

黄海繁茂膜海绵中微生物多样性的研究

徐君怡 靳 艳 虞星炬 金美芳 张 卫*

(中国科学院大连化学物理研究所 海洋生物产品工程组 大连 116023)

摘 要 构建了我国黄海繁茂膜海绵中细菌 16S rDNA 克隆,对其遗传多样性进行了分析,发现海绵中相关细菌 16S rDNA 基因主要归类于紫硫细菌门(*Proteobacteria*)中的 α -亚门、 γ -亚门和放线菌门(*Actinobacteria*)等类群。所获得的 16S rDNA 序列与 GenBank 中的已知序列差异较大,反映出该海绵存在尚未发现的微生物新信息。

关键词 黄海,繁茂膜海绵,16S rDNA 序列,多样性

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)05-0576-04

海绵能够产生大量具有药用价值的天然活性物质。海绵中的很多活性物质都是海绵共生微生物产生的^[1,2],通过对海绵共生微生物大规模培养可以解决海绵药源供给不足的问题。因此研究海绵微生物的多样性,以期得到能够产生活性物质的菌株,尤其是对微生物新种的筛选和培养已逐渐成为该领域的研究前沿。

海绵相关微生物占海绵干重的 50%,且种类繁多^[3]。但是很多微生物无法用常规的培养方法培养得到,这就限制了对海绵中微生物多样性的研究。随着分子生物学方法的发展,应用 16S rDNA 提取、克隆、测序等技术获得海绵体内微生物的信息,能够完整的描述海绵中微生物多样性。通过进化关系上的分析及其他已获得培养的微生物的信息,指导进化关系上相近的海绵中未可培养微生物的分离、培养^[4]。

繁茂膜海绵产于我国黄海潮间带,其粗提液表现出较强的抗菌活性,我们已从该海绵中分离得到了具有很强抗菌和抗肿瘤活性的菌株。本文以黄海繁茂膜海绵为研究对象,通过对该海绵相关细菌 16S rDNA 克隆的构建与分析,研究其相关微生物多样性。

1 材料和方法

1.1 样品的采集

海绵活体样本采集自大连石槽海域潮间带,采

到的海绵组织马上放入装有海水的塑料袋中避免与空气接触。海绵种属由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定:寻常海绵纲(*Demospongiae*)、软海绵目(*Halichondrida*)、膜海绵科(*Halichondriidae*)、繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perleve*)。

1.2 试剂

TaKaRa *LA Taq*, pMD18-T Vector, X-Gal, IPTG, *Sma* I (10U/ μ L) 和 *Eco*O109 I (15U/ μ L), DNA Marker DL2000 均购自 TaKaRa 公司。

16S rDNA 扩增引物:正向引物 519f (*Escherichia coli* base 519 to 536)为 5'-CAGCAGCCGCGTAATAC-3';反向引物 1406r (*E. coli* base 1420 to 1406)为 5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'由大连 TaKaRa 公司合成。

1.3 海绵相关微生物 16S rDNA PCR 扩增和克隆

1.3.1 海绵及相关微生物总 DNA 的提取:参照 Webster 等^[4]和 Merante 等^[5]的方法进行。

1.3.2 海绵相关微生物 16S rDNA 的 PCR 扩增:以纯化后的海绵及相关微生物总 DNA 为模板,以 519f (5'-CAGCAGCCGCGTAATAC-3'), 1406r (5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')为引物,通过 PCR 直接扩增出海绵相关微生物的 16S rDNA。反应体系:5 μ L 10 \times LA PCR 缓冲液 (Mg²⁺ plus), 8 μ L dNTP (2.5mmol/L each), 0.5 μ L 519f primer (20 μ mol/L), 0.5 μ L 1406r primer (20 μ mol/L), 0.5 μ L TaKaRa *LA Taq*, 1 μ L 模板 (海绵及相关微生物总 DNA), 34.5 μ L dH₂O, 总体积 50 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 3min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 57 $^{\circ}$ C 1min,

