

以 23S rDNA 一个多变区作为分子标记对致病杆菌属细菌进行分类鉴定

赵景秀, 柳春林, 邱礼鸿*, 庞义

中山大学, 有害生物控制及资源利用国家重点实验室, 广州 510275

摘要: 【目的】致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 细菌是一类重要的生物杀虫剂, 斯氏属昆虫病原线虫的共生菌, 建立快速准确的分类鉴定方法, 对研究开发这类细菌至关重要。【方法】本研究 PCR 扩增测序了本室保藏的 26 株, 含 20 种已定名致病杆菌属细菌的一段 845 bp 的 23S rDNA 序列, 构建了基于这段序列的致病杆菌属系统树并与基于几乎全长 16S rDNA 序列的相应系统树进行比较, 分析了两者作为致病杆菌属细菌分类鉴定分子标记的优缺点。【结果】结果表明, 与全长 16S rDNA 序列相比, 所选择的 23S rDNA 序列片段所含可变位点、简约信息位点比例更高, 遗传距离数值跨度大。【结论】上述结果显示该序列片段可用于致病杆菌属细菌进行分类鉴定, 特别适用于对野外资源调查中采集到的大量菌株进行快速鉴定。

关键词: 23S rDNA, 16S rDNA, 致病杆菌属, 分类鉴定

中图分类号: Q93-3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 04-0512-07

致病杆菌属 (*Xenorhabdus*) 隶属于变形菌门 (Proteobacteria), γ -变形菌纲 (γ -Proteobacteria), 肠杆菌科 (Enterobacteriaceae), 现已定名的有 22 个种^[1-2]。该属细菌均为斯氏线虫属 (*Steinernema*) 昆虫病原线虫的共生细菌, 在自然界中存在其宿主线虫感染期幼虫肠道内的一个特殊囊状结构内^[3]。致病杆菌属细菌通过产生大量有活性次生代谢产物, 如杀虫毒素^[4]、抗生素^[5-6]等, 在线虫-细菌复合体致死昆虫及后续的生长繁殖过程中发挥了重要的作用。这类细菌现已成为重要的资源微生物, 基于它们的开发应用研究, 例如新型抗生素^[7]、抗癌物质^[8]的筛选, 杀虫毒素基因克隆^[9]等, 已成为研究热点之一。通过资源调查积累物种资源及快速准确地分类鉴定是研究开发这类细菌的前提。与其它类

群的细菌一样, 目前致病杆菌的分类鉴定主要采用分子生物学技术和传统表型分类相结合的多相分类方法。16S rDNA 全长序列已广泛应用于原核微生物的鉴定及系统进化分析, 以该序列为分子标记的致病杆菌属分类鉴定标准方法已建立, 但现有结果显示 16S rDNA 序列用作致病杆菌属的分类鉴定太保守, 有信息位点比较少, 所构建的系统树稳定性比较差。23S rRNA 是细菌核糖体大亚基的组成部分, 长度约为 3 kb。23S rDNA 的各个区域的保守性差异较大, 保守区和变异区具有镶嵌排列的特点, 便于设计引物进行 PCR 扩增。23S rDNA 有些变异区的进化速率比 16S 大, 用这些区域作为亲缘关系较近的细菌的分类鉴别, 效果可能好于 16S rDNA^[10-12]。

本研究通过测定 20 种 26 株昆虫病原线虫共生

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (30771457); 博士点基金 (20100171110032)

* 通信作者。Tel: +86-20-84113009; E-mail: qiuqh@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 赵景秀 (1986-), 女, 山东淄博人, 硕士研究生, 研究方向为资源微生物学。E-mail: jingxiu_zhao@yahoo.cn

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2012-02-27

菌的一段 23S rDNA 序列,分析了以该段序列为分子标记对致病杆菌属细菌进行分类鉴定的可行性。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 共生菌菌株:本研究所用的致病杆菌菌株见表 1 23S rDNA 序列(除 SS-2004、ATCC19061 外)均为本室扩增测序获得,16S rDNA 序列均下载自 GenBank。

