

繁茂膜海绵细胞内微生物多样性的研究

靳 艳 郭鹏飞 孙黎明 虞星炬 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 采用海绵组织离散、细胞分离的方法,对繁茂膜海绵细胞进行纯化、胞内微生物 DNA 提取,构建了繁茂膜海绵细胞内微生物的 16S rDNA 克隆,对其遗传多样性进行了分析,发现海绵细胞内微生物 16S rDNA 序列主要归类于紫硫细菌门(Proteobacteria)中的 α -亚门、 γ -亚门和浮霉菌门(Planctomycetes)等类群。与研磨直接提取海绵组织 DNA 所得海绵组织中总微生物多样性相比,海绵细胞内存在丰富的浮霉菌(23%),说明浮霉菌主要存在于海绵细胞胞内。

关键词:繁茂膜海绵;16S rDNA 序列;胞内微生物;多样性

中图分类号:Q93 **文献标识码**:A **文章编号**:0001-6209(2006)06-0875-04

海绵是目前最大的海洋天然产物来源,海绵中分离得到的天然产物具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒等生理活性^[1]。海绵是一种滤食动物,依靠滤食海水中的浮游生物及其它营养物质来维持生命,每公斤海绵组织每天滤水量可达 2 吨,海绵独特的摄食、滤食系统使其体内富集了大量的微生物,这些微生物含量可占海绵重量的 40%,因此海绵是海洋微生物的天然菌种库^[2]。有证据表明海绵微生物参与了许多海绵天然产物的合成,或者是一些海绵活性物质的真正生产者,海绵相关微生物对海绵的次生代谢等具有重要的意义^[3,4]。

海绵是没有组织分化的最低等多细胞动物,微生物存在于海绵细胞间质、细胞内甚至细胞核内。应用 16S rDNA 的方法描述海绵体内微生物多样性的研究已有报道^[5,6],海绵体内微生物 DNA 的提取通常采用研磨的方法,但是由于微生物丰度及胞内、核内菌的提取效率等原因,这种提取方法会导致海绵细胞胞内菌的信息无法全部反映出来。本研究通过海绵组织离散、细胞分离等手段,除去海绵细胞间质的微生物,对海绵细胞胞内微生物的 16S rDNA 进行克隆、构建与分析,研究海绵细胞内微生物的多样性,并对海绵细胞内微生物多样性与海绵组织中微生物多样性进行比较。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品的采集 海绵活体样本采集自大连石槽

海域潮间带。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*)。

1.1.2 主要试剂和仪器:TaKaRa LA Taq, pMD18-T Vector, X-gal, IPTG, 内切酶 *Sma* I 和 *Eco*O109 I, DNA Marker DL2000 均购自大连 TaKaRa 公司。16S rDNA 扩增引物 519f(5'-CAGCAGCCGCGGTAA TAC-3')和 1406r(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')由大连 TaKaRa 公司合成。

1.2 样品处理

切去海绵表皮,将中心部分海绵组织切碎放入加有庆大霉素的无钙镁海水(CMFSW)中浸泡以除去海绵表面附着菌,再用 CMFSW 浸洗后放入新鲜 CMFSW 中 4℃ 浸泡过夜。将经过前处理的海绵块,加入少量 EDTA,轻微震荡 10min,离散细胞。细胞悬液过滤除去骨针,将滤液离心沉淀海绵单细胞,将沉淀重新悬浮于 CMFSW 中,再次离心,如此重复将海绵单细胞洗涤 6 次,除去胞间菌,得到纯的海绵全细胞悬液,制备得到的全细胞悬液在 4℃ 冷藏备用。

1.3 海绵细胞内微生物 16S rDNA 的 PCR 扩增和克隆

1.3.1 海绵细胞内微生物总 DNA 的提取:具体方法参见文献[6]。

1.3.2 海绵细胞内微生物 16S rDNA 的 PCR 扩增:以纯化后的海绵及细胞内微生物总 DNA 为模板,以 519f(5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'), 1406r(5'-

基金项目 国家“973 项目”—重点基础研究发展计划(2003CB716001)

