

链霉菌的 rep-PCR 基因指纹分析

张建丽¹ 刘志恒²

(¹北京理工大学 生命科学与技术学院 北京 100081)

(²中国科学院微生物研究所 微生物资源国家重点实验室 北京 100080)

摘 要 对重复片段 PCR (rep-PCR) 基因指纹分析应用于链霉菌分子分型进行研究, 结果表明 rep-PCR 基因指纹分析具有分辨率高、稳定、重现性好、简便易行等特点, 在一定程度上与 16S rDNA 序列比较结果相一致, 是一种快速而有效的 DNA 指纹技术, 能反映出链霉菌种和菌株水平的基因型、系统发育和分类学关系, 可应用于种及以下水平的分类和快速鉴定, 尤其适用于分析大量的菌株或分离株。

关键词 链霉菌, rep-PCR 基因指纹分析, 快速鉴定

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2004) 03-0281-05

重复片段 PCR 基因指纹分析 (Repetitive-element PCR genomic fingerprinting, rep-PCR) 是一种以 DNA 为基础的分型方法, 目前应用于 PCR 的重复序列主要是 BOX 片段, 大小为 154bp, 是由保守性不同的亚序列组成, 最初定义了 3 种不同的亚单位, boxA (57bp), boxB (43bp) 和 boxC (50bp), 而只有 boxA 亚单位在不同细菌中表现出多拷贝和高保守性。按照 BOX 片段中的 boxA 亚单位设计的寡核苷酸引物进行 PCR, 使得位于重复序列之间的不同基因区域得以选择性扩增, 得到大小不等的 DNA 扩增片段, 通过对 PCR 产物进行电泳图谱分析获得分类学信息^[1,2]。该技术已应用于大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[3]、肠沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)^[4]、黄单胞菌属 (*Xanthomonas*)^[5] 等的分类和鉴定, 但在放线菌中应用的实例很少, Sadowsky 等^[6] 对几株致病性链霉菌的 rep-PCR 研究显示, 运用 BOXA1R 引物可以得到稳定、可重复的特异性 DNA 指纹图谱。Nam 等^[7] 对几株冢村氏菌 (*Tsukamurella*) 的鉴定中也使用了 rep-PCR 指纹图谱分析。本文旨在探讨 rep-PCR 基因指纹分析技术应用于链霉菌属 (*Streptomyces*) 分类研究的可行性, 以期发现同种异名的菌株及新的分类单位, 为链霉菌资源的开发和持续利用提供理论指导和科学依据。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

从菌种保藏机构 CCCC/IMCAS (Center for Culture

Collection of Micro-organisms, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences), DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) 和 JCM (Japan Collection of Microorganisms) 获得链霉菌典型菌株 150 株。中国土壤分离菌株 A25^[8] 来自中国科学院微生物研究所放线菌分类研究室。

1.2 菌体的培养和收集

将实验菌株分别接种于贝奈特液体培养基 (每升含葡萄糖 10g, Casein enzymatic hydrolysate 2g, Yeast extract 1g, Beef extract 1g, pH 7.3), JCM 42 号液体培养基 (每升含可溶性淀粉 10g, Yeast extract 2g, pH 7.3) 和高氏一号液体培养基 (每升含可溶性淀粉 10g, KNO₃ 1g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, NaCl 0.5g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, pH 7.3) 中, 28℃ 摇瓶培养 24h、48h 和 72h。检查无污染后, 4℃ 10000r/min 离心 10min 收集菌体, 用无菌水离心洗涤 2 次, 再用 TE Buffer 离心洗涤 2 次。

1.3 总 DNA 模板的提取

按照 Rainey 等^[9] 的方法提取和纯化总 DNA。

1.4 PCR 扩增

扩增用引物为 BOXA1R 引物, 主要参照 Sadowsky 等^[6] 的方法进行扩增。

1.5 PCR 产物的电泳分离和图谱观察

2% 琼脂糖制成凝胶, 取 9μL PCR 产物与 1μL 上样缓冲液混匀后上样, 用 1 × TBE 电泳缓冲液, 130V 电泳 220min。凝胶染色后, 在紫外灯下观察结果,

基金项目 北京理工大学基础研究基金资助项目 (BIT-UBF-200306C08)

