

# FtsZ 蛋白同源性分析在乳酸菌系统学研究中的应用

张 斌 东秀珠\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** FtsZ 是一种广泛存在于细菌和古菌中的结构保守的蛋白质,在细胞分裂的过程中起关键的作用。通过 PCR 扩增 FtsZ 基因的一段 800bp 的核苷酸,构建了干酪乳杆菌-片球菌及相关乳酸菌的 FtsZ 蛋白系统发育树。将此系统树和 16S rDNA 系统树比较发现二者的拓扑结构非常相似。在两个基因系统树中,片球菌与乳杆菌的种均显示了较近的亲缘关系,而与其它球状的乳酸菌,如链球菌和肠球菌的亲缘关系较远。研究还表明 FtsZ 蛋白序列的分辨率高于 16S rDNA,更适用于乳酸菌种间的系统分类研究。

**关键词** 乳杆菌,片球菌,FtsZ,系统发育分析

中图分类号:Q939 文献标识码:A 文章编号:1001-6209(2005)05-0661-04

乳酸菌是一类能利用可发酵糖产生大量乳酸的革兰氏阳性细菌,除双歧杆菌外,都属于低 GC 革兰氏阳性细菌分支<sup>[1]</sup>。乳酸菌是一群非常异源的细菌,其细胞形状有杆状和球状;其乳酸代谢类型既有同型发酵,又有异型发酵和兼性异型发酵<sup>[2]</sup>。

乳酸菌自发现以来,各属的分类地位一直变化不定。自 16S rRNA 同源性分析应用于细菌分类学以来,乳酸菌各属间的亲缘关系也被进一步阐明。虽然 16S rRNA 被公认为是用于系统学研究的最理想的生物大分子,但在一些细菌类群的分类中也存在分辨率低和与重要表型不符的现象。如果依据 16S rRNA 系统学分析,乳酸菌中分别为杆状的乳杆菌和球状的片球菌聚为一群,这不仅与它们的细胞形态不符,而且与它们的代谢类型也不一致。因此有必要用其它的生物大分子来探讨细菌的亲缘关系,以作为 16S rRNA 系统发育分析的补充。FtsZ<sup>[3]</sup> 是一种广泛存在于细菌和古菌中的结构保守的蛋白质,它在细胞分裂的过程中起关键的作用,是真核生物中微管蛋白的类似物。研究表明 FtsZ 具有 GTPase 的活性,其 N 端的一段 300 多个氨基酸残基的肽段是 GTP 的结合位点和水解位点,且氨基酸序列比较保守,适用于细菌系统学研究<sup>[4]</sup>。本文根据 FtsZ 近 N 端的部分氨基酸序列的同源性探讨了干酪乳杆菌群和片球菌以及相关乳酸菌的系统发育学关系,并将其结果与 16S rRNA 的系统发育学进行了比较。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂和仪器

DNA 聚合酶、pUCm-T 质粒、T4 DNA 连接酶、DNA 凝胶回收试剂盒均购自上海申能博彩生物科技有限公司。其它试剂均为分析纯。PCR 仪为 Thermolyne Amplitron I (Barnstead Thermolyne Corporation)。

### 1.2 菌株和培养条件

片球菌的模式菌株均来自德国微生物保藏中心(DSM),试验中的分离菌株及来源见表 1。所有菌株均采用 MRS 液体培养基<sup>[5]</sup>,37℃ 好氧培养。

表 1 试验菌株及来源

Table 1 Strains used in this study and isolation sources	
Strains and numbers	Sources
<i>Pediococcus parvulus</i> DSM20332 <sup>T</sup>	DSM
<i>Pediococcus inopinatus</i> DSM20285 <sup>T</sup>	DSM
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM20284 <sup>T</sup>	DSM
<i>Pediococcus pentosaceus</i> DSM20336 <sup>T</sup>	DSM
<i>Pediococcus</i> sp. Z-8	Spirit cellar of Liulinzui Spirit Factory of Hebei
<i>Pediococcus</i> sp. Z-9	Spirit cellar of Liulinzui Spirit Factory of Hebei
<i>Pediococcus</i> sp. J-11	Spirit cellar of Jinxiangyu Spirit Factory of Sichuan