基金项目 国家 973 项目 (2003CB716001)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-411-84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

作者简介 徐君怡 (1979-), 女, 辽宁大连人, 硕士研究生, 研究方向为海绵相关微生物多样性及可培养性研究。E-mail: junyixu@dicp.ac.cn

收稿日期 2004-01-12, 修回日期 2004-03-26

72℃ 1.5min 30 次循环,72℃ 2min。

1.3.3 PCR 产物克隆 将 PCR 产物纯化处理后连接 pMD18-T Vector, 转化大肠杆菌 *E. coli* JM109 感受态细胞。在含有 X-gal、IPTG、Ampicillin 的 L-琼脂平板培养基上培养, 选择 Amp^r 转化子菌落。

1.4 16S rDNA 的限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)分析

随机挑选白色菌落, 用 PCR 法确认克隆载体 pMD18-T Vector 中插入片段的长度大小^[6]。使用 pMD18-T Vector 上克隆位点的侧翼引物 Sequencing Primer RV-M(5'-AGCGGATAACAATTTTCACACAGG-3') 和 Sequencing Primer M13-47(5'-CGCCAGGTTTTCCAGTCACGAC-3') 进行 PCR 反应。确认成功转化的 PCR 产物克隆(TA Cloning) 将其扩增产物纯化处理后, 取 5μL 在 37℃ 使用 *Sma* I 和 *Eco*O109I 进行双酶切 1h, 酶切产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析。

1.5 16S rDNA 序列分析

经过 RFLP 分析, 样品的 TA 克隆由 TaKaRa 公司进行测序。将所测的 16S rDNA 序列与 GenBank 数据库中的序列进行比较, 从数据库中得到相关种属的 16S rDNA 序列信息, 使用 ClustalX(Version 1.8) 等软件进行多序列比对及系统发育树的构建。

1.6 海绵组织的透射电镜分析

将新鲜采集的海绵组织切成 0.5cm³ 小块, 在 2% 戊二醛固定液中浸泡 4h, 用 PBS 缓冲液洗 5 次。在 50%、70%、80%、90% 的乙醇中脱水各 20min, 100% 的乙醇脱水(20min) 2 次, 30℃ 置包埋液中处理 12h, 60℃ 过夜处理, 切片, 染色。制得的切片用 JEM-2000EX 透射电镜进行观察^[7]。

2 结果和讨论

2.1 海绵中微生物分布的透射电镜观察

通过透射电镜观察到海绵组织的细胞间质和细胞内部都存在一定数量的微生物, 主要形状是球状和杆状。分布于细胞间质中的微生物数量较多, 而存在于海绵细胞内的微生物数量相对较少, 这部分胞内微生物通常属于海绵共生微生物, 用传统的分离技术一般无法得到。

2.2 限制性片段长度多态性分析(RFLP)

构建了黄海繁茂膜海绵相关微生物的 16S rDNA 克隆。在获得的近千个转化子中随机选取 192 个, 用 Sequencing Primer RV-M 和 Sequencing Primer M13-47 作为反应引物进行 PCR 扩增。插入片段的长度大约在 887bp, 加上两端的侧翼引物 155bp, 因此 PCR

产物长度在 1042bp 左右的转化子都认为是成功转化的 TA 克隆, 在 192 个转化子中获得了 188 个成功转化的 TA 克隆, 用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Eco*O109I 将这 188 个 TA 克隆的 PCR 扩增产物进行双酶切, 酶切片段经 2% 的琼脂糖凝胶电泳分析, 得到 188 条电泳谱图。其中 32 个样品谱图中电泳条带明显不同(图 1)。最终挑选其中编号为 3, 7, 14, 25, 30, 43, 44, 65, 73, 79, 88, 89, 03, 04, 06, 011, 021, 033, 057, 061, 080 这 21 个样品进行序列测定。