1.1.2 培养基:LB 液体培养基^[13],NBTA 培养基^[13]。

1.1.3 主要试剂:TE buffer (pH8.0)、10 mmol/L Tris-HCl 溶液 (pH8.0)、1 mmol/L EDTA 溶液 (pH8.0)、电泳缓冲液、1% 琼脂糖凝胶、苯酚:氯仿:异戊醇溶液。ExTaq DNA 聚合酶、Taq DNA 聚合酶反应缓冲液、dNTP 溶液均购自 TaKaRa 公司,DNA 凝胶回收试剂盒 (Gel Extraction Kit) 购自 Omega 公司。

表 1 本研究所用的致病杆菌菌株及其 23S 和 16S rDNA 序列

Table 1 The *Xenorhabdus* strains and their 23S and 16S rDNA sequences used in this study

Species	Type strain	Accession No. of the23S rDNA sequncenc	Accession No. of the16S rDNA sequncenc
<i>X. beddingii</i>	Q58	JN591571	AY278675
<i>X. bovienii</i>	CS03	JN591572	DQ205452
<i>X. bovienii</i>	Si	JN591573	DQ205455
<i>X. bovienii</i>	SS-2004*	FN667741**	FN667741**
<i>X. bovienii</i>	T228	JN591574	X82252
<i>X. bovienii</i>	TB20	JN591575	DQ208305
<i>X. bovienii</i>	USNY95	JN591576	DQ205453
<i>X. budapestensis</i>	DSM16342	JN591577	AJ810293
<i>X. cabanillasii</i>	S. rio	JN591578	USTX62 (AY521244)
<i>X. doucetiae</i>	S. dia	JN591579	FRM16 (DQ211709)
<i>X. elhersii</i>	CB2B	JN591580	KR03 (DQ202306)
<i>X. elhersii</i>	CWL05	JN591581	DSM16337 (AJ810294)
<i>X. griffithiae</i>	DSM17911	JN591582	ID10 (DQ211710)
<i>X. hominickii</i>	DSM17903	JN591583	KE01 (DQ211719)
<i>X. indica</i>	DSM17382	JN591584	AM040494
<i>X. innexi</i>	DSM16336	JN591585	AJ810292
<i>X. japonica</i>	DSM16522	JN591586	DQ202310
<i>X. koppenhoeferi</i>	DSM18168	JN591587	USNJ01 (DQ205450)
<i>X. kozodoii</i>	SaV	JN591588	DQ211716
<i>X. mauleonii</i>	DSM17908	JN591589	VC01 (DQ211715)
<i>X. miraniensis</i>	DSM17902	JN591590	Q1 (DQ211713)
<i>X. nematophila</i>	A24	JN591591	FJ860883
<i>X. nematophila</i>	AN6	JN591592	AY278674
<i>X. nematophila</i>	ATCC19061*	FN667742**	FN667742**
<i>X. poinarii</i>	G6	JN591593	D78010
<i>X. romani</i>	DSM17910	JN591594	PR06-A (DQ211717)
<i>X. stockiae</i>	DSM17904	JN591595	TH01 (DQ202309)
<i>X. szentirmaii</i>	K77	JN591596	DQ211712
<i>X. magdalenensis</i>			IMI397775 (HQ877464)
<i>X. vietnamensis</i>			VN01 (DQ205447)

* From GenBank, ** Accession number of the genome DNA sequence

1.2 共生菌的培养

将液氮保藏的共生菌接种到 3 mL LB 培养基中,28℃ 200 r/min 摇床培养 48 h 进行菌株复苏;然后在 NBTA 板上划线,28℃ 温箱培养 48 h;挑取初生型单菌落于 3 mL LB 培养基中,28℃ 200 r/min 摇