### 1.3 生理生化试验

将分离菌株接种于 PYG 培养基中,37℃ 培养

基金项目 国家自然科学基金重点基金(30230020);中国科学院知识创新项目(KSCX2-SW-101C)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-62558320; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

作者简介 张 斌(1980-)男,湖北天门人,硕士研究生,主要从事乳酸菌资源和系统发育学研究。E-mail: huyingui1@163.com

收稿日期 2005-03-10,修回日期 2005-04-08

72h 后,用气相色谱 GC-14E (Shimadzu) 测定代谢产物乳酸和乙酸。 $N_2$  作为载气,柱温  $150^\circ\text{C}$ ,进样器温度  $180^\circ\text{C}$ ,检测器温度  $200^\circ\text{C}$ 。碳水化合物产酸的测定采用传统的方法<sup>[6]</sup>和 API50 CH 试剂盒进行。接触酶试验和精氨酸水解试验均参照文献 [6] 进行。

#### 1.4 片球菌 16S rDNA 与 FtsZ 基因的 PCR 扩增

按照 Marmur<sup>[7]</sup>的方法提取基因组 DNA,并溶于  $0.1 \times \text{SSC}$  溶液中。16S rDNA 的扩增采用细菌通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCC/ATGGCTCAG-3') 和 1541R (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (上海申能博彩生物科技有限公司合成),它们分别对应于大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 16S rDNA 8~27 位和 1525~1541 位的核苷酸。PCR 反应体系 ( $25 \mu\text{L}$ ):  $10 \times \text{PCR}$  缓冲液 (含  $20\text{mmol/L MgCl}_2$ )  $2.5 \mu\text{L}$ ,  $2.5\text{mmol/L}$  dNTP 混合液  $2.5 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol/L}$  引物各  $2.5 \mu\text{L}$ , *Taq* DNA 聚合酶  $0.2 \mu\text{L}$  ( $5\text{U}/\mu\text{L}$ ), DNA 模板  $1 \mu\text{L}$  ( $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 去离子水  $13.8 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件:  $94^\circ\text{C}$  5min;  $94^\circ\text{C}$  0.5min,  $55^\circ\text{C}$  1min,  $72^\circ\text{C}$  1.5min, 共 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10min。

根据 GenBank 数据库中一组乳酸菌的 FtsZ 基因序列的比对结果,设计合成了一对简并引物 (上海申能博彩生物科技有限公司)。正向引物序列为: 5'-GT(A,T)AT(C,T)GGTGT(C,A,T)GGTGG-3', 反向引物序列为: 5'-(G,T)CTTG(T,A,C,G)GCTTCAAA(T,C)AA-3', 它们分别对应于植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) FtsZ 基因 102~118 位和 929~945 位的核苷酸,扩增的 FtsZ 基因大小为 800bp 左右,编码 FtsZ 蛋白 N 端的一段 270 个氨基酸残基的保守序列。PCR 反应体系 ( $25 \mu\text{L}$ ):  $10 \times \text{PCR}$  缓冲液 (含  $20\text{mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ )  $2.5 \mu\text{L}$ ,  $2.5\text{mmol/L}$  dNTP 混合液  $2.5 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol/L}$  引物各  $2.5 \mu\text{L}$ , *Taq* DNA 酶  $0.2 \mu\text{L}$  ( $5\text{U}/\mu\text{L}$ ), DNA 模板  $1 \mu\text{L}$  ( $20\text{ng}/\mu\text{L}$ ), 去离子水  $13.8 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件:  $94^\circ\text{C}$  5min;  $94^\circ\text{C}$  0.5min,  $45^\circ\text{C}$  1min,  $72^\circ\text{C}$  1.5min, 共 30 个循环;  $72^\circ\text{C}$  10min。

将扩增的 16S rDNA 与 FtsZ 基因的 PCR 产物在 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳分离,经 DNA 凝胶回收试剂盒回收纯化。将纯化的 PCR 产物连接到载体 pUCm-T 上,转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 经蓝白斑筛选得到阳性克隆子,电泳鉴定后,送上海博亚公司测序。

#### 1.5 FtsZ 蛋白与 16S rDNA 序列同源性分析和系统发育树构建

将测得的 FtsZ 基因序列经 DNAMAN V4.0 软件翻译成氨基酸序列后,用 Blast P 软件在 NCBI 蛋白质数据库中搜索相似的序列并验证所测序列的正确性。将测得的 16S rDNA 序列用 Blast N 软件在 NCBI

