

# 基于 PCR-DGGE 指纹的南海海绵共附生细菌 优势种群的揭示与系统发育分析

何丽明 李志勇\* 吴杰, 胡叶, 蒋群

(上海交通大学生命科学技术学院 海洋生物技术实验室 上海 200240)

**摘 要** 采用 PCR-DGGE 指纹、克隆测序和系统发育分析技术较系统地对我国南海贪婪偃海绵(*Dysidea avara*)和澳大利亚厚皮海绵(*Craniella australiensis*)共附生的优势细菌进行了研究。研究发现变形菌门(*Proteobacteria*)细菌是这两种海绵中的主要优势细菌,贪婪偃海绵中的变形菌包含了  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  三种类型,而澳大利亚厚皮海绵中仅有  $\gamma$  一种类型。两种海绵都有拟杆菌(*Bacteroidetes*),但是具体的种类不同。这些细菌都是第一次在海绵中被发现。澳大利亚厚皮海绵共附生的优势细菌还包括放线菌属(*Actinobacterium*)及厚壁菌门(*Firmicutes*)细菌,菌群多样性要比贪婪偃海绵的丰富。两种海绵尽管来自于同一海域但其共附生优势细菌的组成明显不同,这说明海绵共附生微生物具有宿主特异性。

**关键词** 海绵共附生细菌; 16S rDNA; PCR-DGGE 指纹; 系统发育分析

**中图分类号**: Q939 **文献标识码**: A **文章编号**: 0001-6209(2006)03-0487-05

海绵是海洋中营固着生活的一类多细胞后生动物,体壁上有许多小孔或管道与外界或中央腔相通,依靠过滤海水获得营养,也因此成为海洋微生物的良好宿主,海绵共附生微生物可以达到海绵体积的 40% 以上。海绵是目前海洋活性物质发现最多的海洋生物之一,海绵共附生微生物可能在海绵活性物质产生方面起着重要作用。

当前海绵共附生微生物的研究主要涉及海绵微生物分离、微生物多样性、代谢产物<sup>[1,2]</sup>。现代分子生物学技术在生态学中的应用大大推动了微生物学的发展,使人们可以避免传统的分离培养过程而直接探讨自然界中微生物的种群结构及其与环境的关系。对于海绵,由于绝大多数共附生微生物不易分离培养,分子技术成为揭示多样性的主要手段<sup>[3]</sup>。变性梯度凝胶电泳(DGGE)自从 1993 年被应用到土壤复杂的微生物区系组成揭示以来<sup>[4]</sup>,已经成为微生物分子生态学的重要技术手段,尤其适合对不同研究对象或者不同时间或空间的某一对象体内微生物组成的分析比较。

国内海绵的研究多集中在活性物质分离方面,对于海绵共附生微生物的研究才刚刚开始,并多限于常规技术的微生物分离、活性菌筛选<sup>[5,6]</sup>。对于海绵共附生微生物组成多样性的研究很少<sup>[7,8]</sup>。我们采用透射电子显微镜技术对南海细薄星芒海绵体内的微生物分布进行了观察<sup>[9]</sup>,同时对海绵共附生微生物的协同效应进行了研究<sup>[10]</sup>,并在国内首次采用 PCR-DGGE 技术对四种南海海绵原位的细菌组成与部分可培养的细菌种群进行了比较<sup>[11]</sup>。目前我们已经从我国南海的贪婪偃海绵(*Dysidea avara*)和澳大利亚厚皮海绵(*Craniella*

*australiensis*)中分离筛选出了具有广谱、高效的抗菌活性菌<sup>[6,10]</sup>。为了从海绵中分离更多的活性菌,非常有必要了解这两种海绵的微生物种群组成情况,同时这两种海绵共附生微生物组成的信息国际上还没有研究报道,因此具有重要意义。本文通过 PCR-DGGE 指纹技术结合克隆测序和系统发育树分析技术系统地贪婪偃海绵(*Dysidea avara*)和澳大利亚厚皮海绵(*Craniella australiensis*)共附生的优势细菌进行揭示。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 海绵** 贪婪偃海绵(*Dysidea avara* (Schmidt)) 澳大利亚厚皮海绵(*Craniella australiensis* (Carter)) 均采自我国南海三亚周边海域,并由中国科学院海洋研究所李锦和研究员鉴定。论文中分别用其拉丁名的第一个字母 D 和 C 表示。

