

16S rDNA-RFLP 分析繁茂膜海绵可培养放线菌的多样性

张海涛^{1,2} 靳 艳¹ 虞星炬¹ 张 卫^{1*}

(¹ 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)

(² 中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 海绵是迄今为止已知海洋天然产物的最大来源。由于海绵的底栖过滤性摄食和消化选择性等生理特性,其体内蕴藏了丰富的微生物种群。近几年来,发现越来越多的海绵微生物产生很强的生物活性物质,有些并被证明是海绵天然产物的真正生产者。对大连海域繁茂膜海绵中的放线菌进行分离,对于得到的菌株进行 16S rDNA 扩增和 RFLP 及测序分析。研究表明海绵中蕴含着丰富的放线菌资源。其中包含链霉菌(*Streptomyces*),拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis*),假诺卡氏菌(*Pseudonocardia*),诺卡氏菌(*Nocardia*),小单孢菌(*Micromonospora*),红球菌(*Rhodococcus*),异壁放线菌(*Actinoalloteichus*)等属。利用限制性内切酶 *Hha* I 对 16S rDNA 进行的 RFLP 分析能够对海绵中放线菌的 16S rDNA 多样性进行有效的分析,结果达到属,部分到种的级别。揭示了繁茂膜海绵中蕴藏着丰富的放线菌资源。

关键词 繁茂膜海绵,放线菌,RFLP,多样性

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)06-0828-04

海绵属于动物界多孔动物门(Porifera),是一大类低等多细胞海洋动物,是热带海礁中除珊瑚外的第二大生物量。海绵虽然是一类非常简单的生物,却能产生丰富的生物活性物质。就目前所知,海绵是迄今为止海洋天然产物的最大来源。天然产物研究开发的国际权威杂志“Natural Products Reports”每年度都进行海洋天然产物综述,从最近 3 年(2002~2004)在各类杂志上发表的海洋天然产物来看,来源于海绵的分别占到了 36.3%(316/869),38.2%(303/793)和 32.6%(247/756)^[1-3]。

近些年,随着研究方法的发展和研究内容的深入,从海绵中发现了越来越多的微生物,并从中发现了许多活性物质,而其中有些活性物质过去曾被认为是海绵本身产生的。例如 Perovic 等^[4]从海绵 *Halichondria panicea* 中的微生物 *Antarcticum veiculatum* 和 *Psychroserpens burtonensis* 中分离得到了具有神经活性的化合物。Debitus 等^[5]从海绵 *Suberea creba* 中分离得到的假单胞菌能够产生奎诺龙类抗生素。

放线菌是一类具有重要工业价值的细菌,在抗生素生产和酶制剂产业中具有很重要的地位^[6]。目前大约 70% 的抗生素类都生产自放线菌。通过分

子生物学方法,对海绵中放线菌进行检测表明,海绵 *Rhopaloeides odorabile* 中蕴含着丰富的放线菌资源^[7]。

潮间带的繁茂膜海绵在大连海域分布比较广泛,在过去的研究中我们发现很多具有活性的天然产物^[8]。同时通过非培养手段,对海绵相关微生物的基因进行提取和细菌多样性分析,发现其中蕴涵着丰富的微生物资源^[9]。本研究的工作集中在从繁茂膜海绵中进行放线菌的分离,在获得可培养菌株基础上,对其菌株的 16S rDNA 进行 RFLP 分析来指导对其多样性的分析和菌种鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料 TSB 培养基为美国 Difco 公司产品,PCR 扩增试剂盒购自大连宝生物公司;引物 8f,1492r 等由大连宝生物公司合成。限制性内切酶 *Hha* I 为 Promega 公司产品。

1.1.2 菌株分离 在大连地区潮间带海域采集新鲜繁茂膜海绵(*Hymeniacidon perleve*)。其种属由中国科学院青岛海洋所李锦和研究员鉴定。采用不同的分离手段获得放线菌 106 株。

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 张海涛(1978-)男,山东人,博士研究生,研究方向为海绵微生物。E-mail: zhanght@dicp.ac.cn