* 通讯作者。Tel:86-411-84379316;Fax:86-411-84379069;E-mail:weizhang@dicp.ac.cn

作者简介 靳 艳(1968-)女,陕西省西安市人,博士,副研究员,研究方向为海洋微生物及天然产物。E-mail:yanjin@dicp.ac.cn

收稿日期:2006-01-04;接受日期:2006-03-22;修回日期:2006-03-13

ACGGGCGGTGTGTAG-3')为引物,通过 PCR 直接扩增出海绵相关微生物的 16S rDNA。

PCR 扩增条件:94℃ 3min;94℃ 1min,57℃ 1min,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(*Escherichia 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。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'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-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 5 μ L 在 37℃ 使用 *Sma* I 和 *Eco* O109 I 进行双酶切,再进行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)和 TreeView(Win32)(Version 1.6.5)软件进行多序列比对及系统发育树的构建。

2 结果

2.1 海绵组织离散、细胞分离纯化

按照 1.2 的方法对海绵组织进行前处理、组织离散及细胞分离纯化,除去骨针和胞间菌,得到不含细胞间质微生物等其他杂质的海绵细胞。如图 1 所

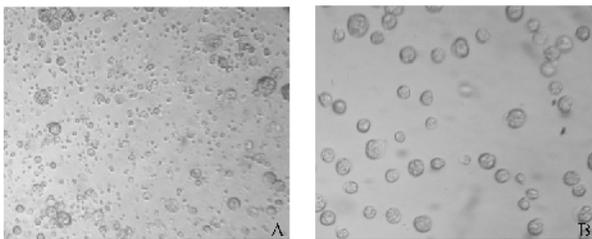


图 1 离散的海绵细胞和纯化海绵细胞显微镜图(400 \times)
Fig.1 Micrograph of disassociated and purified sponge cells(400 \times).
A Disassociated sponge cells without spiculas B Purified sponge cells by washing and centrifugation.

示 A 图是过滤除去骨针后的海绵细胞,仍然带有胞间菌、细胞碎片等杂质;B 图是经过多次洗涤、离心得到的海绵细胞,以此为材料进行海绵细胞内微生物多样性的研究可以保证得到的 16S rDNA 信息主要来自于海绵细胞内微生物。

2.2 限制性片段长度多态性分析(RFLP)

构建繁茂膜海绵胞内微生物 16S rDNA 克隆文库。从近 800 个转化子中随机选择 120 个,用 Sequencing Primer RV-M 和 Sequencing Primer M13-47 作为引物进行 PCR 反应,扩增转化子中的插入片段,由于插入片段长度约为 887bp,加上两端的侧翼引物 155bp,因此插入片段在 1042bp 左右的转化子可以认为是成功转化的 TA 克隆。通过 PCR 筛选从 120 个转化子中得到 103 个成功转化的 TA 克隆。

用限制性内切酶 *Sma* I 和 *Eco* O109 I 将 PCR 扩增的插入片段进行双酶切反应,酶切片段用 1.2%~1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分析(80V,50min),得到 103 条电泳谱图,选择其中 13 个电泳条带明显不同的样品进行序列测定。

2.3 繁茂膜海绵细胞内微生物 16S rDNA 序列的相似性比较和系统发育分析

将测得的 13 个序列信息分别输入 GenBank 中进行比对,使用 Clustal X(Version 1.8)和 TreeView(Win32)(Version 1.6.5)软件进行多序列比对和系统发育树构建,结果见图 2。繁茂膜海绵细胞胞内菌的 16S rDNA 克隆的序列分析表明,13 个克隆序列中 5 个序列属于 α -Proteobacteria 类群,5 个序列属于 α -Proteobacteria 类群,3 个序列属于 Planctomycetes 类群。

