

新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析

曾 静 窦岳坦 王 磊 杨苏声*

(中国农业大学生物学院 微生物学系 北京 100094)

摘 要 通过数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 分析,对分离自新疆地区的中度嗜盐革兰氏阴性菌进行研究,发现了一个新类群。在此基础上,进行了中心株 AI-3 的 16S rDNA 全序列分析,并与中度嗜盐菌已知种和相关种进行比较,得到系统发育树状图。在此树状图中,大多数参比菌株聚在一起,其 16S rDNA 全序列的同源性在 96% 以上,而 AI-3 与参比菌株的 16S rDNA 全序列相比,其相似性低于 75%。但是, AI-3 与 *Alcanivorax borkumensis*^[1] 的 16S rDNA 全序列的相似性为 96%,与 *Halobacillus litoralis* 的 16S rDNA 全序列的相似性为 99%,三者构成一个独立的发育分支。这说明在系统发育上, AI-3 与参比菌株属于不同的分支,是一个新的类群。在新类群内,菌株之间的 DNA 同源性大于 70%,而中心株 AI-3 与标准菌株伸长盐单胞菌 (*Halomonas elongata*) 的 DNA 同源性为 44%,表明新分离的菌株可能构成一个新种群。

关键词 新疆地区, 16S rDNA 全序列, DNA-DNA 杂交, 系统发育

中图分类号: Q93-331 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2002)02-0133-05

近年来,随着分子生物学技术的应用,中度嗜盐菌遗传多样性的研究得到迅速发展,新种和新属不断地被报道,迄今发现的中度嗜盐菌已有一个科、6 个属、31 个种^[1,2]。中度嗜盐菌与古菌不同,是一类可以在 0~32% 的盐环境中生长的细菌,属于极端环境微生物,它不是分类学的名词,而是指一类生长在盐湖、盐碱地、海水和盐渍食物等极端环境中的微生物。它们的菌种资源、生理和遗传,存在着研究和利用价值。目前,还没有人对我国的中度嗜盐菌的菌种资源进行过系统的调查和分类研究。新疆地区的地理环境特殊,存在着广泛的生物多样性,我们选定新疆地区为工作重点,在该地区的艾丁湖、艾比湖和达板湖等盐湖中,分离纯化了 29 株耐盐范围在 0%~25% NaCl 的中度嗜盐菌,并进行了数值分类和 16S rDNA PCR-RFLP 分析,获得了一个新类群^[3]。在这个新类群中,有 10 株新分离的菌株。为了进一步研究新类群的系统发育地位,本文对其中心株 AI-3 进行了 16S rDNA 全序列的测定,并且进行了 DNA-DNA 杂交实验。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

16S rDNA 全序列测定选用新类群的中心株 AI-3,该菌株分离自艾丁湖。序列相似性

* 通讯作者

作者简介: 曾 静(1963-)女,博士,副教授,现在中国农业大学生物学院微生物系任教,主要从事中度嗜盐菌分类的研究。

收稿日期: 2001-04-20,修回日期: 2001-10-15

分析所用参比菌株的信息来自 GenBank。DNA-DNA 杂交选用新类群的 10 个菌株,已知参比菌株选用标准菌株,即伸长盐单胞菌。

在本实验中菌株 AI-3、Ia、112 和 AI-5 分离自艾丁湖, C1、C2、C6、S 和 DB-1 分离自达板湖,而 ID1 分离自艾比湖。伸长盐单胞菌来自于德国菌种保藏中心(DSMZ)。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养和总 DNA 的提取 菌株采用 Gibbson^[4]液体培养基,在 32℃ 振荡培养至对数生长期,以 5000r/min 离心收集菌体。DNA 的提取参照文献[5]。

1.2.2 16S rDNA 的 PCR 扩增 以 DNA 为模板,采用引物 P₁ 5'-CGG GAT CCA GAG TTT GAT CCT GGC TAC GAA CGA ACG CT-3',引物 P₆ 5'-CGA GAT CCT ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT CAC CCC-3',经 PCR 反应扩增出 16S rDNA。用博大公司的 DNA 快速回收试剂盒将 PCR 产物进行纯化,以备测序。