核酸数据库中搜索与其相似性最高的 16S rDNA 序列。将从数据库中获得的高相似性的 FtsZ 蛋白序列和 16S rDNA 序列用 DNAMAN V4.0 软件分别进行同源性分析,并以 *E. coli* 为外群分别构建 FtsZ 蛋白和 16S rDNA 系统发育树,分支聚类的稳定性用 Bootstrap 方法进行评价。

## 2 结果

### 2.1 分离菌株的鉴定

菌株 Z-8、Z-9 和 J-11 的细胞均为球形,直径  $0.8 \sim 1.0 \mu\text{m}$ , 成对或四联状。细胞革兰氏染色阳性,不运动,不形成芽孢,兼性厌氧。接触酶阴性,不水解精氨酸。起始 pH4.5 生长良好,但不生长于 10% NaCl。发酵葡萄糖只产乳酸,不产乙酸,不产气。因此菌株 Z-8、Z-9、J-11 均为片球菌属的菌株 (表 1)。

碳水化合物产酸试验显示菌株 Z-8、Z-9 和 J-11 与已知片球菌种均有明显区别,它们均发酵乳糖、麦

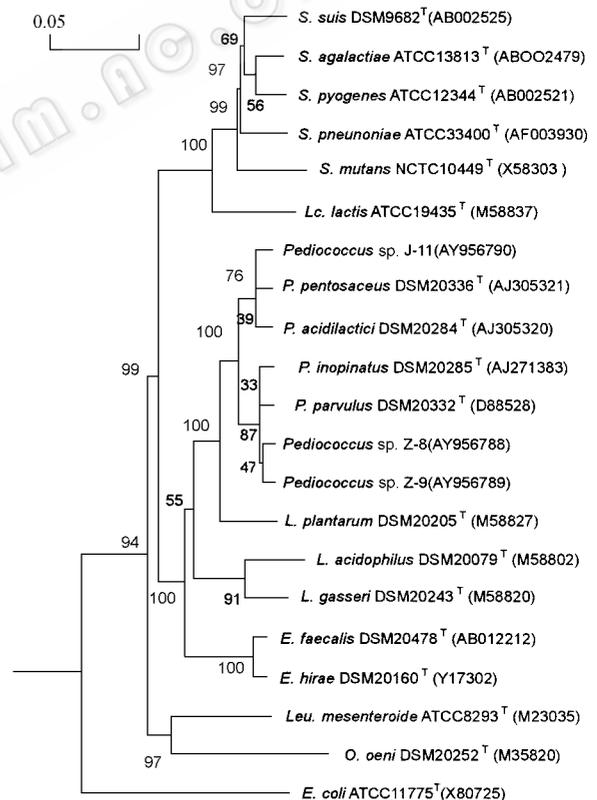


图 1 片球菌及相关乳酸菌的 16S rDNA 系统发育树

Fig.1 Phylogenetic tree of *Pediococci* and related lactic acid bacteria based on 1400 bp-fragment of 16S rDNA

The tree with *E. coli* as out group control was constructed by the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 100 trees. The numbers at each clustering node indicate the percentage of bootstrap supporting, and in the parentheses after each bacterial name are 16S rDNA accession numbers in GenBank. (Bar, 5% sequence divergence)

芽糖、蔗糖和海藻糖产酸,但不利用甘油和山梨醇产酸。其中菌株 Z-8 和 Z-9 能利用阿拉伯糖和鼠李糖产酸,但不利用松三糖、淀粉、糊精、甘露醇产酸,二者的区别在于 Z-8 能够利用核糖和木糖,但不利用  $\alpha$ -甲基葡萄糖苷,而 Z-9 则相反。菌株 J-11 和 Z-8 及 Z-9 的差别是能利用核糖、松三糖、淀粉、糊精和甘露醇产酸,但不利用阿拉伯糖、木糖和鼠李糖产酸。

16S rDNA 同源性分析(图 1)表明,菌株 Z-8 和 Z-9 属于有害片球菌-意外片球菌-小片球菌群的成员,相似性为 98.4%;而菌株 J-11 属于戊糖片球菌-乳酸片球菌群的成员,相似性为 97.9%。