**1.1.2 主要试剂和仪器** DGGE 分析系统(Bio-rad, USA), PCR 仪(HYBAID, USA), H-1 微型混合器(上海康永光电仪器有限公司, 中国), UNI-Q-10 柱式 DNA 纯化试剂盒(上海生工生物技术公司, 中国), PUCm-T 载体、DH5 $\alpha$  感受态细胞、10 $\times$ PCR 缓冲液和 Super Taq 酶(上海申能博彩生物试剂公司, 中国)。

### 1.2 海绵共附生微生物总 DNA 的提取

无菌条件下将海绵样品切成约 2mm<sup>3</sup> 的小块,放入置于冰块上的无菌研钵中加入 TE(pH8.0) 研磨后提取总 DNA<sup>[12]</sup>。

### 1.3 16S rDNA-V3 的巢式 PCR 扩增

以提取的总 DNA 为模板,以通用引物 8f(5'-

基金项目: 国家“863 计划”(2002AA628080, 2004AA628060); 上海市青年科技启明星计划(04QMX1411)

\* 通讯作者。Tel: 86-21-34204036; E-mail: zyli@sytu.edu.cn

作者简介: 何丽明(1978 - )男,山西长治人,助教,主要从事海绵共附生微生物的分子生态学研究。E-mail: he9831117@sytu.edu.cn

收稿日期: 2005-07-07; 接受日期: 2005-08-17; 修回日期: 2005-10-08

GGAGAGTTTGTATCA/CTGGCT-3')与798r(5'-CCAGGTTATCTAATCCTGTT-3')为上下游引物扩增海绵细菌DNA的16S rRNA基因片段。PCR热循环条件为:94℃ 5min;94℃ 1min,57℃ 1min,72℃ 2min,25次循环;72℃ 2min。以获得的PCR产物为模板,采用引物P2(5'-ATTACC GCGCTGCTGG-3')与P3(5'-CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGCGGGGCGGGGACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3')进行16S rDNA-V3扩增。PCR热循环条件为:94℃ 5min;65℃ 1min;94℃ 30s;65℃ (-0.5℃/循环)30s;72℃ 1min;21次循环;94℃ 30s;55℃ 30s;72℃ 1min;5次循环;72℃ 3min;4℃ 保存备用。用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测,EB染色观察。

#### 1.4 变性梯度凝胶电泳(DGGE)

采用DGGE分析系统进行。8%聚丙烯酰胺(37.5:1),变性剂尿素与去离子甲酰胺的线性梯度为30%~50%。在60℃、150V下电泳4.5h,银染后拍照分析。

#### 1.5 优势条带的回收、克隆和测序

将DGGE图谱中清晰的优势性条带标记后割胶回收、捣碎,加入TE(pH 8.0)浸泡,离心后取上清作为PCR的模板进行PCR扩增。所用引物是:P1(5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3')和P2(5'-ATTACCGCGCTGCTGG-3')。PCR反应程序为:94℃ 30s,55℃ 30s,72℃ 1min,20次循环;72℃ 3min。将经过UNI-Q-10柱纯化的PCR产物用T4DNA连接酶与载体PUCm-T酶连,然后热激转化*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞。以氨苄青霉素(100 $\mu$ g/mL)抗性和蓝白斑筛选选择阳性转化子,沸水浴煮沸,离心后取2 $\mu$ L上清进行PCR扩增确认阳性克隆。所用引物为载体引物T7及M13,PCR扩增体系和程序与16S rDNA-V3区扩增相同。送样到上海博亚生物技术公司进行测序。采用Blast进行序列比对。采用软件Clustal X1.81及Mega II.exe以N-J法进行系统发育树分析(采样量100次)。

## 2 结果和讨论

### 2.1 16S rDNA-V3的巢式PCR扩增

贪婪偃海绵 *Dysidea avara*、澳大利亚厚皮海绵 *Craniella australiensis* 总DNA经过巢式PCR扩增后得到约200bp的16S rDNA-V3片段,具有较好的扩增特异性。