1.2.3 16S rDNA 的全序列测定和分析 纯化的 PCR 产物,以 ABI Prism 377 DNA 自动测序仪测定。将测得的 16S rDNA 全序列与有关菌株的相应序列用 Sepup(0.6 Version)软件进行录入。测定序列与基因库中的已知序列在 Clustaw 程序包中进行分析,最后形成一个多重序列匹配排列阵,其中形成的缺口用中性元素填补。用 PHYLIP 程序包中的 DNAdist 程序计算进化距离,根据 Kimura 2-参数方式,通过序列数据计算矩阵距离,然后输入 Fitch 程序中,进行系统进化树估算。各分支点的重复性用 PHYLIP 程序包中的 Seqboot、Consense 程序分析,重复数为 100。

1.2.4 DNA G + C mol% 和 DNA-DNA 杂交 T_m 值和 G + C mol% 采用热变性法测定,以 *E. coli* K-12 为参比菌株。DNA-DNA 杂交采用复性速率法测定^[6]。采用 BIO-20 型紫外分光光度计进行测定。

2 结果和讨论

2.1 中度嗜盐菌中心菌株 AI-3 的 16S rDNA 全序列

测定纯化的 PCR 产物的 16S rDNA 的全序列,并用软件录入,转化为 GenBank 信息库形式。图 1 为 AI-3 的 16S rDNA 的全序列。

2.2 中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列的相似性比较和系统发育

通过 PHYLIP 软件,将所测序列与 GenBank 信息库的中度嗜盐菌已知种和相关种进行比较,进行系统进化树估算。得到以 16S rDNA 全序列为基础的系统发育树(图 2)。

在系统发育树中所有菌株基本分成两大分支。一个大分支由盐单胞菌属、德莱氏菌属(*Deleya*)的各个种和死海色盐杆菌(*Chromohalobacter marismortui*)以及盐脱氮副球菌(*Paracoccus halodenitrificans*)构成,各个种之间的 16S rDNA 全序列的同源性大于 96%,说明这些菌株在系统发育上是非常接近的。另一大分支由 *Alcanivorax borkumensis*、*Halobacillus litoralis* 和 AI-3 构成,其中 AI-3 的 16S rDNA 的全序列与 *Alcanivorax borkumensis* 的同源性为 96%,而与 *Halobacillus litoralis* 的同源性达到 99%。结果说明,分离自新疆地区的 AI-3 在系统发育上是不同于盐单胞菌科(Halomonadaceae)的各个属,属于一个新的种群。