床培养 24 h。

1.3 23S rDNA 序列片段的扩增测序

根据 GenBank 中肠杆菌科细菌的 23S rDNA 序列,利用 DNASTAR 的 Primer Select 软件设计引物:上游引物 23S-af: 5'-CGATAGTGAACCACTACCGT

GAG-3'; 下游引物 23S-ar: 5'-TCGTGCAGGTCGG AACTTAC-3'。预期扩增片段长度约 1500 bp。

用于扩增 23S rDNA 序列的共生菌 DNA 模板采用液氮沸水法提取^[14]。PCR 扩增条件: 预变性 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 30 s, 循环 25 次; 72℃ 10 min。1% 的琼脂糖凝胶电泳分离回收反应产物, 用 Omega 公司的 E. Z. N. A Gel Extraction Kit 试剂盒纯化后, 将符合要求的纯 PCR 产物送到上海 Invitrogen 公司测序。

1.4 实验数据处理与分析

利用 MEGA4.1 软件中的 Clustal W 进行多重序列比对^[15], 并将结果以 mega 格式输出。用 MEGA4.1 软件计算序列的变异位点 (Variable sites, V)、保守位点 (Conserved sites, C)、简约信息位点 (Parsimony-information sites, Pi)、自裔位点 (Singleton sites, S)。用 DNASTar MegAlign 计算各序列之间的相似性 (Similarity) 与遗传距离 (Pair wise distance)。

使用 MEGA4.1 软件, 以普通变形杆菌为外类群, 用邻接法 (Neighbor-Joining)^[16] 构建系统发育树。邻接法选用 Kimura 双参数模型 (Kimura 2-parameter), 位点间变异率采用统一变化率 (uniform

rates), 节点支持率使用 1000 次 Bootstrap 检验。

2 结果和分析

2.1 致病杆菌属 23S rDNA 片段扩增测序

采用上述引物和 PCR 扩增条件对 26 株致病杆菌属共生菌进行扩增测序, 得到 1500 bp 左右的片段, 该片段前 600 bp 序列对致病杆菌属细菌的保守性高, 含有的可用于分类鉴定的信息位点很少, 故后续分析时舍弃该段, 截取 845 bp 进行建树、序列组成、相似性及遗传距离分析。对野外资源调查中采集到的大量菌株, 可利用下游引物作为测序引物对 PCR 扩增产物直接进行双向测序得到所需的约 850 bp 的片段, 进行快速鉴定。

2.2 序列组成分析

表 2 是本研究分析的 26 株致病杆菌属细菌的 23S 和 16S rDNA 序列比对后数据组的各项参数。由该表可见, 23S rDNA 序列数据组的简约信息位点有 126 个, 占 14.9%, 而 16S rDNA 数据组虽然序列长度几乎为 23S 片段的两倍, 但简约信息位点只有 119 个, 占 8.3%, 简约信息位点数比 23S 还少。

表 2 致病杆菌属 23S 和 16S rDNA 序列数据组的各项参数比较

Table 2 Comparison on parameters of the aligned 23S and 16S rDNA sequence data set of *Xenorhabdus*

Molecular marker	Date type	Length	Conserved sites (C)	Variable sites (V)	Parsimony-information sites (Pi) [*]	Singleton sites (S)
23S rDNA	In group (bp)	845	689	153	126	27
	Percent (%)		81.5	18.1	14.9	3.2
	Out group included (bp)	845	656	186	131	55
	Percent (%)		77.6	22.0	15.5	6.5
16S rDNA	In group (bp)	1426	1261	159	119	40
	Percent (%)		88.4	11.1	8.3	2.8
	Out group included (bp)	1426	1231	189	123	66
	Percent (%)		86.3	13.3	8.6	4.6

* An parsimony-information site is a position in the relevant set of sequences at which there are at least two different character states at that point in the sequences, and each of those states occurs in at least two of the sequences.