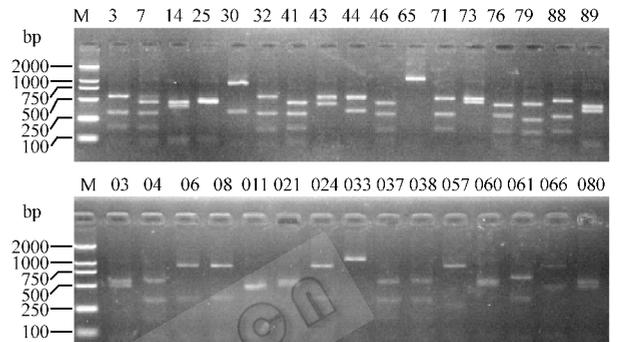


图 1 限制性片段长度多态性分析

Fig.1 Restriction fragment length polymorphism analysis

M. DNA Marker DL2 000; Others are samples.

2.3 繁茂膜海绵相关微生物 16S rDNA 序列的相似性比较和系统发育分析

将测得的 21 个序列信息分别输入 GenBank 中进行比较, 7 个序列与真核生物的 18S rDNA 序列相似性为 98%, 其中 H04、H021、H25、H057 属于真菌, H033、H43、H44 属于红藻, 需要获得它们的线粒体或叶绿体基因信息才能进一步鉴定。其他 14 个样品 6 个序列属于 α -Proteobacteria 类群, 7 个序列属于 γ -Proteobacteria 类群, 1 个序列属于 Actinobacteria 类群(表 1)。使用 ClustalX(Version 1.8) 等软件进行多序列比对及系统发育树的构建, 结果分别见图 2、图 3 和图 4。

α -Proteobacteria 类群是陆地土壤环境以及海水中占优势的类群^[8], 繁茂膜海绵采集于靠近城市生活区的浅海潮间带, 通过滤食陆地流入海中的微生物, 其体内存在大量的 α -Proteobacteria 类群微生物是合理的。在进化关系上, 这 6 个克隆和鞘氨醇单胞菌属等专性好氧微生物关系比较接近, 可能是需氧的微生物类型。其中 H7、H89、H3、H79 构成一簇, 和其他种属的微生物自然分开, 和 GenBank 中比对的已知序列相似性低, 很可能是海洋中特有的微生物新属种。Webster 等^[4]对澳大利亚大堡礁附近海绵 *Rhopaloeides odorabile* 的微生物多样性分析中, 未

表 1 繁茂膜海绵相关微生物 16S rDNA 克隆的序列分析

Table 1 Sequence analysis of sponge-associated bacteria 16S rDNA clones of *Hymeniacidon perleve* collected in China Yellow Sea

Clone number	Sequence length bp	Reference strains and similarity values	Subgroup
H3	992	<i>Novosphingobium subarcticum</i> 94%	α -Proteobacteria
H04	994	<i>Novosphingobium subarcticum</i> 94%	α -Proteobacteria
H7	991	uncultured alpha proteobacterium in the marine sponge 96%	α -Proteobacteria
H73	958	marine bacterium 97%	α -Proteobacteria
H79	983	<i>Novosphingobium subarcticum</i> 94%	α -Proteobacteria
H89	986	Elbe River snow isolate bacterium 89%	α -Proteobacteria
H03	994	sulfur-oxidizing bacterium 86%	γ -Proteobacteria
H011	998	<i>Lucina nassula</i> gill symbiont 86%	γ -Proteobacteria
H30	986	sulfur-oxidizing bacterium from a hydrothermal vent water 86%	γ -Proteobacteria
H061	987	uncultured gamma proteobacterium from Antarctic Continental Shelf Sediment 90%	γ -Proteobacteria
H65	983	sulfur-oxidizing bacterium from a hydrothermal vent water 86%	γ -Proteobacteria
H080	984	uncultured Bacteroidetes bacterium 99%	γ -Proteobacteria
H88	977	Uncultured Verrucomicrobia bacterium from the Arctic Ocean 96%	γ -Proteobacteria
H14	988	uncultured bacterium from marine salinity meromictic lakes 97%	Actinobacteria