2.3 中度嗜盐菌的 DNA G + C mol% 和 DNA-DNA 杂交

将 AI-3 与新疆地区中度嗜盐菌类群各个菌株进行 DNA G + C mol% 测定和 DNA-DNA

1 ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgagc gcggggaagcg agtggatccc
51 ttcgggtgaa gctcgtggaa cgagcggcgg acgggtgagt aacacgtggg
101 caacctgcct gtaagaccgg aataaccccg ggaaaccggg gctaattgccg
151 ggtaatactt ttcttcgcat gaaggaaagt tgaaagatgg cttcttgcta
201 tcacttacag atgggcccg cgcgcattag ctagtgtgtg aggtaacggc
251 tcaccaagge gacgatgcgt acgccgacct gagagggtga tcggccacac
301 tgggactgag acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtagggaaatc
351 ttccgcaatg gacgaaagtc tgacggagca acgccgcgtg aacgatgaag
401 gtcttcggat cgtaaagttc tgttggttagg gaagaacaag taccgtgcga
451 atagagcggg accttgacgg tacctaacga ggaagccccg gctaactacg
501 tgccagcagc cgcggttaata cgtagggggc aagcgttgtc cggaattatt
551 gggcgtaaa ggcgcgcagg cgggttcctta agtctgatgt gaaagccac
601 ggctcaaccg tggagggtca ttggaaactg gggaaactga ggacagaaga
651 ggagagtggg attccacgtg tagcggtgaa atgcgtagat atgtggagga
701 acaccagtgg cgaaggcgac tctctggtct gtttctgacg ctgagggtgcg
751 aaagcgtggg tagcaaacag gattagatac cctggtagtc cacgcctgta
801 aacgatgagt gctaggtgtt agggggcttc cacccttag tgctgaagtt
851 aacgcattaa gcactccgcc tggggagtag ggcgcgaagg ctgaaactca
901 aaggaattga cgggggcccc cacaagcgtg ggagcatgtg gtttaattcg
951 aagcaacgcg aagaaacctt accaggtctt gacatccctg gacatcccta
1001 gagatagggc tttccttcgg ggaccaagtg acaggtggtg catggttgtc
1051 gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc
1101 cctaattctta gttgccagca ttcagttggg cactctaagg tgactgccgg
1151 tgacaaaccg gaggaaggcg gggatgacgt caaatcatca tgccccttat
1201 gacctgggct acacacgtgc tacaatggat ggtacaaagg gcagcgaagc
1251 cgcgaggtgt agcaaattccc ataaaacat tctcagttcg gattgcaggc
1301 tgcaactcgc ctgcatgaag ccggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat
1351 gccgcggtga atacgttccc gggccttgta cacaccgcc gtcacaccac
1401 gagagttagc aacacccgaa gtcggtgagg taaccttttt ggagccagcc
1451 gccgaagggtg gggccaatga

图 1 AI-3 的 16S rDNA 的全序列

Fig.1 The full-length 16S rDNA sequence of strain AI-3

杂交,并以 *H. elongata* 为参比菌株,所得的结果见表 1。

表 1 中度嗜盐菌新菌群和伸长盐单胞菌的 DNA 分析

Table 1 DNA analysis of the new cluster of moderately halophilic bacteria and *Halomonas elongata*

Strain	Tm value	DNA G + C mol %	The levels of DNA homology with AI-3/ %
AI-3	72.40	38.08	100
ID1	72.21	37.88	76
C1	73.04	38.60	73
C2	73.36	40.27	73
C6	72.82	39.00	86
Ia	72.40	38.27	78
I12	72.57	38.42	69
AI-5	73.81	41.20	85
S	73.01	39.50	77
DB-1	73.60	40.56	78
<i>Halomonas elongata</i>	82.85	61.49	44

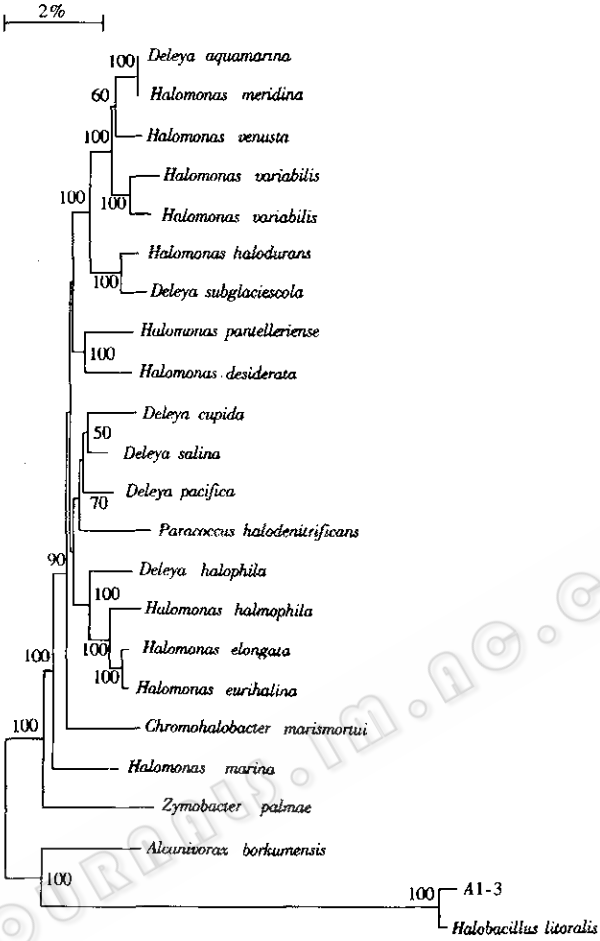


图 2 中度嗜盐菌的 16S rDNA 全序列的系统发育树状图

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from the full-length 16S rDNA sequence of moderately halophilic bacteria