2.3 序列相似性与遗传距离分析

利用 DNASTar MegAlign 计算序列相似性与遗传距离, 结果显示: 基于 23S rDNA 序列, 致病杆菌属不同种菌株之间的序列相似性介于 87.4% (*X. doucetiae* Sdia 和 *X. griffiniae* DSM17911) - 98.6% (*X. doucetiae* Sdia 和 *X. romanii* DSM17910), 遗传距离介于 1.3 - 10.1 之间; 而基于 16S rDNA 序列, 不同种菌株之间的序列相似性介于 92.3% (*X.*

kozodoii SAV 和 *X. cabanillasii* USTX62) - 98.7% (*X. vietnamensis* VN01 和 *X. japonica* DSM16522), 遗传距离介于 1.2 - 6.1 之间。显示 23S 数据组不同种间相似性跨度 11.2%, 大于 16S 数据组的 6.4%; 遗传距离的间距 8.8, 大于 16S 数据组的 4.9。进一步说明该 845 bp 的片段比 16S rDNA 蕴含更多信息位点, 更适合用于致病杆菌属细菌的分类鉴定。

2.4 系统发育树分析

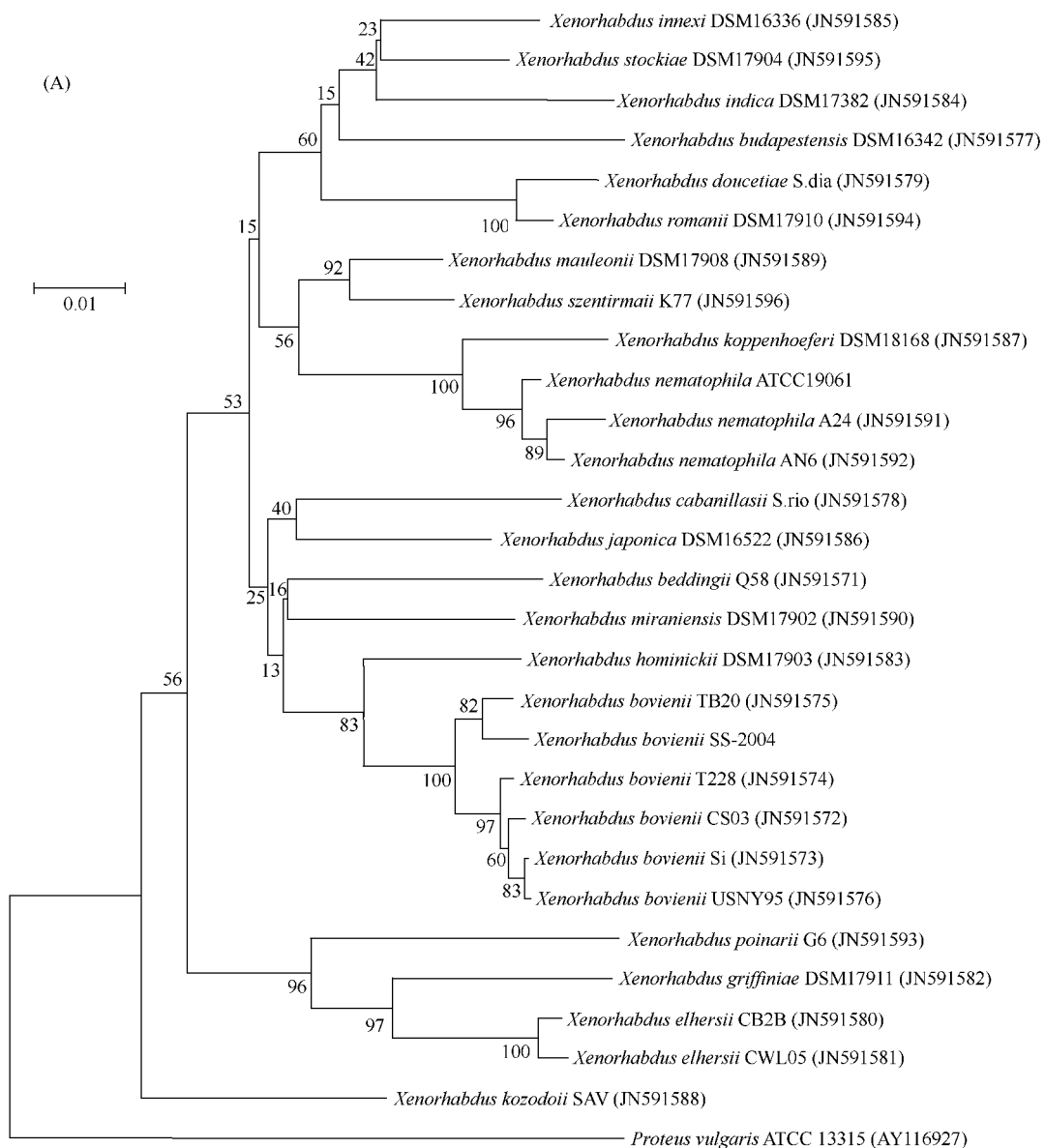
利用邻接法构建的基于 23S 和 16S rDNA 序列的致病杆菌属细菌 NJ 系统发育树见图 1。两树的深部节点的置信值大多数低于 70% ,显示用这两段序列为分子标记均不能很好地揭示病杆菌属细菌的进化关系。将 23S 和 16S rDNA 序列合并构建基于这两段序列的系统发育树,结果显示深部节点置信值低的问题没有根本性的改善(结果未给出),显示单用 rDNA 无法揭示致病杆菌属细菌的系统进化关系。