收稿日期 2005-03-18,修回日期 2005-06-06

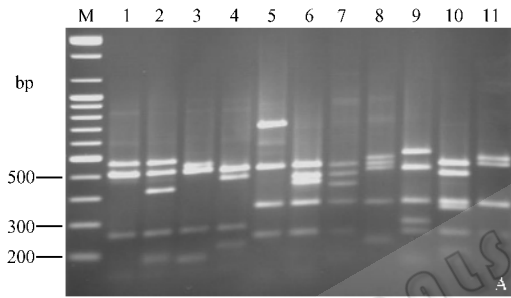
1.2 基因组 DNA 提取和 16S rDNA 的 PCR 反应

将放线菌菌株在 TSB 培养基上进行试管规模培养 3d 左右后,采用改良细菌基因组 DNA 提取方法对纯化后放线菌进行基因组 DNA 提取^[10]。根据细菌 16S rDNA 保守序列,合成引物:8f(5'-GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492r (5'-TACGGCTACCTTGTCTCAG-3')。

PCR 反应体系 (50 μ L): 5 μ L 10 $\times$ Buffer (Mg²⁺ free), 5 μ L 2.5nmol/L MgCl₂, 8 μ L dNTP mixture(各 2.5nmol/L), 正负引物各 1 μ L(20 μ mol/L), 1 μ L 模板 DNA(小于 1 μ g), 0.5 μ L Taq 酶。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5min ; 94 $^{\circ}$ C 1min 55 $^{\circ}$ C 1min 72 $^{\circ}$ C 2min 30 个循环 72 $^{\circ}$ C 7min。

1.3 RFLP 分析和序列分析

16S rDNA 扩增产物在限制性内切酶 Hha I 作



用于 37 $^{\circ}$ C 下反应 2h , 然后进行琼脂糖凝胶电泳。同时 16S rDNA 扩增产物经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后进行测序分析。测序结果和 NCBI 的 GenBank 进行 Blast 分析,采用序列分析软件 Phytit 用 N-J 法进行系统发育树的构建。同时将测序结果输入软件 Vector NTI 运用其中的模拟 RFLP 分析,模拟实际的电泳条件,最后将结果输出。

2 结果

2.1 RFLP 分析

在对放线菌 16S rDNA 进行成功扩增后,我们选取了 106 株海绵放线菌的 16S rDNA 进行 Hha I 的 RFLP 分析。结果表明,采用 Hha I 能将这 106 个样品的 16S rDNA 分成 11 类(图 1-A)。



图 1 (A)海绵放线菌 16S rDNA 的 RFLP 结果 (B)海绵放线菌 16S rDNA 序列用 Vector NTI 模拟 RFLP 结果
Fig.1 (A)RFLP of 16S rDNA of actinomycetes ; (B)Simulated RFLP of 16S rDNA of actinomycetes sequence using Vector NTI
M. DNA Marker ; 1 ~ 11. RFLP patterns of actinomycete 16S rDNA.

2.2 16S rDNA 测序和系统发育分析

将 106 株放线菌的 16S rDNA 采用 518r (5'-GTATTACCGCGGCTGCTGG-3') 进行一个反应的测序

分析,将序列结果提交 NCBI 进行 Blast 分析后,对 106 个样品进行属一级别的归类。然后结合 RFLP 的带型结果。比较测序结果和 RFLP 结果绘制表 1。