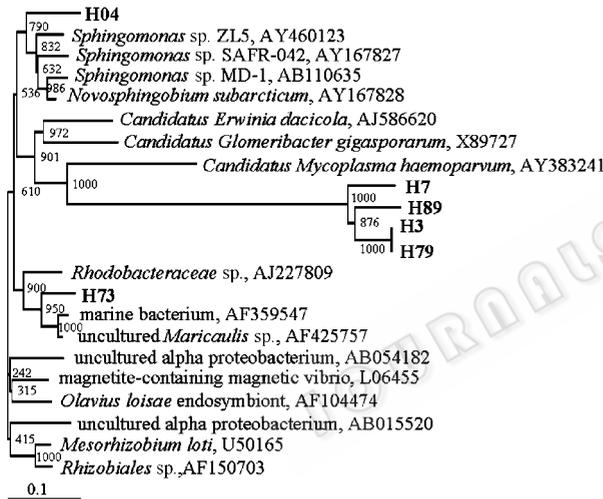
图 2 α -Proteobacteria 类群 16S rDNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic tree from the analysis of 16S rDNA gene sequence from clones clustering within the predominantly α -Proteobacteria

发现 α -Proteobacteria 类群微生物的存在。海绵 *R. odorabile* 采集于 13 米深的水下且环境污染相对较轻,两者微生物种群之间的不同可能来自海绵生长地域及种属的差异。

由图 4 可见,在 γ -Proteobacteria 类群中, H061、H65、H30、H03、H080、H011、H88 大多都和未可培养的微生物相关。在这个发育树中, H080 与从 Delaware 河河口分离到的不可培养 *Bacteroidetes* sp. 的相似性达到 99%, 可以认为是同一种微生物。H03, H30, H65, H011 与 GenBank 中能找到的最相近序列的相似性都为 86%, 可能都是新发现的基因序列,

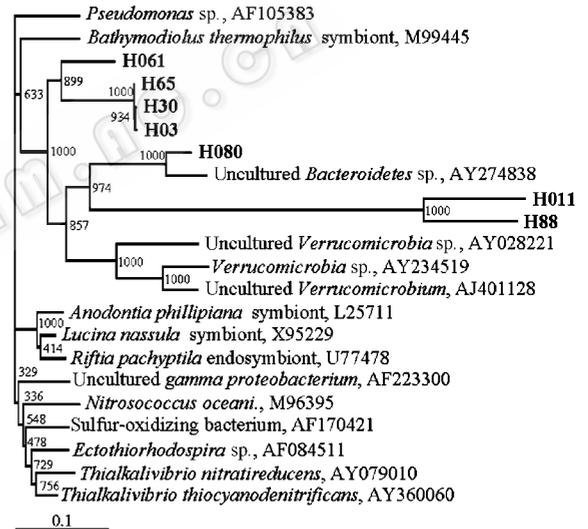
图 3 γ -Proteobacteria 类群 16S rDNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree from the analysis of 16S rDNA gene sequence from clones clustering within the predominantly γ -Proteobacteria

而和这 7 个克隆进化关系比较接近的拟杆菌属 (*Bacteroides*) 等微生物是厌氧类型。已有报道,在太平洋和大西洋的海域中 γ -Proteobacteria 亚群是占优势的微生物类群^[8], 本文的结果表明 γ -Proteobacteria 亚群也是繁茂膜海绵中发现的优势微生物菌群。

所分析的样品中仅有一个放线菌 H14, 相对于其他两大优势类群数量偏少, 该序列与一株从盐湖中发现的未可培养的放线菌 (AF142934) 16S rDNA 序列相似性为 97%。

