微孔板杂交法测定椰毒假单胞酵米面 亚种的 DNA-DNA 同源性*

焦振泉¹ 刘秀梅¹ 杨瑞馥² 孟昭赫¹

(¹中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所 北京 100050)

(²中国军事医学科学院微生物与流行病学研究所 北京 100071)

摘 要 采用一种新的 DNA-DNA 杂交方法—微孔板法对椰毒假单胞菌酵米面亚种及伯克霍尔德氏菌属中 11 个种的 DNA-DNA 同源性进行测定。结果发现椰毒假单胞菌酵米面亚种与唐菖蒲伯克霍尔德氏菌及椰毒伯克霍尔德氏菌的 DNA-DNA 同源性均大于 75% ,建议这 3 个种应合并为同一个种,命名为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)。

关键词 :椰毒假单胞菌酵米面亚种, DNA-DNA 同源性, 微孔板法

中图分类号 :Q939.09 文献标识码 :A 文章编号 :0001-6209(2001)01-0070-06

椰毒假单胞菌酵米面亚种(*Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans*, 简称椰酵假单胞菌)是我国学者于 1977 年在东北酵米面中毒食物中发现的一种食物中毒菌(曾暂命名为酵米面黄杆菌^[1])。椰酵假单胞菌常常污染变质鲜银耳、酵米面、醋凉粉、汤圆粉和马铃薯粉等多种食品而引发食物中毒^[2],它的病死率高达 41.8% ,是迄今为止发现的病死率极高的一种食物中毒菌。1987 年 孟昭赫等^[3]从我国食物中毒样品中分离到的 200 多个菌株中选出 3 株典型的病原菌株与椰毒假单胞菌、铜绿假单胞菌、洋葱假单胞菌、贪食黄杆菌、脑膜炎黄杆菌及大肠埃希氏菌等进行了系统的生物学性状对比研究,发现除侧金盏花醇分解不一致外,其大部分生物学性状及产生米酵菌酸的性能与 1934 年印度尼西亚发酵可可豆制品食物中毒菌—椰毒假单胞菌(NCIB9450)类同,所以将原酵米面黄杆菌易名为椰毒假单胞菌酵米面亚种。1995 年 Gillis^[4]等建议将椰毒假单胞菌也划归伯克霍尔德氏菌属,命名为椰毒伯克霍尔德氏菌,同年赵乃听^[5]等根据椰酵假单胞菌 NCIB9451 的部分 16S rDNA 序列证实了上述观点。邱茂铎^[6]等的研究结果显示,椰酵假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的亲缘关系比与椰毒伯克霍尔德氏菌的亲缘关系更为接近。焦振泉^[7]等通过测定 4 株椰酵假单胞菌的 16S rDNA 序列并进行序列分析发现,椰酵假单胞菌与椰毒伯克霍尔德氏菌和唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的 16S rRNA 序列同源性非常高,它们构成了伯克霍尔德氏菌属系统发育进化树上一个独立分支。

近十多年来,细菌分类学发展迅速,已经从单一的表型分类发展为系统分类和多相分类,即利用表型、基因型和系统发育信息来区分细菌,进而阐述细菌的遗传进化关系。基

* 国家自然科学基金资助项目(39570619)

作者简介 焦振泉(1971-)男,河北唐山人,中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所助研,博士,1998 年赴日本岐阜大学合作研究,主要从事细菌系统分类学方面研究。

收稿日期:1999-12-29,修回日期:1999-04-07

因型分类方法中 $(G+C)$ mol%、DNA-DNA 杂交、rDNA 指纹图和 16S rDNA 序列分析是常用的方法,其中 DNA-DNA 杂交是细菌系统分类中定义种的一个最重要的指标。DNA-DNA 杂交的方法主要有:复性速率法^[8],SI 核酸内切酶分析法^[9],羟基磷灰石法^[10]等。其中,微孔板杂交法^[11]在国际上得到了越来越多的应用,它利用光敏生物素标记一株细菌的染色体 DNA,与另一株细菌的染色体 DNA 在微孔板上进行液相杂交,通过 β -半乳糖苷酶和 4-MUF 荧光显色系统进行荧光强度的检测,荧光强度的强弱即反应杂交率的高低,根据测得的荧光强度的数值来计算不同菌株 DNA-DNA 之间的杂交率。