### 2.2 变性梯度凝胶电泳(PCR-DGGE)

图1是贪婪偃海绵、澳大利亚厚皮海绵共附生的优势细菌的16S rDNA-V3的PCR-DGGE图谱及聚类分析结果。从实验结果来看贪婪偃海绵、澳大利亚厚皮海绵共附生细菌种类比较丰富。聚类分析证实两种海绵的优势共附生细菌组成相似性不高,具有明显的差异。

### 2.3 序列比对与系统发育树分析

对贪婪偃海绵、澳大利亚厚皮海绵优势共附生细菌的16S rDNA-V3的PCR-DGGE图上条带进行标记,贪婪偃海绵有14条,用D1.....D14表示;澳大利亚厚皮海绵有10条,用C1.....C10表示。将这些代表优势细菌的条带割胶回收、克隆测序,提交GenBank得到24个序列注册号AY947729-38,

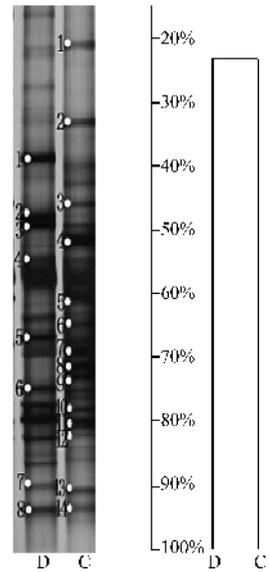


图1 贪婪偃海绵、澳大利亚厚皮海绵共附生细菌的DGGE图谱及聚类分析

Fig.1 *Dysidea avara* and *Craniella australiensis* associated bacterial PCR-DGGE fingerprints and clustering analysis. D: *Dysidea avara*; C: *Craniella australiensis*.

AY947739-52。进行序列比对与系统发育分析的结果见表1和图2、图3。

表1显示现有数据库中的细菌与海绵优势细菌具有很高的相似性,除D2、D6、D7、D8、D10、D14和C1外相似性都在98%以上。与D7最相近的细菌是在美国加利福尼亚州的一个高碱湖中发现的;与D11具有最高相似度的丙烷脱氢菌 *Acidovorax* sp.12M7与废水处理关系密切;与C4相似度最高的嗜冷杆菌 ANT9171(*Psychrobacter* sp. ANT9171)相似度为99%,主要分布在地球两极寒冷地带;与C5具有最高相似度的海洋细菌 KMM393(相似度为99%)是由朝鲜研究者从一种绿藻中分离的属于黄杆菌科(*Flavobacteriaceae*)的海洋细菌。但这些细菌在海绵中被发现还是第一次。

图2显示贪婪偃海绵共附生的优势细菌主要分成2个组:10个属于变形菌门细菌 *Proteobacterium*(group1),4个属于拟杆菌门 *Bacteroidetes*(group2)。在group1中包括了变形菌门的 $\alpha$ -*Proteobacteria*(4株)、 $\beta$ -*Proteobacteria*(4株)、 $\gamma$ -*Proteobacteria*(2株)3个亚类;group2中有黄杆菌属细菌 *Flavobacteria* 和鞘氨醇杆菌 *Sphingobacteria*。图3显示澳大利亚厚皮海绵共附生的优势细菌可以分成4个组:5个属于变形菌门 *Proteobacterium*(group1),2个属于拟杆菌 *Bacteroidetes*(group2),1个属于放线菌 *Actinobacterium*,2个属于厚壁菌 *Firmicutes*。前两类在贪婪偃海绵中也存在,但贪婪偃海绵中未发现后两类。显而易见,澳大利亚厚皮海绵共附生的优势细菌种类要比贪婪偃海绵丰富,来自于同一海域的两种不同海绵共附生微生物的种类明显不同,这提示海绵共附生微生物具有宿主特异性。这也可能是不同海绵具有不同活性物质的一个原因。

表 1 贪婪偃海绵、澳大利亚厚皮海绵共附生细菌 DGGE 指纹图对应单个条带的序列比对分析

Table 1 Sequences analysis of DNA recovered from single band in DGGE fingerprints of bacteria associated with sponges *Dysidea avara* and *Craniella australiensis*

