

# 糖单孢菌 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析\*

吕志堂\*\* 刘志恒

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** :PCR-RFLP 分析适用于种和种间水平的多相分类研究。文章对 PCR-RFLP 方法应用于糖单孢菌属分类的具体方法进行了探讨 ;报道了一组适于糖单孢菌属 PCR-RFLP 分析的限制性内切酶 ,并用这组酶对 6 株糖单孢菌属分离株进行了研究 ,进一步探讨了实验菌株在该属的分类地位。同时指出了 PCR-RFLP 方法应用中应注意的问题。

**关键词** :糖单孢菌属 ,16S rDNA ,PCR-RFLP 分析

中图分类号 :Q939.11 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2000)06-0567-72

糖单孢菌属(*Saccharomonospora*)是假诺卡氏菌科的一个属。该属是一类有重要生物活性的放线菌,其主要特征是 16S rDNA 序列在进化上形成一相关的群。通常该属的鉴定是首先从化学分类做起,然后再进行 16S rDNA 序列分析。但是,化学分类工作量大且耗费也大,16S rDNA/RNA 序列分析又很不经济,也没有必要进行大量菌株的序列分析<sup>[1]</sup>。所以,建立快速方便又较准确的分类方法显得十分必要。已报道,16S rDNA 的 PCR-限制性酶切片长度多型性分析(PCR-restricted fragments length polymorphism analysis, PCR-RFLP)可用于种到属水平的研究<sup>[2]</sup>。本文旨在探讨该方法应用于糖单孢菌属研究的可行性,并与已报道的方法进行比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种

糖单孢菌属 6 个种(含已并入 *Scm. azurea* 的“*Scm. caesia*”)的模式菌株 *Scm. azurea* JCM7551<sup>5</sup>、*Scm. cyanea* JCM7552<sup>T</sup>、*Scm. glauca* JCM7444<sup>T</sup>、“*Scm. caesia*” JCM3098<sup>T</sup>、*Scm. viridis* JCM3036<sup>T</sup>、*Scm. xinjiangensis* CCTCC AA97201<sup>T</sup> 及编号分别为 1、4、19.1、202、212 和 22.1 的糖单孢菌属分离株 6 株。

### 1.2 工具酶与试剂

Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、琼脂糖为 Promega 产品;溶菌酶、RNase 和蛋白酶 K 为 Merck 产品;其它化学试剂均为进口分装。

### 1.3 菌体的培养与收集

所有实验菌株均接种于 Sauton's 摇瓶,常温菌置于 28℃、高温菌置于 45℃ 摇瓶培养

\* 国家自然科学基金资助项目(39570002)

\*\* 现工作地址 河北大学生物系,保定 071002

作者简介:吕志堂(1973-)男,河北邯郸人,河北大学生物系助教,硕士,主要从事微生物资源及系统发育研究

收稿日期:1999-07-15,修回日期:1999-10-10

至对数期,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10000r/min 离心收集菌体, 分别用无菌水和 TE 缓冲液(10mmol/L Tris-HCl + 1mmol/L EDTA, pH7.6)离心洗涤两次。

#### 1.4 总 DNA 模板的提取

参考 Kim<sup>[3]</sup>报道的方法进行总 DNA 模板的提取。

#### 1.5 16S rDNA 的 PCR 扩增

16S rDNA 扩增用引物为通用引物(Lane, 1991)<sup>[4]</sup>, 正向引物为 27f, 反向引物为 1492r。引物的序列如下:

27f(对应于 *E. coli* 8~27 位碱基): 5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3';

1492r(对应于 *E. coli* 1492~1514 位碱基): 5'-TACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'。16S rDNA 扩增参照 Chun 报道的方法<sup>[5]</sup>进行。

#### 1.6 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析

PCR-RFLP 分析主要参照 Heyndrickx<sup>[6]</sup>的方法进行实验。

**1.6.1 PCR 产物的处理** (1) PCR 产物用酚:氯仿:异戊醇(25/24/1, v/v)抽提一遍, 再用氯仿抽提一遍(4 $^{\circ}\text{C}$ , 12000r/min  $\times$  5min), 然后用 2 倍体积冰乙醇沉淀 DNA, 以除去盐、聚合酶、多余的引物等。晾干后重溶于适量的去离子水中。(2) PCR 扩增完毕, 去油后不作任何处理, PCR 产物直接用于酶切。