作者简介 张建丽 (1964 -) 女, 山东平度市人, 副教授, 博士, 主要从事放线菌系统分类学研究。Tel: 86-10-68914504; Fax: 86-10-68913293;

E-mail: zhangjianli@bit.edu.cn

收稿日期 2003-07-18, 修回日期 2003-12-23

照相并保存为 TIFF 文件。

1.6 rep-PCR 基因指纹图谱分析

用 BioNumerics 生物软件(Applied Maths, Kortrijk, Belgium)分析 rep-PCR 基因指纹图谱,用非加权平均连锁法(Unweighted pair group method using averages algorithm, UPGMA)进行聚类分析 构建树状图。

1.7 以 16S rDNA 序列为基础的系统发育分析

从 GenBank 数据库中获得链霉菌属部分典型菌株的 16S rDNA 序列 构建系统发育树。序列对排用 CLUSTAL X1.8 program^[10], 进化树的构建按照 Neighbour-joining 方法^[11], 用 PHYLIP program 中的 NEIGHBOUR program 进行。进化树分枝模式的稳定性用 PHYLIP 中的 SEQBOOT、DNADIST 和 CONSENSE 分析^[12]。

2 结果

2.1 链霉菌典型菌株 rep-PCR 基因指纹图谱分析

采用 BOXA1R 引物对 150 株链霉菌典型菌株进行了 rep-PCR 扩增和电泳分离, PCR 产物在 150 ~ 2300bp 位置有多条特定的电泳带, 且不受培养基组分、菌龄等的影响, 从 3 种培养基(贝奈特培养基、JCM 42 号培养基和高氏一号培养基) 和 3 个培养时间(24h、48 h 和 72 h) 收集的菌体有相似的图谱。对获得的图谱进行计算机聚类分析 并建立了数据库, 结果表明这些菌株可被分成不同的类群, 其中淡灰链霉菌(*S. canescens*) 苦胆链霉菌(*S. felleus*) 淤泥链霉菌(*S. limosus*) 加利利链霉菌(*S. galilaeus*) 和桑氏链霉菌(*S. sampsonii*) ; 微白黄链霉菌(*S. albidoflavus*) 和亚黄红链霉菌(*S. subrutilus*) ; 嗜氨基链霉菌(*S. aminophilus*) 和可可链霉菌(*S. cacaoi*) ; 青蓝链霉菌(*S. caeruleus*) 和雪白链霉菌(*S. niveus*) ; 暗红链霉菌(*S. erythrogriseus*) 和灰肉红链霉菌(*S. griseoincarnatus*) ; 龟裂链霉菌(*S. rimosus*) 和龟裂链霉菌龟裂亚种(*S. rimosus* subsp. *rimosus*) 之间的相似性高于 rep-PCR 技术中定义细菌种的界限 72%。

2.2 rep-PCR 基因指纹分析树状图和 16S rDNA 进化树的比较

在供试的 150 株链霉菌中, 只有 48 株具有 16S rDNA 全序列。基于 rep-PCR 基因指纹图谱构建了 48 个链霉菌典型菌株相互关系的树状图(图 1)。 *S. canescens*、*S. felleus*、*S. limosus*、*S. galilaeus* 和 *S. sampsonii* 以 76% 的相似性形成一个聚类群 R_1 ; 土味链霉菌(*S. odorifer*) 与聚类群 R_1 的关系也较近 相似性为 70% ; 而 *S. albidoflavus* 和天蓝色莲霉

菌(*S. coelicolor*) 位于不同的分枝。

基于 16S rDNA 全序列构建了 48 个链霉菌典型菌株相互关系的系统进化树(图 2)。除 *S. galilaeus* 处于另外的分枝外, *S. canescens*、*S. felleus*、*S. limosus*、*S. sampsonii* 和 *S. odorifer* 分享几乎 100% 的 16S rDNA 序列相似性。 *S. albidoflavus* 和 *S. coelicolor* 也位于该聚类群, 具有同样高的相似性。结果表明, rep-PCR 基因指纹分析与 16S rDNA 序列分析结果有一定的相关性, 前者可为后者提供进一步工作的依据。