Clone No.	ID	Closely identified phylogenetic relatives	Similarity/%
D1	AY947739	AY369139( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )	100
D2	AY947740	AJ786800( <i>Alcaligenes</i> sp. R-21939)	93
D3	AY947741	AY739662( <i>Erythrobacter luteolus</i> strain SW-109)	99
D4	AY947742	AY651070( <i>Biziolla paragoriae</i> strain KMM6029)	100
D5	AY947743	AY443042( <i>Psychrobacter</i> sp. HS5323)	100
D6	AY947744	AY443042( <i>Psychrobacter</i> sp. HS5323)	97
D7	AY947745	AF507867(Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium)	95
D8	AY947746	AY494676(Uncultured <i>Bacteroidetes</i> bacterium)	96
D9	AY947747	AY651070( <i>Biziolla paragoriae</i> strain KMM6029)	100
D10	AY947748	AY178080( <i>Rhizobiaceae</i> bacterium Cpub 4)	97
D11	AY947749	AB120338( <i>Acidovorax</i> sp. 12M7)	98
D12	AY947750	AF460869( <i>Marine bacterium</i> SIMO-IS105)	100
D13	AY947751	AJ505786(Uncultured alpha proteobacterium)	100
D14	AY947752	AY690695( <i>Oceanisphaera</i> sp. MaT12)	96
C1	AY947729	AF427479( <i>Cytophaga</i> sp. 41-DBG2)	96
C2	AY947730	AJ551122( <i>Psychrobacter</i> sp. mp9)	98
C3	AY947731	AY269873( <i>Staphylococcus</i> sp. 10)	100
C4	AY947732	AY167289( <i>Psychrobacter</i> sp. ANT9171)	99
C5	AY947733	AF536386( <i>Marine bacterium</i> KMM3937)	99
C6	AY947734	AY582938( <i>Planococcus</i> sp. D36)	100
C7	AY947735	AY167310( <i>Psychrobacter glaciicola</i> strain ANT9276b)	99
C8	AY947736	AY444555( <i>Photorhabdus luminescens</i> )	100
C9	AY947737	AY730254( <i>Halomonas</i> sp. M12-20A)	99
C10	AY947738	AJ630368( <i>Actinobacterium</i> MWH-HuqW11)	100

在图 2 中, D2 与贪婪偃海绵中其他优势菌群遗传距离都较远, 对比结果也显示和它具有最高相似度的是产碱杆菌 *Alcaligenes* sp. R-21939, 但它们的相似度只有 93%; 与 D7 有最

高相似度的菌是 Uncultured *Bacteroidetes* bacterium clone ML617.5J-5, 但它们之间的相似度也仅有 95%。由于 DGGE 只能分开 500bp 以下的 DNA 片段, 本文研究的目的片段