**1.6.2 限制性内切酶的选择**: 从 GenBank/EMBL/DBJ 数据库调出糖单孢菌属的所有已注册的 16S rDNA/rRNA 序列, 尤其是各种模式菌株的序列, 选用不同的限制性内切酶用 DNASIS 软件进行模拟酶切(由于测序时可能存在的误差等因素, 模拟结果与实际酶切结果有时会不同)。由于放线菌 DNA 的 G + C mol% 较高, 所以尽量选用识别序列中 GC 多的内切酶来模拟; 另外, 由于 16S rDNA 的大小只有 1.5kb 左右, 因此应选识别 4bp 的序列或 5~6bp 序列, 且识别序列中 GC 较多的内切酶来模拟。

选定内切酶的原则是切出的多型性好, 各个种最好都有特异性酶切片段(酶切图谱), 或在经一组酶分别切后能产生特异片段(酶切图谱)。

**1.6.3 限制性内切酶酶切**: 用模拟酶切选定的内切酶 *Hha* I (*Cfo* I), *Hae* III、*Msp* I (*Hpa* II) 和 *Rsa* I 进行酶切。酶切按限制性内切酶所附说明进行。

**1.6.4 酶切产物的电泳分离**: 电泳条件如下: 2% 琼脂糖凝胶, 60V 电压连续电泳 2h; 所用电泳仪为 Pharmacia LKB. ECPS 3000/150 型。酶切产物的上样量为 15 $\mu\text{L}$ , 所用核酸分子量标准(Maker)为 1 kb DNA Ladder(GIBCO/BRL, USA)。

**1.6.5 电泳图谱分析**: 根据 Nei 和 Li<sup>[7]</sup>的分析方法, 菌株间 16S rDNA 的序列差异可用其电泳图谱中所共有的限制性片段所占的比值来估测, 根据这种比值可计算出菌株间的遗传距离。本研究利用 TREECON<sup>[8]</sup>软件包中的 UPGMA 方法对所得的遗传距离进行聚类分析, 得出反映菌株间发育关系的聚类分析树状谱。

## 2 结果和讨论

### 2.1 限制性酶切结果

16S rDNA 扩增产物用四种内切酶消化后酶切产物的电泳结果分别见图 1~4。

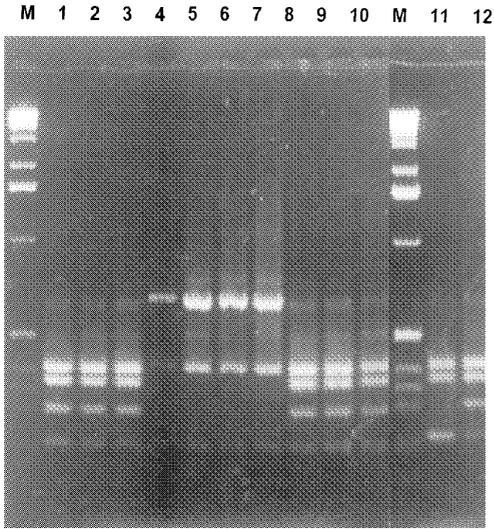


图 1 糖单孢菌属实验菌株及模式菌株 16S rDNA 的 *Hha* I 限制性酶切图谱

Fig.1 Restriction patterns of 16S rDNA of test strains and type strains of *Saccharomonospora* digested with *Hha* I. M. 1 kb DNA Ladder ; 1. Strain 1 ; 2. Strains 4 ; 3. Strain 19. 1 ; 4. Strain 202 ; 5. Strain 212 ; 6. Strain 22. 1 ; 7. *Scm. viridis* JCM3036<sup>T</sup> ; 8. "*Scm. caesia* " JCM3098<sup>T</sup> ; 9. *Scm. glauca* JCM7444<sup>T</sup> ; 10. *Scm. azurea* JCM7551<sup>T</sup> ; 11. *Scm. cyanea* JCM7552<sup>T</sup> ; 12. *Scm. xinjiangensis* CCTCC AA97021.