3 讨论

我们对繁茂膜海绵组织中的总微生物多样性进行了研究^[6],组织中总微生物和细胞胞内微生物的比较见表 2,繁茂膜海绵细胞胞内微生物所得到的 16S rDNA 克隆序列与海绵总微生物所得序列有很多相同点:(1)总微生物和胞内微生物都存在 α -Proteobacteria 类群、 γ -Proteobacteria 类群,这两个类群在两个样品中所占比例大致接近;(2)两个样品中 α -Proteobacteria 类群的序列均与鞘氨醇单胞菌(*Sphigomonas*)等专性好氧菌在进化关系上接近; γ -Proteobacteria 的克隆与 GenBank 中比对已知序列相似度均较低,大多相似度在 90% 以下。以上的相同点说明 α -Proteobacteria 类群、 γ -Proteobacteria 类群在繁茂膜海绵总微生物和海绵细胞内是优势菌群。

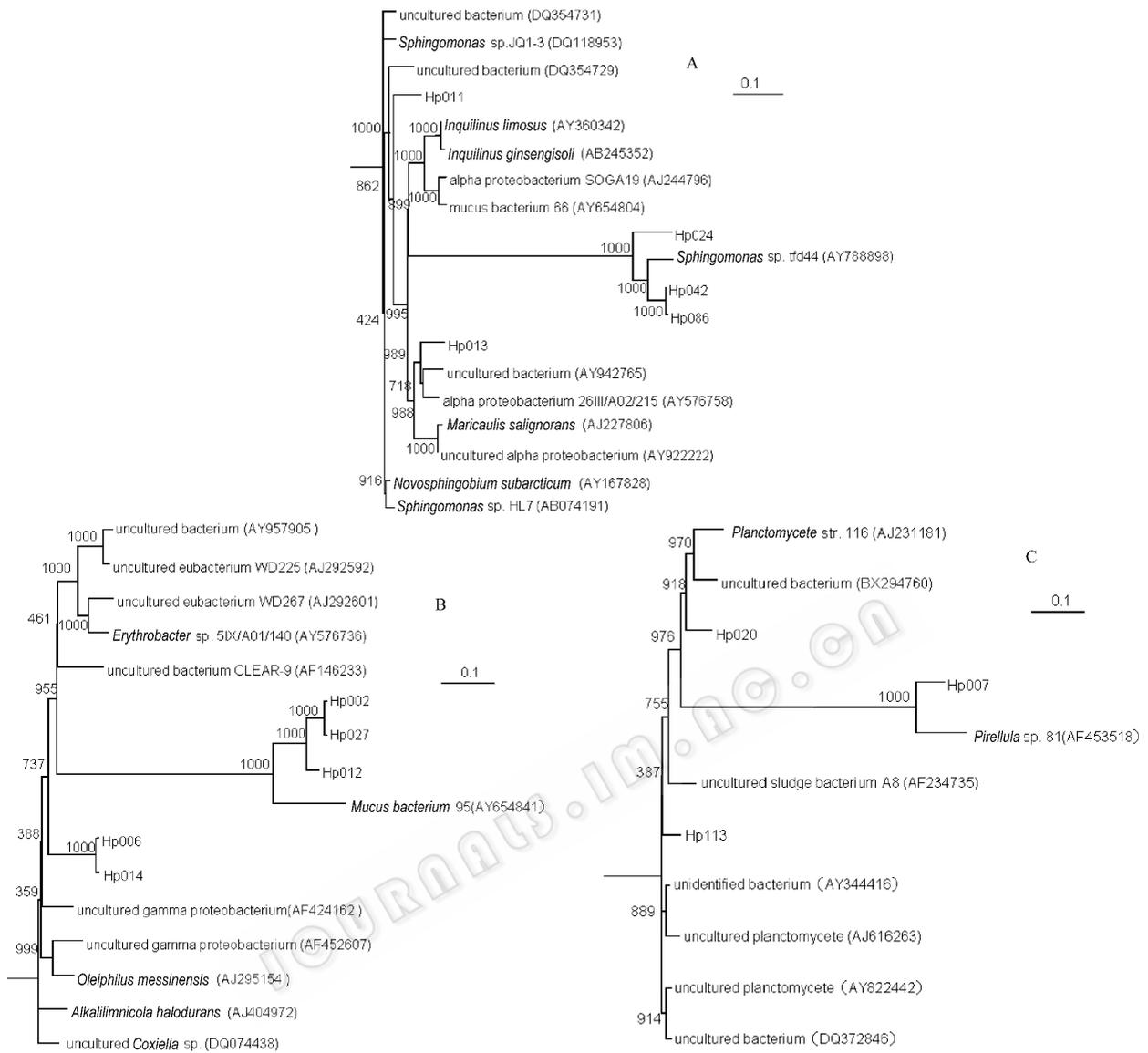


图 2 繁茂膜海绵细胞内微生物 16S rDNA 序列 N-J 系统发育树分析

Fig.2 Neighbor-joining phylogenetic tree from the analysis of 16S rDNA gene sequence of sponge cell-endo bacteria. A : Phylum of alphaproteobacteria ; B : Phylum of gammaproteobacteria ; C : Phylum of Planctomycetes. " Hp " refers to the sequence obtained in this study. Numbers in parentheses represent the sequences accession number in GenBank. The number at each branch points is the bootstrap value. Bar , 10% sequence divergence.

表 2 繁茂膜海绵组织及细胞内微生物 16S rDNA 克隆的序列分析的比较

Table 2 Sequence analysis comparison of sponge-associated bacteria and sponge cell-endo bacterial 16S rDNA clones of *Hymeniacidon perleve*

Subgroup	Sponge tissue	Sponge cells
α -Proteobacteria	6/14(43%)	5/13(39%)
γ -Proteobacteria	7/14(50%)	5/13(39%)