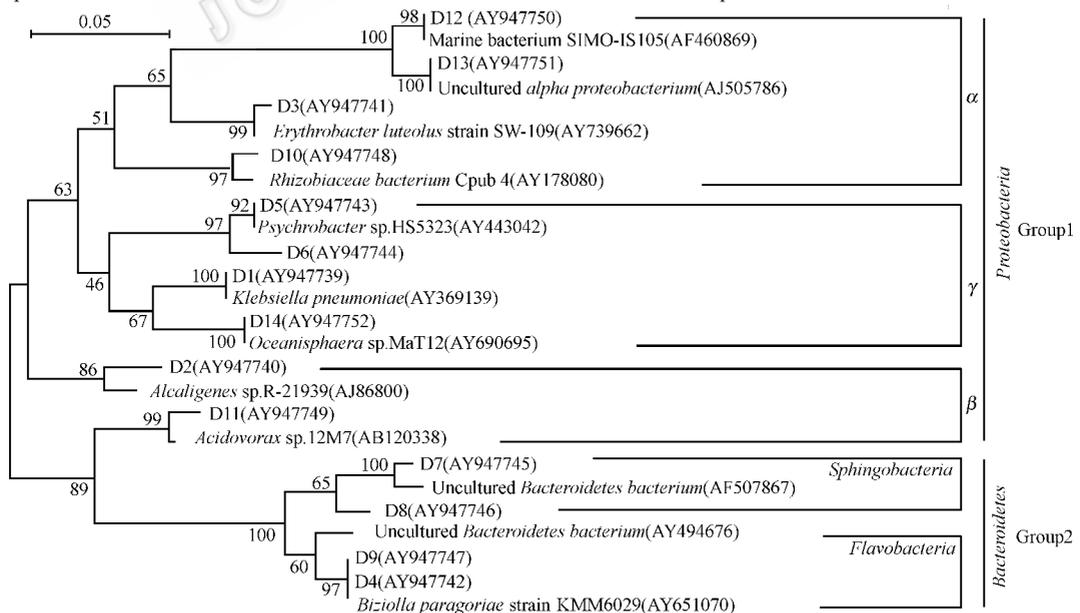


图 2 贪婪偃海绵共附生细菌的系统发育分析

Fig.2 Phylogenetic analysis on sponge *Dysidea avara* associated bacteria. "D" refers to the first letter of sponge *Dysidea avara*. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

16S rDNA-V3仅有 194bp 左右,只是细菌的 16S rDNA 全长中很小的一段,因此 D2、D7 以及 D6、D10、D8、D14、C1 等条带代表的细菌的种属需要进一步研究确认。尽管如此,PCR-DGGE

指纹结合克隆测序还是为我们提供了一条快速揭示海绵共附生微生物复杂区系组成的有效途径。

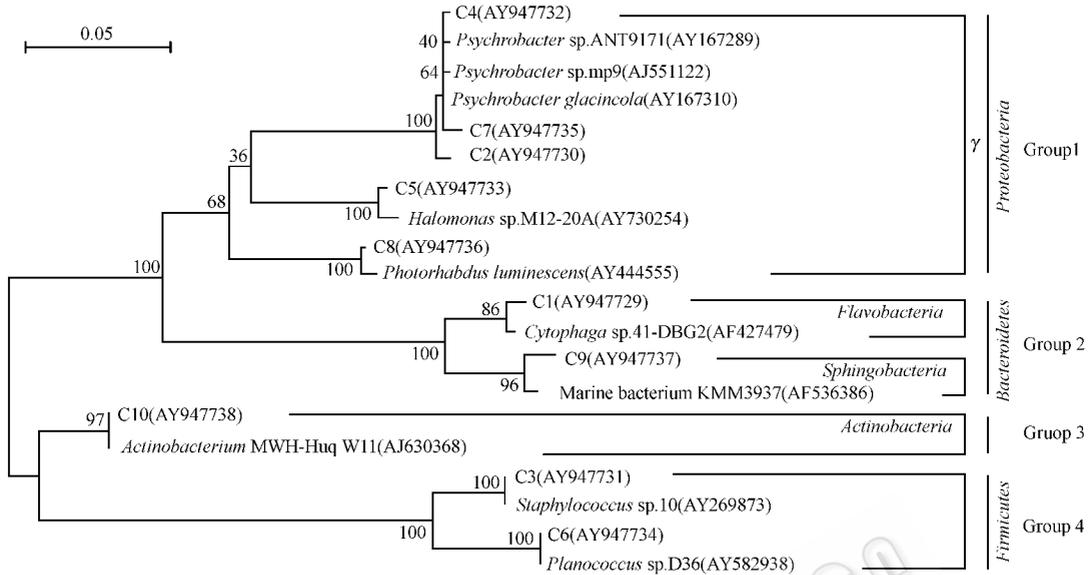


图 3 澳大利亚厚皮海绵共附生细菌的系统发育分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis on sponge *Craniella australiensis* associated bacteria. "C" refers to the first letter of sponge *Craniella australiensis*. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar, 5% sequence divergence.

### 3 结论

我国南海贪婪偃海绵 *Dysidea avara*、澳大利亚厚皮海绵 *Craniella australiensis* 共附生的优势细菌中变形菌门 (*Proteobacteria*) 细菌均占有很大的比例,其中贪婪偃海绵中变形菌包含了  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  3 种类型,澳大利亚厚皮海绵中仅有  $\gamma$  一种类型,两种海绵都有拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 细菌,但是具体的种类不同;澳大利亚厚皮海绵中还存在放线菌门 (*Actinobacteria*) 及厚壁菌门 (*Firmicutes*) 细菌。因此,澳大利亚厚皮海绵共附生的优势细菌的多样性比贪婪偃海绵丰富。尽管两种海绵来自于同一海域,但其共附生细菌组成明显不同,一定程度上说明海绵共附生微生物具有宿主特异性。

#### 参 考 文 献

[ 1 ] Hentschel U, Schmid M, Wanger M, et al. Isolation and phylogenetic analysis -prois of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, **35**: 305 - 312.