本研究目的是利用微孔板杂交法测定椰毒假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、椰毒伯克霍尔德氏菌的 DNA-DNA 同源性,进而探讨它们在伯克霍尔德氏菌属中的位置和相互之间的遗传进化关系。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

实验选用 5 株椰毒假单胞菌和伯克霍尔德氏菌属中 12 个种的菌株,其中包括唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的 3 个不同致病型菌株、椰毒伯克霍尔德氏菌和洋葱伯克霍尔德氏菌的模式株等。各个菌株的菌株号及来源见表 1。

1.2 染色体 DNA 提取

将实验菌株接种于 PDA 固体培养基 37℃ 培养过夜;挑取单个菌落接种于 150mL 液体 LB 培养基中于 37℃、12r/min 振荡培养过夜;培养液在 8000r/min 离心 5min,弃去上清,稍干燥,将菌体重悬于 5mL 的 SE 缓冲液中(轻微操作),加入 10% SDS 溶液 1mL,于 65℃ 水浴 10min,可见菌体澄清透明;向菌悬液中加入等体积的饱和酚和二分之一体积的氯仿-异戊醇(24:1)充分振摇,脱蛋白 5min,9000r/min 4℃ 离心 10min 使溶液分层;吸取上层水相,并在水相中加入等体积的氯仿-异戊醇(24:1)重复脱蛋白 2 次,使中间无蛋白层;吸取上层水相,在水相中加入 10mg/mL 的 RNase 30 μ L,使其终浓度为 100 μ g/mL,于 37℃ 温箱中保温 1h;加入等

表 1 实验所用菌株

Table 1 Strains used in the study

Name of strains	Strain designation	Source
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	ATCC10248 ^T	USA
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	NCPPB947	New Zealand
<i>B. gladioli</i> pv. <i>agaricola</i>	NCPPB3580	New Zealand
<i>B. cocovenans</i>	NCIB9451 ^T	England
<i>B. cepacia</i>	ATCC25416 ^T	Japan
<i>B. plantarii</i>	JCM5492 ^T	Japan
<i>B. vandii</i>	JCM7957 ^T	Japan
<i>B. vietnamiensis</i>	LMG10929 ^T	Japan
<i>B. mallei</i>	ATCC23344 ^T	Japan
<i>B. pseudomallei</i>	ATCC23343 ^T	Japan
<i>B. thailandensis</i>	E264	Japan
<i>B. glathei</i>	ATCC29195	Japan
<i>B. phenazinium</i>	LMG2247 ^T	Japan
<i>P. cocovenans</i> subsp. <i>farinofermentans</i>		
HN2y		China
Co14		China
Sx8801		China
Co18		China
90-3		China

T:Type strain;

ATCC:American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA;

JCM:Japan Collection of Microbiology, Japan;

NCIB:National Collection of Industrial Bacteria, UK;

LMG:Culture Collection, Laboratorium voor Microbiologie, State University of Ghent, Ghent, Belgium.

体积的氯仿-异戊醇(24:1),充分振摇,9000r/min离心10min,重复脱蛋白至中间无蛋白层,吸取上层水相,加入2倍体积的95%乙醇,用玻璃棒将丝状染色体DNA缠在玻璃棒上,干燥,将DNA溶于2mL的蒸馏水中,置于-20℃保存。

1.3 待测DNA的包被

以Salmon DNA作为阴性对照,调整DNA的浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 在沸水中热变性5min,立即置于冰上冷却;用含0.1mol/L MgCl_2 的PBS缓冲液稀释待测DNA浓度为10 $\mu\text{g}/\text{mL}$,制成包被液。按100 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的体积加入微孔板的孔中,30℃作用过夜;弃去包被液,于45℃干燥后,置于4℃冰箱中保存。

1.4 待测DNA光敏生物素的标记

取待标记的DNA溶液,使其总量达到5 μg ,用乙醇进行沉淀,将沉淀与15 μL 的光敏生物素(333 $\mu\text{g}/\text{mL}$)充分混匀于1.5mL的离心管中,使沉淀完全溶解;将离心管置于冰上,打开盖子,在300W的灯下光照15min,保持液面与灯的距离为15cm;向离心管中加入0.1mol/L的Tris-HCl 200 μL 和200 μL 的正丁醇,涡流混匀;15000r/min离心5s,弃去上层粉红色醇相。