Planctomycetes	0/14(0%)	3/13(23%)
Actinobacteria	1/14(7%)	0/13(0%)

表 2 显示的海绵总微生物与海绵细胞内微生物多样性的差别在于 (1) 海绵组织中的有一个序列属 *Actinobacteria* , 而海绵细胞内微生物中没有该类群的序列。由于海绵总微生物中 *Actinobacteria* 的比例偏

低 克隆挑选的几率或者在海绵细胞内该类群微生物存在的丰度偏低而造成胞内微生物中未显示 *Actinobacteria*。(2) 海绵细胞内微生物中的 13 个序列中有 3 个序列属浮霉菌(*Planctomycetes*), 而用海绵组织提取的 16S rDNA 克隆序列中并没有浮霉菌。

浮霉菌是没有肽聚糖细胞壁、细胞核有膜包被的一个特殊的细菌门^[7], Fieseler^[8]对 *Aplysina aerophoba* 海绵中有代表性的 157 个克隆测序, 只有 2 个克隆归属于浮霉菌, 除此之外从未有文献报道在海绵微生物的 16S rDNA 多样性研究中得到浮霉菌序列, Fieseler 从而得出结论认为浮霉菌在海绵组织的微生物群中所起作用非常小。Friedrich^[2]用浮霉菌特异的原位杂交探针(*PIA46*)对 *Anlylsina*

aerophoba 海绵组织切片的浮霉菌进行杂交,显示该海绵组织中存在大量的浮霉菌;对海绵组织中提取的微生物用该探针杂交,却未显示特异的信号;Friedrich 的解释是海绵组织中的杂交信号是探针对宿主胞外介质非特异性结合造成假阳性,或者在微生物提取过程中由于溶菌酶的作用破坏了浮霉菌而导致没有特异性信号。

常用取组织研磨的方法研究海绵微生物多样性文献中除 Fieseler 得到 1%(2/157)的浮霉菌序列外,其他均没有浮霉菌的报道。繁茂膜海绵也不利外,采用组织研磨的方法提取的 DNA 中没有浮霉菌,但是采用细胞离散的方法得到的细胞胞内菌的 16S rDNA 中浮霉菌达到 23%(3/13),这个比例相对于 Fieseler 的 1% 比例是相当高的。比较细胞离散和组织研磨这两种方法,其区别在于海绵组织经细胞离散后成为相互独立的细胞个体,在没有骨针、胶原蛋白等细胞间质的保护下海绵细胞很脆弱、极易破碎,细胞破碎后胞内微生物全部释放出来,所以细胞离散后所得到的微生物 DNA 主要是胞内微生物,海绵组织如不经离散直接研磨,由于骨针、胶原蛋白等细胞间质的作用,海绵细胞内微生物不易全部释放,所得结果中细胞内微生物含量相对较低,从而使海绵微生物多样性信息中会遗漏海绵细胞内微生物的信息。通过以上分析,我们可以得到以下结论:海绵中的浮霉菌主要存在于海绵细胞内。该结论可很好地解释 Friedrich^[2]原位杂交的结果:原位杂交显示的海绵组织中存在大量浮霉菌是一个真实的情况,但由于浮霉菌主要存在于海绵细胞内,研磨处理并没