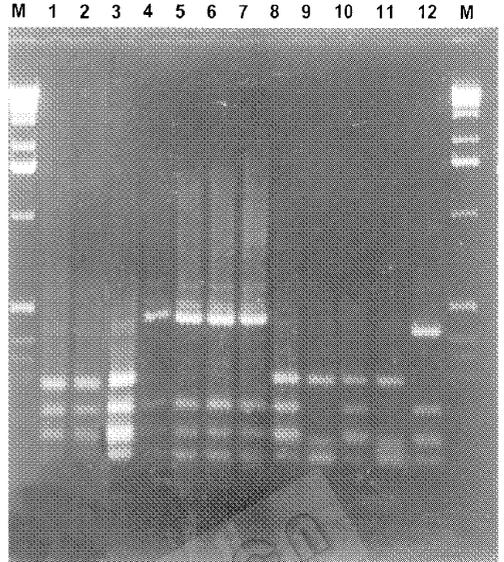


图 2 糖单孢菌属实验菌株及模式菌株 16S rDNA 的 *Msp* I 限制性酶切图谱

Fig.2 Restriction patterns of 16S rDNA of test strains and type strains of *Saccharomonospora* digested with *Msp* I. Lane 1 to lane 12 see Fig. 1.

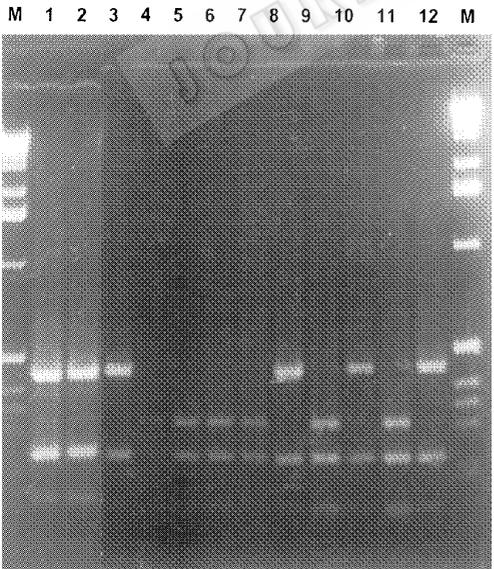


图 3 糖单孢菌属实验菌株及模式菌株 16S rDNA 的 *Hae* III 限制性酶切图谱

Fig.3 Restriction patterns of 16S rDNA of test strains and type strains of *Saccharomonospora* digested with *Hae* III. Lane 1 to lane 12 see Fig. 1.

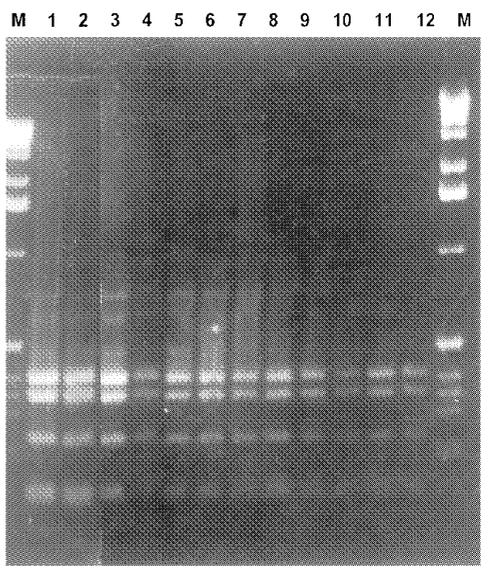


图 4 糖单孢菌属实验菌株及模式菌株 16S rDNA 的 *Rsa* I 限制性酶切图谱

Fig.4 Restriction patterns of 16S rDNA of test strains and type strains of *Saccharomonospora* digested with *Rsa* I. Lane 1 to lane 12 see Fig. 1.

## 2.2 讨论

由酶切图谱可知,包括实验菌株与模式菌株在内的所有糖单孢菌属菌株 16S rDNA 的 *Rsa* I 酶切图谱完全相同,说明 *Rsa* I 不适用于糖单孢菌属的 PCR-RFLP 分析,它不能将任何一种与其它种区分开。

16S rDNA 扩增产物分别用其余 3 种限制性内切酶(*Hha* I, *Msp* I 和 *Hae* III)酶切后,经电泳分离可得到 9 种酶切图谱类型;12 株菌的 16S rDNA 的 3 种酶切图谱类型共有 5 种遗传图谱类型(表 1)。其中菌株 1、4、19.1、*Scm. caesia* (JCM3098) 和 *Scm. azurea* (JCM7551) 具有相同的遗传图谱类型 I;菌株 202、212、22.1 和 *Scm. viridis* (JCM3036) 具有相同的遗传图谱类型 II;而 *Scm. glauca* (JCM7444)、*Scm. cyanea* (JCM7552) 和 *Scm. xinjiangensis* (CCTCC AA97021) 分别具有独特的遗传图谱类型 III、IV、V。