### 2.2 系统发育学分析

分别用长 1400bp 的 16S rDNA 和长 250 氨基酸的 FtsZ 蛋白部分序列构建了以乳杆菌属和片球菌属为主的系统发育树(图 1,2),同时还包括链球菌属、肠球菌属、乳球菌属、明串珠菌属和酒球菌属。从图 1 和图 2 中可以看出,乳酸菌的 FtsZ 蛋白和 16S rDNA 系统树在拓扑结构上非常相似。在两个树上,片球菌属与乳杆菌属均显示了较近的亲缘关系;而与乳酸菌中的其它球菌,如链球菌属和肠球菌属亲缘关系较远。

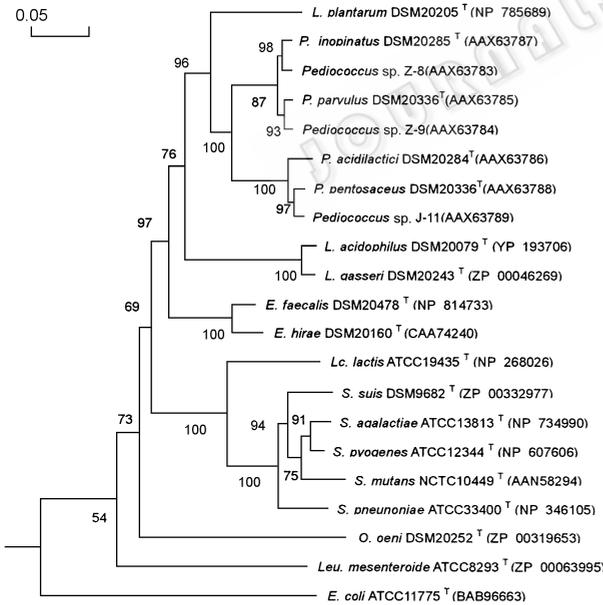


图 2 片球菌及相关乳酸菌的 FtsZ 蛋白系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree of *Pediococci* and related lactic acid bacteria based on 250 amino acids of FtsZ protein

The tree with *E. coli* as out group control was constructed by the neighbor-joining method with bootstrap values calculated from 100 trees. The numbers at each clustering node indicate the percentage of bootstrap supporting, and in the parentheses after each bacterial name are FtsZ accession numbers in GenBank. (Bar, 5% sequence divergence)

### 2.3 FtsZ 与 16S rDNA 在乳酸菌种属间分辨力的比较

通过比较乳酸菌相关属和种间的 FtsZ 蛋白和 16S rDNA 序列的相似性发现,无论是种间还是属间,FtsZ 蛋白的相似性均低于 16S rDNA(表 2)。

表 2 片球菌及相关乳酸菌的 FtsZ 蛋白与 16S rDNA 的同源性比较(%)

Item	Inter-species	Inter-genus
FtsZ	85 ~ 97	64 ~ 84
16S rDNA	92 ~ 99	87 ~ 92

### 3 讨论

在定向进化同源基因用于细菌的系统进化研究之前,细菌的系统进化研究主要依赖于表型特征,如菌体形态、代谢类型、细胞壁组成等。由于细菌为单细胞生物,不具有高等动植物那样的复杂结构,因此依据表型的细菌系统进化研究常常会产生偏差[8]。上世纪 70 年代末,Woese 采用核酸编目法,证明核糖体小亚基 RNA 基因序列是作为系统发育研究适宜的大分子,并构建了泛生命树。在此泛生命树上首次揭示了古菌的存在,并提出了生命的三域学说。目前这一学说已得到公认[9]。然而上世纪 90 年代的研究表明基因可以在不同的物种间,甚至原核生物和真核生物间转移,即基因的横向转移,这使得单基因的系统学的研究有时也会产生偏差[10]。16S rDNA 同样也无法避免基因的横向转移,因此用 16S rDNA 结合其它的基因进行多基因的系统学研究,得出的结论应该更客观。

