilkson K J , Blackall L L , *et al.* Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol* , 2001 , **67** : 434 – 444.

[7]

Stefan , Weidner , Walter Arnold , *et al.* Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* , 1996 , **62** (3) : 766 – 771.

[8]

范华鹏 , 薛燕芬 , 马延和 , 等. 西藏扎布耶茶卡盐碱湖古菌多样性的非培养技术分析. *微生物学报* , 2003 , **43** (4) : 401 – 408.

[9]

Christina M , Ke Y , Tadeusz F , *et al.* A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge : *Cenarchaeum symbiosum* gen. Nov. sp. Nov. , *Proc Natl Acad Sci* , 1996 , **93** : 6241 – 6246.

[10]

Yang D , Kaine B P , Woese C R. The phylogeny of archaeobacteria. *Syst Appl Microbiol* , 1985 , **6** : 251 – 256.

[11]

Rouviere P , Mandelco L , Winker S , *et al.* A detailed phylogeny for the methanomicrobiales. *Syst Appl Microbiol* , 1992 , **15** : 363 – 371.

[12]

Ollivier B , Cayol J L , Patel B K C , *et al.* *Methanoplanus petrolearius* sp. nov. , a novel methanogenic bacterium from an oil-producing well. *FEMS Microbiol Lett* , 1997 , **147** (1) : 51 – 56.

[13]

Massana R , Murray A E , Preston C M , *et al.* Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara Channel. *Appl Environ Microbiol* , 1997 , **63** (1) : 50 – 56.

Archaeal diversity associated with sponge *Pachychalina* sp. analyzed by culture-independent approach

FANG Zai-guang HUANG Hui-qin ZHANG Kai-shan PAN Zhi-qiang BAO Shi-xiang*

(State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Haikou 571101 , China)

Abstract : With culture-independent approach , microbial total DNA was directly extracted from *Pachychalina* sp. Using the total microbial DNA as template , archaeal 16S rDNAs were amplified by PCR with universal primers. Amplified products were cloned into T-vector and secondarily amplified by PCR. Then the secondarily amplified products were purified to be further characterized by termed ARDRA (amplified rDNA restriction analysis , ARDRA). According to the enzyme restriction mapping , the apparent difference among them were disclosed. Further more eight archaeal cloned partial sequences were acquired and builded up a phylogenetic tree. In the phylogenetic tree , the eight archaea belonged to *Methanogenium organophilum* and *Methanoplanus petrolearius* , but the 16S rDNAs similarities among them and those archaea registered in RDP Database didn ' t excess to 90% . It means that they maybe represent some novel archaeal groups.

Key words : *Pachychalina* sp. , 16S rDNA , ARDRA , Archaeal diversity

* Corresponding author. Tel 86-898-66890695 ; Fax 86-898-66890978 ; E-mail :bsxhhq@yahoo.com.cn
Received date : 04-07-2004

本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
镇江东方生物设备技术有限公司	封底	北京陆桥技术有限责任公司	文前彩插Ⅲ
GE Healthcare Bio-sciences(原名 Amersham Biosciences)	封二	上海保兴生物设备工程有限公司	文前彩插Ⅳ
岛津(香港)有限公司	封三	镇江达森发酵设备有限公司	文后彩插Ⅰ
上海国强生化工程装备有限公司	文前彩插Ⅰ / Ⅱ	扬中市威柯特生物工程设备公司	文后黑白插Ⅰ