表 1 供试菌株的 16S rDNA PCR-RFLP 限制性酶切图谱类型及遗传图谱类型

Table 1 Restriction patterns of 16S rDNA PCR-RFLP and genetic patterns of tested strains

Strain	Restricted pattern of 16S rDNA			Genetic pattern of 16S rDNA
	<i>Hha</i> I	<i>Msp</i> I	<i>Hae</i> III	
Strain 1	a	d	h	I
Strain 4	a	d	h	I
Strain 19.1	a	d	h	I
Strain 202	b	e	i	II
Strain 212	b	e	i	II
Strain 22.1	b	e	i	II
JCM3036	b	e	i	II
JCM3098	a	d	h	I
JCM7444	a	f	i	III
JCM7551	a	d	h	I
JCM7552	c	f	i	IV
CCTCC AA97021	a	g	h	V

\* a~i indicate the different pattern types of RFLP; I~V indicate the different genetic patterns.

为进一步确定糖单孢菌属各种间及分离菌株在该属内的系统发育关系,将 16S rDNA 遗传图谱类型比较结果转化为遗传距离,采用平均连锁法进行聚类分析,得出聚类分析树状谱(图 5)。由树状谱可以看出,在 96% 的相似性水平上有效描述的 5 个种各自独立,说

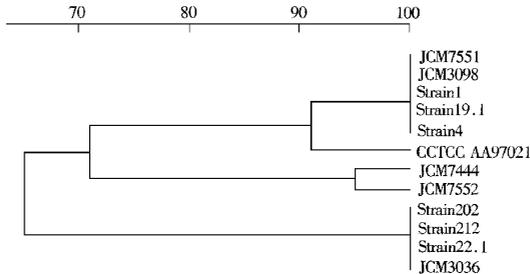


图 5 根据 ARDRA 分析(*Hha* I、*Map* I、*Hae* III 酶切)得出的糖单孢菌属的树状谱

Fig. 5 Dendrogram based on the UPGMA clustering of Sj of combined ARDRA patterns of representatives of the genera *Saccharomonospora* including the test strains as well as type strains with the restriction enzyme combination *Hha* I, *Msp* I and *Hae* III

明利用这三个酶切 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析可以有效地将糖单孢菌属已知的 5 个种区分开。由此推论,若利用这三个酶消化糖单孢菌属分离株的 16S rDNA 电泳后得到了不同于这 5 个种的谱型,则它极可能就是一个新种。

由实验结果可知,所选的这组(除 *Rsa* I 之外)内切酶进行 PCR-RFLP 分析对糖单孢菌属只适用于种一级水平,而不能将不同菌株有效地分开,要利用此方法确保在种级水平区分糖单孢菌属的不同种甚至还需要增加其它酶切的结果。选择限制性内切酶时应避免选择识别序列中 AT 比例高的酶,因这类序列常位于糖单孢菌序列的保守区,酶解物的多型性较差。

Yoon 等<sup>[9]</sup>利用两种识别 6 个碱基序列的内切酶进行了糖单孢菌属 16S rDNA 的 PCR-RFLP 分析,结果发现仅用 *Sma* I 和 *Mlu* I (*Sma* I 识别位点为 CCCGGG, *Mlu* I 识别位点为 ACGCGT)两种酶即可将糖单孢菌属的 4 个种区分开,酶切结果一般仅 1~3 条电泳带,多型性差,不可用于系统发育分析。推测,若将识别 6bp 的酶与识别 4bp 的内切酶结合使用,可望获得更多的特异性谱型。Yoon 等也认为,糖单孢菌属 PCR-RFLP 只能产生种特异的酶切图谱,而没有菌株特异的图谱。

分离菌株 1、4 和 19.1 与 *Scm. azurea*、*Scm. caesia* PCR-RFLP 谱型完全相同,202、212 和 22.1 与 *Scm. viridis* PCR-RFLP 谱型完全一致。由此可以得出如下结论:菌株 1、4、19.1 和 *Scm. azurea* 为同种或是同属内与 *Scm. azurea* 关系最近的(不同)新分类单元。同样可以得出这样的结论:202、212、22.1 与 *Scm. viridis* 为同种或是同属内与 *Scm. azurea* 关系最近的(不同)新分类单元。