和繁茂膜海绵中 16S rDNA 克隆进化关系相近

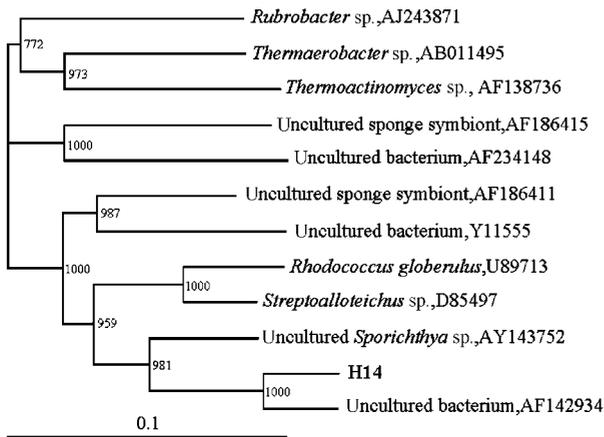


图4 *Actinobacteria* 类群 16S rDNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig.4 Neighbor-joining phylogenetic tree from the analysis of 16S rDNA gene sequence from clones clustering within the predominantly *Actinobacteria*

的微生物既有好氧的类型,也有厌氧的类型。一般认为海绵由于不停地吞吐海水,其体内的氧气供应是充足的,因此海绵中存在厌氧微生物的几率较小^[9]。但是已有报道在海绵体内存在着兼性厌氧微生物,通过进化关系上的推断,在繁茂膜海绵中也存在着厌氧的微生物类群,意味着在海绵体内不同空间存在着供水能力的差异,这为好氧微生物和厌氧/兼性厌氧微生物的共存提供了环境。

本文通过对黄海繁茂膜海绵中相关微生物 16S rDNA 克隆的构建与分析,对繁茂膜海绵相关微

生物的种群分布有了总体的了解,并发现了该海绵中存在较多未培养微生物的遗传信息。这一研究结果对该海绵相关微生物资源的开发应用具有一定的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Haygood M G, Schmidt E W, Davidson S K, et al. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1999, **1**(1) 33-43.
- [2] Faulkner D J. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2000, **17**: 7-55.
- [3] Vacelet J, Donadey C. Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J Exp Mar Biol Ecol*, 1977, **30**: 301-314.
- [4] Webster N S, Wilson K J, Blackall L L, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloides odorabile*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 434-444.
- [5] Harwood A J. DNA 及 RNA 基本实验技术. 盛小禹,等译. 北京: 科学出版社, 2002, 3-8.
- [6] Harwood A J. DNA 及 RNA 基本实验技术. 盛小禹,等译. 北京: 科学出版社, 2002, 242-244.
- [7] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册. 北京: 科学出版社, 2001, 362-363.
- [8] Heike E, Jakob P, Amann R, et al. Culturability and *in situ* abundance of pelagic bacteria from the north sea. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3044-3051.
- [9] Osinga R, Armstrong E, Burgess J G, et al. Sponge-microbe associations and their importance for sponge bioprocess engineering. *Hydrobiol*, 2001, **461**: 55-62.

Bacteria Diversity Associated with the Marine Sponge *Hymeniacidon perleve* in China Yellow Sea

Xu Jun-Yi Jin Yan Yu Xing-Ju Jin Mei-Fang Zhang Wei*

(Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

Abstract: The bacteria distribution and phylogenetic diversity of the marine sponge *Hymeniacidon perleve*, collected from China Yellow Sea were studied by TEM and 16S rDNA sequencing respectively. The phylogenetic affiliation of sponge-associated microorganisms was determined by 16S rDNA sequencing of cloned DNA fragments. 21 clones were found to be unique with 7 attributed to eukaryotes, the other 14 of isolated 16S rDNA sequences were attributed to be α -*Proteobacteria* (6), γ -*Proteobacteria* (7) and *Actinobacteria* (1). The similarity values for 9 of the clones and the reference sequences blasted in the GenBank were below 95%. In the phylogenetic trees, most of the isolated clones were clustered in one group and differentiated clearly from the other reference sequences. The results indicated that all the 14 isolates were candidates for new genus or species of bacteria associated with *Hymeniacidon perleve*.

Key words: China Yellow Sea, Marine sponge, *Hymeniacidon perleve*, 16S rDNA sequence, Phylogenetic diversity

Foundation item: Major Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2003CB716001)

* Corresponding author. Tel/Fax 86-411-84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

Received date: 01-12-2004