在 rep-PCR 基因指纹图谱树状图中, *S. albidoflavus* 和 *S. subrutilus* 具有 80% 的相似性, 位于同一个聚类群 R_2 ; 而在 16S rDNA 系统进化树中, 这两个种却在不同的分枝上。这说明无论是 rep-PCR 基因指纹分析, 或是 16S rDNA 序列分析结果, 都只能作为多相分类(Polyphasic taxonomy) 中的指标之一。有待于通过采用形态、生理生化特性、化学分类和分子分类等技术和方法, 综合表型、基因型和系统发育的信息, 才能确定 *S. albidoflavus* 和 *S. subrutilus* 正确的分类地位。

2.3 链霉菌分离菌株的 rep-PCR 基因指纹图谱分析

菌株 A25 是从中国土壤分离得到的一株链霉菌。与菌株 A25 的 16S rDNA 序列相似性高于 97% 的链霉菌典型菌株有 14 个, 它们是浅天蓝链霉菌(*S. coeruleus*), 黑胡桃链霉菌(*S. nogalater*), 灰色链霉菌(*S. griseus*), *S. albidoflavus* , 委内瑞拉链霉菌(*S. venezulae*), 泛温链霉菌(*S. eurythermus*), 结节链霉菌(*S. nodosus*), 唐德链霉菌(*S. tendae*), 鲁地链霉菌鲁地亚种(*S. rutgersensis* subsp. *rutgersensis*), *S. gougerotii* , *S. felleus* , 中间型链霉菌(*S. intermedius*), 天青链霉菌(*S. caelestis*) 和生二素链霉菌(*S. ambofaciens*), 从基于 rep-PCR 基因指纹图谱构建的菌株 A25 与 14 个 16S rDNA 序列相似种之间关系的树状图(图 3) 看出, 菌株 A25 与它们之间的相似性低于 72% , 可以视为不同的基因种。以 16S rDNA 为基础的系统发育分析、表型分析、以及 DNA-DNA 杂交实验也证实菌株 A25 是链霉菌属中的一个新种, 现已生效发表^[8]。

3 讨论

链霉菌属是放线菌目中种的数量最大的一个属。自从 1943 年 Waksman 和 Henrici^[13] 建立链霉菌属以来, 由于其重要的应用价值, 使得人们不断从中