包括 *Rsa* I 在内的 4 种酶切图谱中,“*Saccharomonospora caesia*”与 *Saccharomonospora azurea* 的带型均完全相同。这一结果与 Ribotyping 的结果是一致的,文献报道,二者具有完全相同的 16S rDNA 序列<sup>[31]</sup>。Yoorf<sup>[10]</sup>等发现其不同菌株间 DNA-DNA 杂交的同源性在 84%~95%,故将“*Saccharomonospora caesia*”归入 *accharomonospora azurea*。这与 PCR-RFLP 分析结论是一致的。

实验时同时进行了 PCR 产物直接酶切和酚:氯仿抽提,乙醇沉淀后酶切的对比,发现 PCR 产物直接酶切并不影响酶切效果。Yoorf<sup>[9]</sup>比较了不同方法处理 PCR 产物对酶切的影响,发现 PCR 产物经某些 DNA 纯化试剂盒纯化后的酶切效果并不比 PCR 产物直接酶解好(Sephaglas BandPrep kit 纯化后酶切结果无变化,GENECLEAN II 纯化后酶切效果更差),异丙醇沉淀虽然会使得酶切效果欠佳,但却能显示种间的差异。因此当进行 PCR-RFLP 分析时可不必将 PCR 扩增产物纯化处理,即可直接用于酶切,这使得该方法在试剂应用上显得更加方便。

## 参 考 文 献

- [1] Morón R, González I, Genilloud O. *Int J Syst Bacteriol*, 1999 **49**, 149~162.
- [2] Vandamme P, Pot B, Gillis M, et al. *Microbiological Reviews*, 1996 **60** 407~438.
- [3] Kim S B, Yoon J H, Kim H, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1995 **45** 351~356.
- [4] Lane D J. 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow. ed. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. Chichester: John Wiley & Sons, 1991. 115~147.
- [5] Chun J, Goodfellow M. *Int J Syst Bacteriol* © 1995, 45: 240. 微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [ 6 ] Heyndrickx M , Vauterin L , Vandamme P *et al.* *J Microbiol Methods* ,1996 **26** :247~259.
- [ 7 ] Nei M , Li W H. *Proc Natl Acad Sci USA* ,1979 **76** :5269~5273.
- [ 8 ] Van de Peer Y. , De Wachter R. TREECON for Windows : a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput Applic Biosci*1994 **10** :569~570.
- [ 9 ] Yoon J H , Lee S T , Kim S B , *et al.* *Int J Syst Bacteriol* ,1997 **47** :111~114.
- [ 10 ] Yoon J H , Kim S B , Lee S T , *et al.* *Int J Syst Bacteriol* ,1999 **49** :671~673.

## PCR-RFLP ANALYSIS OF THE GENUS *SACCHAROMONOSPORA* \*

Lu Zhitang Liu Zhiheng

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

**Abstract** : PCR-RFLP , a molecular method of polyphasic taxonomy of the genus *Saccharomonospora* was introduced. The feasibility of the application of this method at the species level in the taxonomy and identification of *Saccharomonospora* were discussed. The results showed that PCR-RFLP analysis is valuable for the determination of taxonomic position in the genus of some *Saccharomonospora* strains.

**Key words** : *Saccharomonospora* , 16S rDNA , PCR-RFLP

\* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund( 39570002 )

### 欢迎订阅《生物技术通讯》

《生物技术通讯》是军事医学科学院生物工程研究所主办的关于生物技术的中央级专业性学术刊物( 国内统一刊号 CN81 - 148/Q , 国际标准刊号 ISSN 1009 - 0002 ) , 主要报道生物技术( 生物工程 ) 及所有相关学科领域的最新科研成果与进展。主要栏目有 : 研究报告、技术方法、研究简报、专论、综述、论坛、讲座、经验交流等。读者对象主要为从事生物技术及其在生物医学、工业、农业、环保等领域应用的科研、教学、管理人员 , 大专院校相关专业师生及有关工程技术人员 , 以及其他对生物技术感兴趣的人员。欢迎订阅、欢迎供稿。

《生物技术通讯》( 季刊 ) 为大 16 开本 , 80 页 , 每期定价 9 元 , 全年 36 元。国内外公开发行 , 国内邮发代号 : 82 - 196 , 国外发行代号 1433Q。编辑部办理邮购业务。

邮政编码 : 100071 地址 : 北京丰台东大街 20 号

电话 ( 010 ) 66948856 ; 传真 ( 010 ) 63895646

电子信箱 : yanmf@ns.glc.cn biolett@bj163.com