表 1 繁茂膜海绵可培养放线菌 16S rDNA 的序列分析和 RFLP 分析

Table 1 Sequence and RFLP analysis of 16S rDNA of actinomycetes from marine sponge <i>Hymeniacidon perleve</i>			
RFLP type	Strain No.	The closest species	Similarity %
1	I 5 , 53 , 55 , B1 , 130 , B32 , 61 , 62 , 77 , 109 , 111 , 131 , 144 , 147 , 151 , 156 , 181 , 182 , 202 , B23 , B40	<i>Streptomyces tendae</i>	98.86
	II 136 , 194 , B37	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	99.79
	III 72	<i>Streptomyces gougerotii</i>	99.93
	IV 135	<i>Streptomyces argenteolus</i>	99.93
	V 124 , B43	<i>Streptomyces rimosus</i>	97.78
2	I 1 , 4 , 8 , 12 , 14 , 20 , 31 , 33 , 41 , 42 , 44 , 45 , 46 , 50 , 58 , 65 , 68 , 69 , 73 , 74 , 80 , 84 , 85 , 86 , 87 , 89 , 91 , 94 , 96 , 100 , 125 , 127 , 142 , 154 , 185 , 200 , B17 , B19 , B31 , B33 , B38 , B41	<i>Streptomyces coelicolor</i>	99.28
	II 22 , 66 , 99 , 132 , 137 , 150 , B20	<i>Streptomyces caviscabies</i>	99.50
3	I 160	<i>Streptomyces paradoxus</i>	99.07
4	I 138 , 145 , 157 , 158 , 162 , 163 , 173	<i>Nocardiopsis lucentensis</i>	98.70
5	I 19 , 47 , 81 , 112 , 132 , 141 , 170 , 198 , 201 , B10 , B35	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i>	99.43
6	I 146 , 188 , 192	<i>Pseudonocardia antarctica</i>	99.85
7	I 95 , 180 , B8	<i>Nocardia salmonicida</i>	99.78
8	I 172 , B6	<i>Micromonospora aurantiaca</i>	100.00
9	I 177	<i>Actinoalloteichus cyanogriseus</i>	96.72
10	I 140	<i>Rhodococcus opacus</i>	98.47
11	I		

并将其中的典型菌株进行 16S rDNA 全长测序 ,并提交 NCBI 进行 Blast ,找到其相似性最高的菌株和最高相似度值。部分序列测定表明 ,106 株菌中链霉菌(*Streptomyces*)为优势种群 ,占 73.6%(78/106) ,另外有 18 株属于拟诺卡氏菌(*Nocardiopsis*) ,3 株假诺卡氏菌(*Pseudonocardia*) ,3 株诺卡氏菌(*Nocardia*) ,2 株小单孢菌(*Micromonospora*) ,1 株红球菌(*Rhodococcus*) ,1 株异壁放线菌(*Actinoalloteichus*)。

将测序所得到的全长输入软件 Vector NTI 8.0 ,模拟实际电泳条件 ,进行分析 ,分析结果表明模拟电

泳所得的结果和实际电泳的结果十分吻合(图 1-B)。对全长测序结果采用软件 Phylit 选用 N-J 法进行系统发育树的构建。为了更好的在进化上对海绵中放线菌种群进行区分 ,绘制链霉菌和稀有放线菌 2 个进化树。通过图 2 可以看出 ,繁茂膜海绵中可培养链霉菌多样性很高 ,在不同链霉菌属内不同种之间形成分支。对稀有放线菌的进化树分析可以看到(图 3) ,繁茂膜海绵中包含 6 种不同的稀有放线菌 ,显示了很高的多样性。

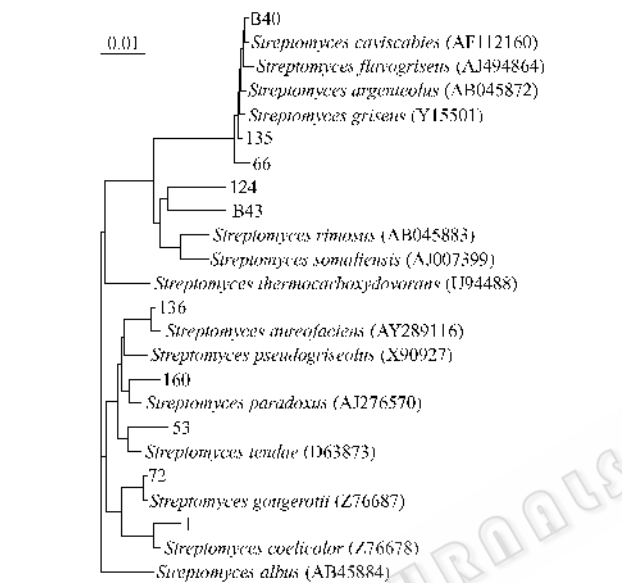


图 2 链霉菌 16S rDNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic tree analysis of 16S rDNA of genus *Streptomyces*

Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 1 % sequence divergence.