1.5 预杂交与杂交

取出微孔板,恢复至室温,按200 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 的体积加入预杂交液(10%的20 $\times$ SSC、5%的100 $\times$ Denhardt液、1%的100mg/mL变性鲑精DNA溶液、50%的甲酰胺, pH7.2),37℃作用10min,将光敏生物素标记的DNA溶液在沸水中热变性5min后,立即置于冰上冷却,然后加入3mL的杂交液(10%的20 $\times$ SSC、5%的100 $\times$ Denhardt液、1%的10mg/mL变性鲑精DNA溶液、50%的甲酰胺、2.5%的硫酸葡聚糖, pH7.2)充分混匀;弃去微孔板上的预杂交液,每孔加入0.1mL含有光敏生物素标记DNA的杂交液,45℃作用4h;弃去含光敏生物素标记DNA的杂交液,在自动洗板机上用1 $\times$ SSC按0.3mL/孔的体积进行洗板,重复3次;将 β -半乳糖苷酶用含0.5%BSA的PBS稀释1000倍后,每个孔中加入0.1mL,37℃作用10min;弃去酶反应液,在自动洗板机上用1 $\times$ SSC按3mL/孔的体积进行洗板,重复3次;将3MUF用PBS稀释100倍后,每个孔中加入0.1mL,37℃作用30min。

1.6 检测

在荧光检测器(TEF Corp. Ltd., Tokyo)上以激发光光谱为360nm,发射光光谱为450nm作为检测条件进行检测,以空白孔调零,利用检测器自动记录各试验孔的荧光强度值。

1.7 DNA-DNA同源性的计算

DNA-DNA同源性(%) = $100 \times (X - N) / (Max - N)$ 。Max:自身杂交的荧光强度测定值;N:作为阴性对照的Salmon DNA荧光强度测定值;X:样品荧光强度测定值。

2 结果

本实验用光敏生物素分别标记了唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的3个不同致病型菌株(含模式株)、椰毒伯克霍尔德氏菌及洋葱伯克霍尔德氏菌的模式株,利用微孔板杂交技术,选用45℃作为杂交温度获得了它们与椰酵假单胞菌和伯克霍尔德氏菌属中其它9个种菌株的DNA-DNA的同源性比值,结果如表2。

表 2 实验菌株的 DNA-DNA 同源性值

Table 2 DNA-DNA homology values of studied strains

Source of unlabelled DNA	DNA Homology values to labelled DNA				
	<i>B. gladioli</i>	<i>B. gladioli</i>	<i>B. gladioli</i>	<i>B. cocovenenans</i>	<i>B. cepacia</i>
	pv. <i>gladioli</i>	pv. <i>alliicola</i>	pv. <i>agaricicola</i>		
	NCPBP1891	NCPBP 947	NCPBP3580	ATCC33664	ATCC25416
<i>B. gladioli</i> pv. <i>gladioli</i>	100	94	84	81	46
NCPBP1891					
<i>B. gladioli</i> pv. <i>alliicola</i>	89	100	85	90	35
NCPBP 947					
<i>B. gladioli</i> pv. <i>agaricicola</i>	92	94	100	89	37
NCPBP3580					
<i>B. cocovenenans</i> ATCC33664	93	92	83	100	34
<i>P. cocovenenans</i> subsp. <i>farinofermantans</i> HN2y	81	90	84	78	31
Co14	89	90	85	83	48
Co18	89	92	82	93	52
Sx8801	93	89	81	94	31
90-3	90	87	83	85	44
<i>B. cepacia</i> ATCC25416	36	44	35	28	100
<i>B. vandii</i> JCM7957	42	32	25	46	36
<i>B. plantarii</i> JCM5492	38	33	40	41	34
<i>B. pseudomallei</i> ATCC23343	31	24	32	35	30
<i>B. mallei</i> ATCC23344	30	23	32	33	30
<i>B. thailandensis</i> GTC525	26	26	25	32	30
<i>B. vietnamiensis</i> LMG10929	47	40	36	39	50
<i>B. glathei</i> ATCC29195	28	21	23	30	29
<i>B. phenazinium</i> LMG2247	25	24	41	32	18