[ 2 ] Schmidt EW, Obraztsova AY, Davidson SK, et al. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine Sponge *Theonella swinhoeias* a novel  $\delta$ eobacterium, " Candidatus Enttheonella palanensis. ". *Marine Biology*, 2000, **136**: 969 - 977.

[ 3 ] Maria C. An analysis of sponge genomes. *Gene*, 2004, **342**: 321 - 325.

[ 4 ] Muyzer G, Ellen C, Waal DE. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Ploymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16SrDNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, **65**: 695 - 700.

[ 5 ] 刘 丽, 胡江春, 王书锦. 繁茂膜海绵中两株放线菌的生物学特征及其鉴定. 氨基酸和生物资源. 2004, **26**(1): 1 - 4.

[ 6 ] 沈 颖, 李志勇, 蒋 群, 等. 贪婪偃海绵中抗菌活性细菌的筛选及初步鉴定. 微生物学通报 2005, **32**(4): 17 - 21.

[ 7 ] 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**(5): 576 - 579.

[ 8 ] 方再光, 黄惠琴, 蔡海宝, 等. 海绵 *Pachychalina* sp. 体内细菌多样性的研究. 微生物学报 2004, **44**(4): 427 - 430.

[ 9 ] 李志勇, 秦恩昊, 蒋 群, 等. 细薄星芒海绵 (*Stelletta tenuis*) 体内微生物分布特点的透射电子显微镜观察与分析. 水产学报 2005, **29**(1): 38 - 42.

[ 10 ] 黄艳琴, 李志勇, 何丽明, 等. 细薄星芒海绵中活性菌筛选及混合菌协同效应. 微生物学通报 2005, **32**(4): 6 - 11.

[ 11 ] 何丽明, 李志勇, 蒋 群, 等. 海绵可培养微生物与微生物原位组成的 DGGE 指纹分析比较. 微生物学通报 2005, **32**(3): 51 - 56.

[ 12 ] Krsek M, Wellington EMH. Comparison of different methods for the isolation and purification of total community DNA from soil. *J Microbiol Methods*, 1999, **39**: 1 - 16.

## Revelation and phylogenetic analysis of the predominant bacterial community associated with sponges in the South China Sea based on PCR- DGGE fingerprints

HE Li-ming , LI Zhi-yong\* , WU Jie , HU Ye , JIANG Qun

( Marine Biotechnology Laboratory , School of Life Science and Biotechnology , Shanghai Jiao Tong University , Shanghai 200240 , China )

**Abstract** : The predominant bacterial community structure of *Dysidea avara* and *Craniella australiensis* in the South China Sea were revealed by PCR- DGGE fingerprinting in the present study. With further cloning , sequencing and phylogenetic analysis , it was found that Proteobacteria predominated in these two sponges. Alphaproteobacteria , Betaproteobacteria and Gammaproteobacteria were found in *Dysidea avara* and only Gammaproteobacteria found in *Craniella australiensis*. Although Bacteroidetes were found in both sponges , they differed in the species. These bacteria were found in sponges firstly. The bacteria in *Craniella australiensis* show more complex diversity than that in *Dysidea avara*. Because compared with *Dysidea avara* , *Craniella australiensis* include Actinobacteria , Firmicutes , etc. The bacterial community diversity in these two sponges indicates that the sponge-associated bacteria are host-specific even if the hosts are from the same marine location. DGGE fingerprint-based analysis should integrate with band cloning and sequencing , phylogenetic analysis , etc. , molecular techniques to get precise results for the microbial community and diversity revelation. The research of studying sponge microbe by DGGE technique is initial work , that will accelerate the development of sponge microorganisms item.

**Keywords** : Sponge-associated bacteria ; 16S rDNA ; PCR-DGGE fingerprinting ; Phylogenetic analysis

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China( 2002AA628080 , 2004AA628060 )

\* Corresponding author. Tel : 86-21-34204036 ; E-mail : zyli@sjtu.edu.cn

Received 7 July 2005 / Accepted 17 August 2005 / Revised 3 October 2005