本文根据 FtsZ 蛋白的同源性探讨了一些乳酸菌,重点是杆状和球状乳酸菌的系统发育学关系,并与 16S rDNA 的系统进行了比较。在 FtsZ 蛋白和 16S rDNA 的系统树中,片球菌与乳杆菌均显示出较近的亲缘关系,而与乳酸菌中的其它球菌,如链球菌和肠球菌亲缘关系较远,这说明片球菌和乳杆菌的亲缘关系确实较近,同时也说明在细菌的系统进化研究中菌体形态并不是可靠的指标。最近的研究表明细菌的形态是由少数几个基因决定的,往往一个基因的失活就能导致细胞的形态发生根本的变化[11]。因此细菌形态在其进化过程中可能发生了多次变化,这也说明了为什么菌体形态不是很好的系统进化指标。而像细胞壁的成分和中央代谢等一

些保守的特征都是由几十个基因决定的,在进化过程中不可能多次起源,因此这些性状可以作为可靠的系统进化指标。

本文的研究还表明,虽然 16S rDNA 的系统分类研究较适用于属以上的分类单位,但对属以下的分类单位,如种和亚种就显得分辨率不足。而 FtsZ 基因和蛋白在乳酸菌种间的相似性低于 16S rDNA,具有较高的分辨率,因此适用于低分类阶元如乳酸菌种间的系统分类研究。

另外根据 16S rDNA 和 FtsZ 系统发育分析,显示从酒窖中分离的 3 株片球菌菌株和已知片球菌种的相似性均较低,而且生理生化特征也有明显区别,说明酒窖中可能存在特有的片球菌种,它们的分类地位尚需进一步研究确定。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Sneath P H A, Mair N S, Sharpe M E, *et al.* Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins. ed. 1986, Vol.2: 999 - 1418.
- [ 2 ] 杨洁彬,郭兴华.乳酸菌-生物学基础和应用.北京:中国轻工

业出版社,1996.

- [ 3 ] Wang X, Lutkenhaus J. FtsZ ring: the eubacterial division apparatus conserved in archaeobacteria. *Microbiology*, 1996, **21**( 2 ): 313 - 319.
- [ 4 ] Zaher Z, Liang Z, Didier R. Genetic classification and differentiation of *Bartonella* species based on comparison of partial *ftsZ* gene sequences. *J Clin Microbiol*, 2002, **40**: 3641 - 3647.
- [ 5 ] De Man J D, Rogosa M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol*, 1960, **23**: 130 - 135.
- [ 6 ] 凌代文,东秀珠.乳酸细菌分类鉴定及试验方法.北京:中国轻工业出版社,1999.
- [ 7 ] Marmur J. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganism. *J Mol Biology*, 1961, **3**: 208 - 218.
- [ 8 ] Woese C R. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*, 1987, **51**: 221 - 227.
- [ 9 ] Woese C R. Towards a natural system of organism: Proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4576 - 4579.
- [ 10 ] Brown J R, Doolittle W F. Archaea and the prokaryote-eukaryote transition. *Microbiol Mol Biol Rev*, 1997, **61**: 456 - 502.
- [ 11 ] Jones L J, Carballido-Lopez R, Errington J. Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 2001, **104**( 6 ): 913 - 922.

## Partial sequence homology of FtsZ in phylogenetics analysis of lactic acid bacteria

ZHANG Bin DONG Xiu-zhu\*

( Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China )

**Abstract:** FtsZ is a structurally conserved protein, which is universal among the prokaryotes. It plays a key role in prokaryote cell division. A partial fragment of the *ftsZ* gene about 800bp in length was amplified and sequenced and a partial FtsZ protein phylogenetic tree for the lactic acid bacteria was constructed. By comparing the FtsZ phylogenetic tree with the 16S rDNA tree, it was shown that the two trees were similar in topology. Both trees revealed that *Pediococcus* spp. were closely related with *L. casei* group of *Lactobacillus* spp., but less related with other lactic acid cocci such as *Enterococcus* and *Streptococcus*. The results also showed that the discriminative power of FtsZ was higher than that of 16S rDNA for either inter-species or inter-genus and could be a very useful tool in species identification of lactic acid bacteria.

**Key words:** Lactobacilli, Pediococci, FtsZ, Phylogenetic analysis

Foundation item: Key Program of National Natural Science Foundation of China( 30230020 )

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62558320; E-mail: dongxz@sun.im.ac.cn

Received date: 03-10-2005