从表 2 中可以看出:所有实验结果都是以菌株自身的 DNA 同源性是 100% 作为基础的。待测菌株中,椰毒假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔氏菌的 3 个不同致病型菌株及椰毒伯克霍尔氏菌的 DNA 同源性都比较高(81%~94%)均大于 75%,而与洋葱伯克霍尔氏菌的 DNA 同源性则较低(31%~52%);唐菖蒲伯克霍尔氏菌 3 个不同的致病型菌株之间及它们与椰毒伯克霍尔氏菌之间的 DNA 同源性也很高(81%~94%),其中唐菖蒲伯克霍尔氏菌与椰毒伯克霍尔氏菌的模式株的 DNA 同源性为 93% 和 81%(以不同的菌种进行标记光敏生物素所得到的结果有一定的差别),而唐菖蒲伯克霍尔氏菌、椰毒伯克霍尔氏菌与伯克霍尔氏菌属中其它菌种菌株的 DNA 同源性则较低(21%~46%)洋葱伯克霍尔氏菌与椰毒假单胞菌和伯克霍尔氏菌属中的其它菌种的菌株的 DNA 同源性均比较低(18%~52%)。

3 讨论

DNA-DNA 分子杂交的方法很多,其中复性速率法的优点是不需要标记 DNA,但不能测定 T_m 值,而且低于 30% 在分类学上没有显著性意义,S1 核酸内切酶分析法和羟基磷灰石法测定结果的稳定性不好,需要大量的 DNA,并且费时。近几年来出现一些只需

要少量 DNA 的快速杂交方法^[11,13],正逐渐取代上述的传统方法,微孔板杂交法就是其中的一个。它采用生物素代替同位素标记 DNA,在微孔板上进行杂交,所需 DNA 的量少。最适反应条件根据杂交液中的盐离子和甲酰胺浓度、杂交温度和待测 DNA 的 G + C mol% 来确定,杂交温度往往选择比待测 DNA 的退火温度低 22℃~26℃(平均 24℃),当然退火温度要求在与杂交液一定的盐离子浓度下测定获得。杂交温度与甲酰胺的关系是按照每增加 1% 的甲酰胺,杂交温度降低 0.6℃。根据“细菌系统学研究协调特别委员会”的建议,DNA-DNA 同源性是定义种的一个最重要的指标,DNA-DNA 同源性大于等于 70%, T_m 小于等于 5℃ 即定义为同一个种,同源性在 20%~70% 之间应认为是同一属内的不同种,同源性在 20% 以下则可能是不同属的种^[12]。

在本实验中分别以唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的 3 个不同致病型菌株、椰毒伯克霍尔德氏菌和洋葱伯克霍尔德氏菌标记光敏生物素后与 5 株椰酵假单胞菌进行 DNA-DNA 杂交,椰酵假单胞菌与唐菖蒲伯克霍尔德氏菌、椰毒伯克霍尔德氏菌的 DNA 同源性均大于 70%,而与其它伯克霍尔德氏菌的 DNA 同源性则小于 70%,这说明就染色体 DNA 来说,这 3 个种比较相近。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的 3 个不同致病型菌株与椰毒伯克霍尔德氏菌进行杂交得到的 DNA-DNA 同源性分别为 93%、92% 和 83%,均大于 70%;反之以椰毒伯克霍尔德氏菌标记光敏生物素后再与唐菖蒲伯克霍尔德氏菌的 3 个菌株杂交的结果分别为 81%、90% 和 89%。在此之前,还没有人报道过有关唐菖蒲伯克霍尔德氏菌与椰毒伯克霍尔德氏菌、椰酵假单胞菌的 DNA-DNA 同源性的结果。在本实验中,三者的 DNA 同源性均大于 70%,这说明这三个种菌株的 DNA 同源性非常高,应归属于同一个种。这与 16S rDNA 序列分析的结果相一致^[7]。唐菖蒲伯克霍尔德氏菌与洋葱伯克霍尔德氏菌的 DNA 同源性是 32%,与 Urakam^[12]的研究结果是一致的。椰毒伯克霍尔德氏菌与洋葱伯克霍尔德氏菌的 DNA 同源性是 21%,低于赵乃昕^[5]报道的 55%,这可能是由于所使用的测定方法不同造成的,有关 DNA-DNA 杂交方法的不同所导致的测定结果的不一致在以前也有过报道^[14]。在本实验中,我们使用的是微孔板定量 DNA-DNA 杂交法,而赵乃昕所使用的是复性速率法,二种方法的测定值均低于 70%。