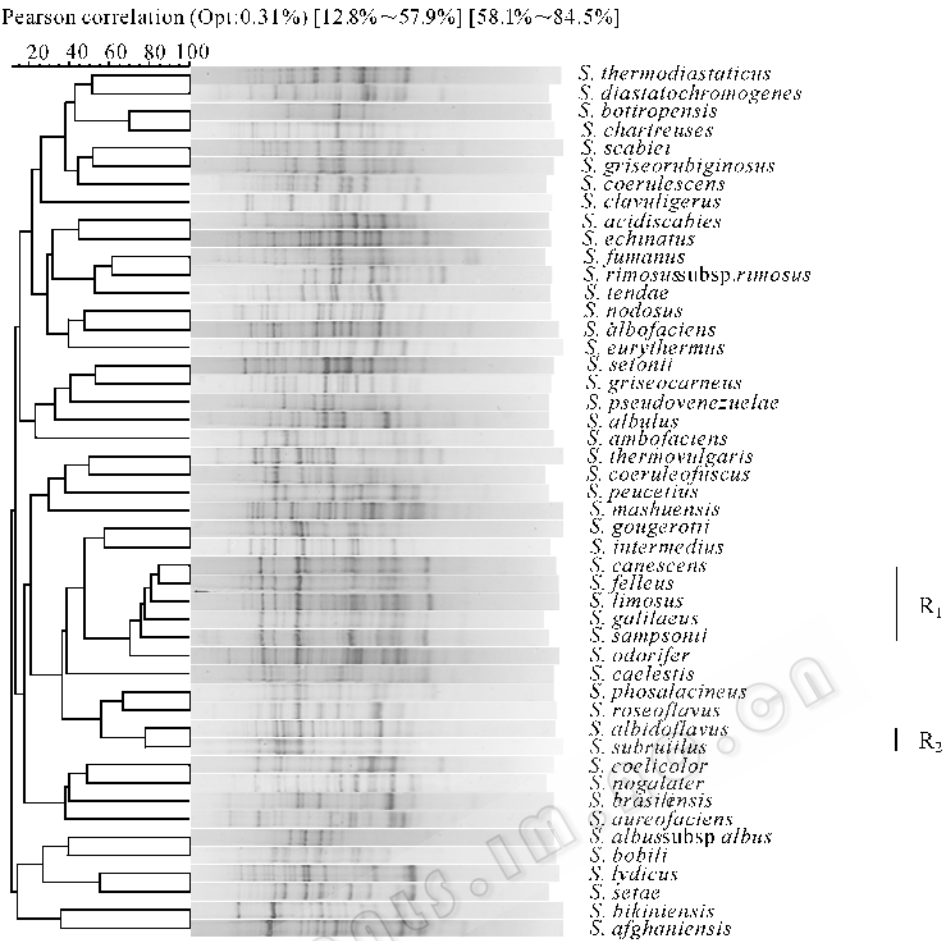


图 1 基于 rep-PCR 基因指纹图谱构建的 48 个链霉菌典型菌株相互关系的树状图

Fig. 1 Dendrogram of relatedness of 48 type strains of the genus *Streptomyces* derived from rep-PCR DNA fingerprints generated from the BOXA1R primer

筛选新的抗生素和其它生物活性物质,被描述的种从 40 个上升至 3000 多个,显然,其中的许多种属于同种异名。国际链霉菌计划(International *Streptomyces* Project, ISP)和 Williams 等^[14]的数值分类也未能根本解决种的过度描述问题^[15],目前链霉菌属的分类仍处于较为混乱的状态,生效描述的种已达 530 个。因此,建立快速、准确的链霉菌鉴定方法和分类系统是链霉菌研究的重要课题。

放线菌分类由最初的以培养特征、形态特征和生理生化特性描述为主发展到现在的分子分类。在此过程中,技术的改进与提高始终影响着放线菌分类方法学的改进,共同推动放线菌分类学向着自然分类系统靠近。在多相分类方法中,DNA 同源性分析是建立新种的重要标准^[16],但对大量菌株进行 DNA-DNA 杂交显然是不切实际的。随着核酸测序技术的发展,16S rDNA 序列越来越多地被用于放线菌的系统进化研究,被认为是细菌分类鉴定研究的“Gold standard”。但 16S rDNA 测序较慢且价格较

贵,因此 530 种链霉菌中不足 1/3 被测序,在实际工作中对所有的分离菌株都进行 16S rDNA 测序也是不现实的。所以,建立快速方便、又较准确的分类方法和系统显得十分必要。由于 16S rDNA 只是细菌 DNA 信息中的一小部分,它们反映的菌株间的关系可能会有偏差,且保守性很强,有时不能提供足够的分辨率区分亲缘关系较近的种或相关属,在这种情况下就必须运用其它多种分类方法和手段来确定菌株的分类地位。

rep-PCR 基因指纹分析采用的分类信息来自于全基因组。该法能在种及菌株水平上反映出链霉菌属的基因型、系统发育和分类关系,具有分辨率高、稳定、重现性好、简便易行等特点,在一定程度上与 16S rDNA 序列比较结果相一致,是一种快速而有效的 DNA 指纹技术,因此可作为一种快速鉴定方法,它的最大优点是适用于分析大量的菌株或分离株。通过与数据库中的 rep-PCR 基因指纹图谱相比较,将为进一步的分类鉴定提供理论指导。基于 rep-