对序列测定结果和 *Hha* I 酶 RFLP 分析进行比较发现 *Hha* I 能很好的区分海绵中的放线菌。能够达到属的水平 ,对于链霉菌属和拟诺卡氏菌属能区分到低于属级别的水平(结果见表 1)。例如带型 1、2、3、4 属于链霉菌属 ;带型 5 和 6 属于拟诺卡氏菌 ;带型 7 属于假诺卡氏菌属 ;带型 8 属于诺卡氏菌属 ;带型 9 属于小单孢菌属 ;带型 10 属于异壁放线菌属 ;带型 11 为红球菌属。

3 讨论

16S rDNA 是原核生物核糖体 16S rRNA 的编码基因。由于其在进化过程中的高度保守和不同菌株之间差异的特异性 ,被细菌学家和分类学家所接受成为菌种鉴定的一个基本指标。由于放线菌属于高“ GC ”含量的细菌。某些高 GC 区是其可变序列 ,即

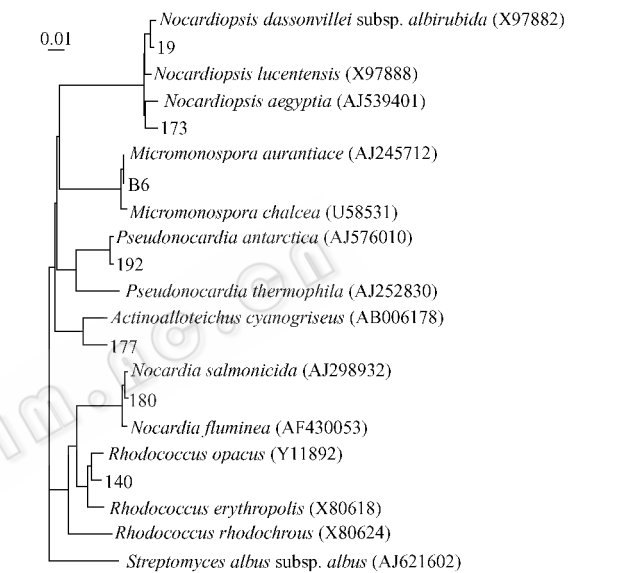


图 3 稀有放线菌 16S rDNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree analysis of 16S rDNA of rare actinomycetes

Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar , 1 % sequence divergence.

其特征序列所在区域。因此在此选择了 *Hha* I 作为 RFLP 分析用的限制性内切酶。 *Hha* I 能特异性识别“ GCGC ”作为其酶切位点。Cook 等^[11]采用 4 种不同的限制性内切酶对放线菌进行 RFLP 分析 ,可达到属一级别的鉴定水平。 *Hha* I 16S rDNA-RFLP 分析结果表明 ,该方法能快速高效地提供菌株的鉴定信息 ,与 16S rDNA 测序相结合 ,能在节约测序费用的情况下准确得到菌株鉴定的分子信息。

链霉菌属在陆地土壤和其他生态环境中广泛分布 ,长期以来是抗生素生产的重要来源。同时由于链霉菌能够在复杂的生态条件下降解一些复杂的大分子 ,因此在酶制剂工业上也有广泛的用途。目前 ,越来越多的链霉菌从海洋中分离 ,其中相当一部分的代谢产物显示了很好的活性。而对于从海绵中分离得到链霉菌的报道近些年也日趋增多^[12,13]。我们

的研究对繁茂膜海绵中分离到的链霉菌进行 *Hha* I 16S rDNA-RFLP 分析, 结果表明能将该属分成 4 种类群, 达到低于属级别的分子鉴定水平。同时显示了繁茂膜海绵中蕴含着丰富的链霉菌资源。

在研究的菌株样品中有 18 株属于拟诺卡氏菌。有文献报道从海洋中分离得到该属的菌株并从中提取得到新环肽类化合物^[14]。对于繁茂膜海绵中分离得到的该属菌株, 采用 *Hha* I 对 16S rDNA 的 RFLP 分析能够将分离得到菌株分为两个类群, 即带型 5 和 6。其中带型 5 的一类比带型 6 的 16S rDNA 缺少一个酶切位点, 从而将两类区分开来。这或许能为该属的分子分类提供有益的借鉴。