依据国际细菌系统发育委员会的原则,特别是 DNA-DNA 同源性作为判断细菌种水平“金标准”的特殊意义^[14],这 3 个种应归属于同一个种。由于椰毒伯克霍尔德氏菌最早命名于 1960^[15],椰酵假单胞菌最早命名于 1987 年^[3],唐菖蒲伯克霍尔德氏菌最早分离于 1913^[16]年,根据细菌命名委员会的命名优先原则,选取唐菖蒲作为新的合并种的菌名,即命名为唐菖蒲伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia gladioli*)。

参 考 文 献

- [1] 酵米面中毒病因协作组. 中国医学科学院学报, 1980, 2(2): 77~85.
- [2] 刘秀梅, 文卫华, 孟昭赫, 等. 中华预防医学杂志, 1996, 30(6): 372~375.
- [3] 孟昭赫, 杜春明, 刘秀梅, 等. 卫生研究, 1987, 16(6): 17~22.
- [4] Gillis M, Tran V V, Scous M, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(2): 274~289.
- [5] Zhao Naixin, Qu Chunfeng, Wang Entiao, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1995, 45(3): 600~603.
- [6] 邱茂锋, 刘秀梅, 杨瑞馥, 等. 卫生研究, 1998, 27(1): 57~60.
- [7] 焦振泉, 刘秀梅, 杨瑞馥, 等. 卫生研究, 1990, 19(4): 232~236. 研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [8] De Ley J ,Cattoir H ,Reynaerts A. *Europ J Biochem* ,1970 ,**122**(2):133~142.
- [9] Crosa J H ,Brenner D J ,Falkow S. *J Bacteriol* ,1973 ,**115**(3) 904~911.
- [10] Brenner D J ,Fanning G R ,Rake A V ,et al. *Ana Biochem* ,1969 **28** 447~459.
- [11] Ezaki T ,Hashimoto Y ,Yabuuchi E. *Int J Syst Bacteriol* ,1989 **39**(2) 224~229.
- [12] Wayne L G ,Brenner D J ,Collins M A ,et al. *Int J Syst Bacteriol* ,1987 **37**(4) 463~464.
- [13] Oyaizu H ,Komagata K. *J Gen Appl Microbiol* ,1983 **29**(1) :17~40.
- [14] Grimont P A D ,Popoff M Y ,Grimont F ,et al. *Curr microbiol* ,1980 **4**(2) 325~330.
- [15] van damme P ,Pottas K. *Recl Trav Chim Pays-Bas Belg* ,1960 **79**(1) 255~267.
- [16] Severini G ,Colvilli M. *Ann Bot (Rome)* 1913 ,**11** 413~424.

DETERMINATION OF DNA-DNA HOMOLOGY AMONG *PSEUDOMONAS COCOVENENANS* SUBSP. *FARINOFERMENTANS* WITH MICRODILUTION PLATE HYBRIDIZATION METHOD*

Jiao Zhenquan¹ Liu Xiumei¹ Yang Ruifu² Meng Zhaohe¹

(¹ Institute of Nutrition and Food Hygiene , Chinese Academy of Preventive Medicine , Beijing 100050 , China)

(² Institute of Epidemiology and Microbiology , Chinese Academy of Army Medicine , Beijing 100071 , China)

Abstract : The DNA-DNA homologies among *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* and 11 species in genus *Burkholderia* were determined with microdilution plate hybridization method. The results showed :the homologies among *P. cocovenenans* subsp. *farinofermentans* , *B. gladioli* and *B. cocovenenans* were all over 75% . It was advised that these three species were synonym and should be renamed as *Burkholderia gladioli* .

Key words : *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* , DNA-DNA homology , Microdilution plate method

* Key Project of Chinese National Natural Science Fund (39570619)

致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了适应改革开放的需要,使科研成果尽快得到交流,本刊自 2001 年 41 卷第 1 期开始继续扩版,双月刊,每册 128 面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期缩短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里,《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿! 欢迎订阅! 欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部