从表 1 可以看出,新疆地区盐湖的中度嗜盐菌新类群各个菌株的 T_m 值在 72.21 ~ 73.81℃ 之间,而 ΔT_m 为 1.6℃,小于 5℃ 的规定。其 DNA G + C mol% 含量在 37.88 ~ 41.20 之间,变化值为 3.32%,这些数据说明新分离的菌株是在一个种的范围内。而且,中度嗜盐菌标准菌株 *H. elongata* 的 T_m 值为 82.85℃,DNA G + C mol% 含量为 61.49,大大高于新分离的菌株,说明两者具有明显的差别。另一方面,中心株 A1-3 与群内其他菌株的 DNA 同源性在 69% ~ 86% 之间,而与标准菌株 *H. elongata* 的同源性为 44%。按照国际分类委员会的建议,DNA 同源性 70% 作为定种的界限,即大于或等于 70% 为同一个种群,小于 70% 为不同的种群。因此,分离自新疆地区的中度嗜盐菌可能为一个新种群,还待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Yakimov M M, Golyshev N P. *Int Syst of Bacteriol*, 1998, **48**, 339 ~ 348.
[2] Russell H V. Genus *Halomonas*. In: Krieg N R, Holt J C ed. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore: The

Williams & Wilkins Co ,1984 ,1 340 ~ 343.

[3] 曾 静 ,奚岳坦 ,杨苏声 .微生物学通报 ,2000 ,27 327 ~ 330.

[4] 徐德强 ,黄静娟 ,张纪忠 .微生物学报 ,1995 ,35 315 ~ 321.

[5] 林万明 .分析微生物学专辑 .北京 :科学出版社 ,1988.88 ~ 89.

[6] Chen Wenxin ,Tan Zhiuuan ,Gao Junlian , et al . *Int J Syst Bacteriol* ,1997 ,47(3) 870 ~ 873.

Analysis of 16S rDNA Sequences and DNA-DNA Hybridization of Moderately Halophilic Bacteria from Xinjiang Region

Zeng Jing Dou Yuetan Wang Lei Yang Susheng*

(Department of Microbiology , College of Biological Sciences , China Agricultural University , Beijing 100094 , China)

Abstract : Based on the previous studies on numerical taxonomy and 16S rDNA PCR-RFLP analysis , the moderately halophilic bacteria isolated from Xinjiang Region constituted a new cluster , and the phylogenetic tree was constructed by comparing with the 16S rDNA sequences of the other moderately halophilic bacteria species . In the phylogenetic tree , most of the reference strains were clustered in a group , and the similarity values of 16S rDNA sequence were above 96% . However , AI-3 , *Alcanivorax borkumensis* and *Halobacillus litoralis* were clustered in another group , and the similarity value of 16S rDNA sequences between AI-3 and *Alcanivorax borkumensis* was 96% , and that of 16S rDNA sequences between AI-3 and *Halobacillus litoralis* was 99% . The results indicated that AI-3 was different from the reference strains in phylogeny . The values of DNA homology in the new cluster were more than 70% , but the value between AI-3 and *Halomonas elongata* was less than 50% . Thus , the strain AI-3 possibly represent a new moderately halophilic bacteria species .

Key words : Xinjiang Autonomy Region , 16S rDNA sequence , DNA-DNA hybridization , Phylogenesis

* Author for correspondence

重 要 声 明

为适应我国信息化建设需要 ,扩大作者学术交流渠道 ,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网” 。如作者不同意将文章编入该数据库 ,请在来稿时声明 ,本刊将做适当处理。

从 2000 年开始 ,凡被本刊录用的稿件 ,编辑部将及时发出录用通知 ;对未被录用的稿件 ,将及时函告 ,并说明原因 ,稿件一律不退 ,请作者自留底稿。

《微生物学报》编辑部