诺卡氏菌、红球菌和小单孢菌这几个属目前都有从海洋环境中分离得到的报道^[15, 16]。但对于假诺卡氏菌和异壁放线菌这两个属来说却是首次报道从海洋中分离。这也说明海绵作为滤食性动物在富集微生物方面有其独特的一面, 是急待开发的海洋微生物资源库。

参 考 文 献

[1] Blunt J W, Copp B R, Munro M H, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2004, **21**: 1–49.
 [2] Blunt J W, Copp B R, Munro M H, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2003, **20**: 1–48.
 [3] Faulkner D J. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2002, **19**: 1–48.
 [4] Perovic S, Wichels A, Schutt C, et al. Neuroactive compounds produced by bacteria from the marine sponge *Halichondria panicea*: activation of the neuronal NMDA receptor. *Environ Toxicol Pharm*,

1998, **6**: 125–133.
 [5] Debitus C, Guella G, Mancini I, et al. Quinolones from a bacterium and tyrosine metabolites from its host sponge, *Suberea crebra* from the Coral Sea. *J Marine Biotechnol*, 1998, **6**: 136–141.
 [6] Takahashi Y, Omura S. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J Gen Appl Microbiol*, 2003, **49**: 141–154.
 [7] Webster N S, Wilson K J, Blackall L L, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 434–444.
 [8] Xue S, Zhang H, Wu P, et al. Study on bioactivity of extracts from marine sponges in Chinese Sea. *J Exper Marine Bio Ecol*, 2004, **298**: 71–78.
 [9] 徐君怡, 靳 艳, 虞星炬, 等. 黄海繁茂膜海绵中微生物多样性的研究. *微生物学报*, 2004, **44**: 576–579.
 [10] Lee Y K, Kim H W, Liu C L, et al. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *J Microbiol Methods*, 2003, **52**: 245–250.
 [11] Cook A E, Meyers P R. Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2003, **53**: 1907–1915.
 [12] Lee H K, Lee D S, Lim J, et al. Topoisomerase I inhibitors from the *Streptomyces* sp. strain KM86-9B isolated from a marine sponge. *Arch Pharm Res*, 1998, **21**: 729–733.
 [13] Imamura N, Nishijima M, Adachi K, et al. Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J Antibiot (Tokyo)*, 1993, **46**: 241–246.
 [14] Shin J, Seo Y, Lee H S, et al. A new cyclic peptide from a marine-derived bacterium of the genus *Nocardiopsis*. *J Nat Prod*, 2003, **66**: 883–884.
 [15] Sorkhoh N A, Ghannoum M A, Ibrahim A S, et al. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. *Environ Pollut*, 1990, **65**: 1–17.
 [16] Maldonado L A, Stach J E, Pathom-Aree W, et al. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2005, **87**: 11–18.

16S rDNA-RFLP analysis of actinomycetes associated with marine sponge *Hymeniacidon perleve*

ZHANG Hai-tao^{1, 2} JIN Yan¹ YU Xing-ju¹ ZHANG Wei^{1*}

(¹ Marine Bioproducts Engineering Group, Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, China)

(² Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: 106 culturable symbiotic actinomycetes strains were isolated from intertidal marine sponge *Hymeniacidon perleve* collected from Chinese Yellow Sea. The 16S rDNA sequences of these strains were amplified and RFLP patterns were analyzed by digestion of 16S rDNA fragments with *Hha* I. 11 different patterns were identified, with confirmation by the RFLP analysis using Vector NTI simulation. Using *Hha* I RFLP patterns, the actinomycetes could be identified at the genus level. Phylogenetic trees using 16S rDNA sequences were constructed. Majority of actinomycetes belonged to *Streptomyces* (78). The other strains belonged to *Nocardiopsis* (18), *Pseudonocardia* (3), *Nocardia* (3), *Micromonospora* (2), *Rhodococcus* (1), *Actinoalloteichus* (1). Strain 177 is the candidate for new species of *Actinoalloteichus*.

Key words: Marine sponge, *Hymeniacidon perleve*, Actinomycetes, RFLP, Diversity