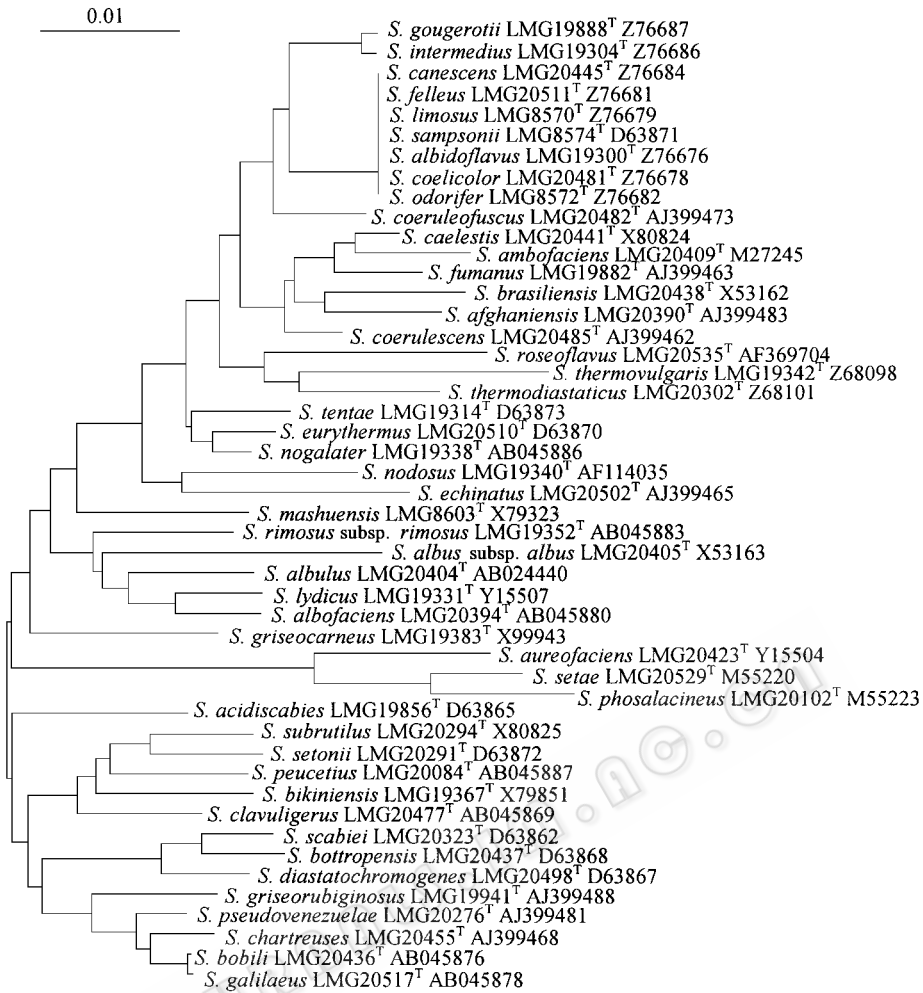


图 2 基于 16S rDNA 全序列构建的 48 个链霉菌典型菌株相互关系的系统进化树

Fig. 2 An unrooted neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequence showing the relationships among 48 type strains of the genus *Streptomyces*. The scale bar indicates 0.01 substitutions per nucleotide position.

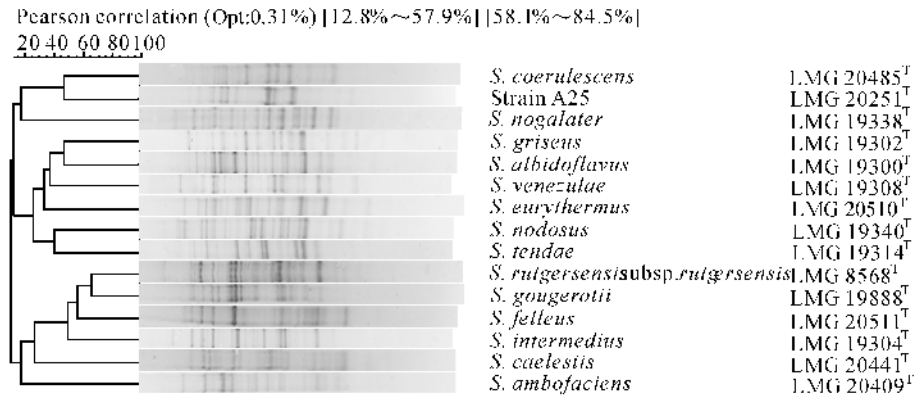


图 3 基于 rep-PCR 基因指纹图谱构建的菌株 A25 与 14 个 16S rDNA 序列相似种之间关系的树状图

Fig. 3 UPGMA cluster analysis of rep-PCR fingerprints of strain A25 and 14 highly related strains based on almost complete 16S rDNA sequence

PCR 基因指纹分析结果,选择相似性大于 72% 的链霉菌典型菌株,然后测定其 16S rDNA 全序列,并进行 DNA 同源性分析,以寻找同种异名菌,改善链霉菌属的分类。对于新的分离菌株,通过与数据库中的 rep-PCR 指纹图谱相比较,将为进一步的分类鉴