有将胞内微生物全部释放出来,所以经处理后的微生物样品中没有浮霉菌的信号。

浮霉菌是细菌中主要的也可能是最古老的分支^[9],古老的浮霉菌在被称为活化石的古老海绵中的作用将是一个非常意义的研究课题。当然浮霉菌在海绵中的作用及分布部位,还需通过原位杂交等其他手段进一步证明。

参 考 文 献

- [1] Blunt JW, Copp BR, Munro MHG, et al. Marine natural products. *Nat Prod Rep*, 2005, **22**(1): 15-61.
- [2] Friedrich AB, Fischer I, Proksch P, et al. Temporal variation of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol Ecol*, 2001, **38**: 105-113.
- [3] Cheng XC, Varoglu M, Abrell L, et al. Chloriolins A-C, chlorinated sesquiterpenes produced by fungal cultures separated from a Jaspis Marine sponge. *J Org Chem*, 1994, **59**: 6244-6348.
- [4] Jadulco R, Brauers G, Edrada RA, et al. New metabolites from sponge-derived fungi *Curvularia lunata* and *Cladosporium herbarum*. *J Nat Prod*, 2002, **65**(5): 730-733.
- [5] Webster NS, Wilson KJ, Blackall LL, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67**: 434-444.
- [6] 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.
- [7] Pimentel-Elardo S, Wehr M, Friedrich AB, et al. Isolation of planctomycetes from *Aplysina* sponges. *Aquat Microb Ecol*, 2003, **33**: 239-245.
- [8] Fieseler L, Horn M, Wagner M, et al. Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl Environ Microbiol*, 2004, **70**(6): 3724-3732.
- [9] Damste JSS, Rijpstra W, Schouten S, et al. The occurrence of hopanoids in *Planctomycetes*: implications for the sedimentary biomarker record. *Organic Geochemistry*, 2004, **35**: 561-566.

Phylogenetic diversity of endocellular bacteria marine sponge *Hymeniacidon perleve*

JIN Yan, GUO Peng-fei, SUN Li-ming, YU Xing-ju, ZHANG Wei*

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

Abstract: Marine sponges are hosts of diverse bacteria that live in both intracellular and intercellular spaces of the multicellular animals. The aim of this study is to investigate the bacteria diversity inside the marine sponge cells of *Hymeniacidon perleve* by 16S rDNA gene sequences. To obtain pure sponge cells, a protocol has been developed in which the sponge tissues were firstly dissociated in CMFSW and cleaned several times. The purified sponge cells were subject to extraction of endocellular bacterial DNA. The endocellular bacterial phylogenetic diversity of the marine sponge was determined by RFLP-16S rDNA sequencing of cloned DNA fragments. Thirteen of isolated 16S rDNA gene sequences were attributed to be α -Proteobacteria (5), γ -Proteobacteria (5) and Planctomycetes (3). When compared to the bacterial diversity of the sponge tissues, α - and β -proteobacteria are still the dominant bacteria genes, however Planctomycetes was not obtained in the sponge tissue. These results indicated a different bacterial diversity in the sponge cells and sponge tissues.

Keywords: Marine sponge; *Hymeniacidon perleve*; Endocellular bacteria; 16S rDNA gene sequence; Phylogenetic diversity

Foundation item: National Basic Research Program of China (2003CB716001)

* Corresponding author. Tel: 86-411-84379316; Fax: 86-411-84379069; E-mail: weizhang@dicp.ac.cn

Received: 4 January 2006/Accepted: 22 March 2006/Revised: 13 March 2006