定提供理论指导。作为多相分类的一个组成部分,这项技术也可逐步应用于除链霉菌属以外的放线菌分类,以便修正同种异名菌或发现新的分类单位,并逐步建立起可查询和更新的生物信息库,快捷、准确地确定研究对象的分类地位。

致谢 比利时 BCCM/LMG 提供了部分技术支持; CCCM/IMCAS、德国 DSMZ 和日本 JCM 保藏机构提供本项研究的链霉菌典型菌株;中国科学院微生物研究所李 炜博士提供分离菌株 A25。在此一并表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Versalovic J, Koeuth T, Lupski J R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**: 6823 – 6831.
- [2] Versalovic J, Schneider M, de Bruijn F J, et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *Methods Mol Cell Biol*, 1994, **5**: 25 – 40.
- [3] Dimri G P, Rudd K, Morgan M K, et al. Physical mapping of repetitive extragenic palindromic sequences in *Escherichia coli* and phylogenetic distribution among *E. coli* strains and other enteric bacteria. *J Bacteriol*, 1992, **174**: 4583 – 4593.
- [4] Johnson J R, Clabots C. Improved repetitive-element PCR fingerprinting of *Salmonella enterica* with the use of extremely elevated annealing temperatures. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2000, **7**: 258 – 264.
- [5] Rademaker J L W, Hoste B, Louws F J, et al. Comparison of AFLP and rep-PCR genomic fingerprinting with DNA-DNA homology studies: *Xanthomonas* as a model system. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2000, **50**: 665 – 677.
- [6] Sadowsky M J, Kinkel L L, Bowers J H, et al. Use of repetitive intergenic DNA sequences to classify pathogenic and disease-suppressive *Streptomyces* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1996, **62**: 3489 – 3493.
- [7] Nam S W, Kim W Y, Park Y H, et al. Genotypic characterisation of *Tsukamurella* strains associated with foaming in an activated sludge plant. In: 11th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. October 24 – 28, 1999, Crete, Greece, 162.
- [8] Li W, Lanoot B, Zhang Y, et al. *Streptomyces scopiformis* sp. nov., a novel streptomycete species with fastigate spore chains. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2002, **52**: 1629 – 1633.
- [9] Rainey F A, Ward-Rainey N, Kroppenstedt R M, et al. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsiaceae* fam. nov.. *Int J Syst Bacteriol*, 1996, **46**: 28 – 96.
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**: 4673 – 4680.
- [11] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, **4**: 406 – 425.
- [12] Felsenstein J. PHYLIP: Phylogeny Inference Package, version 3.6. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993.
- [13] Waksman S A, Henrici A T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol*, 1943, **46**: 337 – 341.
- [14] Williams S T, Goodfellow M, Alderson G, et al. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol*, 1983, **129**: 1743 – 1813.
- [15] Anderson A S, Wellington E M H. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int J Syst Evol Bacteriol*, 2001, **51**: 797 – 814.
- [16] Wayne L G, Brenner D J, Colwell R R, et al. International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol*, 1987, **37**: 463 – 464.

Repetitive-element PCR Genomic Fingerprinting of The Genus *Streptomyces*

ZHANG Jian-Li¹* LIU Zhi-Heng²

(¹ School of Life Science and Technology, Beijing Institute of Technology, Beijing 100081, China)

(² State Key Laboratory of Microbial Resource, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: Repetitive-element PCR (rep-PCR) genomic fingerprinting with the BOXA1R primer was investigated as a molecular typing tool for strains of *Streptomyces*. The results indicated that rep-PCR DNA fingerprints of *Streptomyces* strains were relatively unique, simple, stable, and reproducible. To some extent, rep-PCR-generated genomic fingerprint analyses yield results that are in agreement with 16S rDNA sequences study. This method appears to reflect the genotypic, phylogenetic and taxonomic relationships of the genus *Streptomyces* in the species-strain level. Therefore, it can be used as a rapid and efficient means of determining taxonomic diversity and phylogenetic structure, especially of large collections of strains.

Key words: *Streptomyces*, Repetitive-element PCR genomic fingerprinting, Rapid identification