3 讨论

本研究通过测定致病杆菌属 20 种 26 株昆虫病

原线虫共生菌的一段 23S rDNA 序列,与近乎全长的 16S rDNA 序列进行序列特征分析、进化树拓扑结构比较,旨在探究以 23S rDNA 为分子标记对致病杆菌属细菌进行分类鉴定的可行性。目前致病杆菌属已定名 22 个种,16S rDNA 序列分析包含了目前该属细菌所有的种, *X. magdalenensis*、*X. vietnamensis* 两种本室暂未保藏,故 23S rDNA 序列未测定。

结果表明,与全长 16S rDNA 序列相比,所选择的 23S rDNA 序列片段所含可变位点、简约信息位点比例更高,遗传距离数值跨度大。提示该序列片段可用于致病杆菌属细菌进行分类鉴定,特别适用于对野外资源调查中采集到的大量菌株进行快速鉴



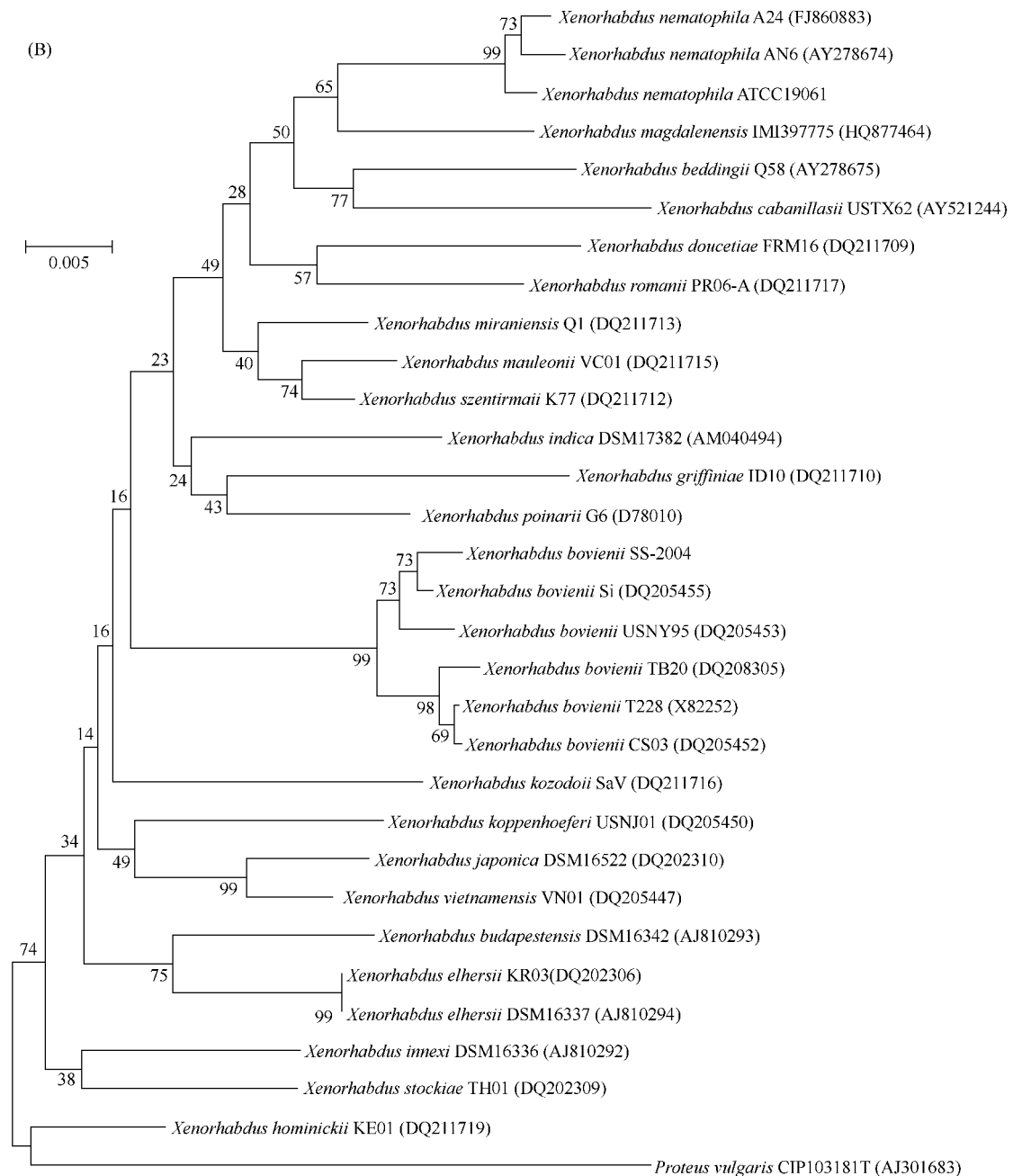


图1 用邻接法构建的基于 23S (A) 和 16S (B) rDNA 序列的致病杆菌属共生菌的系统发育树

Fig.1 Phylogenetic trees of *Xenorhabdus* inferred from a fragment of 23S rDNA sequences (A) and 16S rDNA sequences (B) with branch lengths scaled to the expected number of substitutions per sites. Numbers in parentheses represent the sequence's accession number in Genbank. The number at each branch points is the percentage supported by bootstrap. Bar indicates 1% sequence divergence in Fig. A and 0.5% in Fig. B.

定。

但是利用邻接法构建的基于 23S 和 16S rDNA 序列的两棵系统进化树,深部节点的置信值大多数低于 70%,并且将两段序列合并后建树,深部节点置信值低的问题没有根本性的改善,说明两个序列

中重组所致的 SNPs 较严重,单独采用 rDNA 作为分子标记无法揭示致病杆菌属细菌的系统进化关系。因此,在进行昆虫病原线虫致病杆菌属共生菌的新种鉴定、系统进化研究时,应结合其它的分子标记,如 *gyrB*、*recA*、*dnaN*、*gltX*、*infB* 等^[1-2] 持家基因,使

结果分析更加准确。

参考文献

- [1] Tailliez P , Laroui C , Ginibre N , Paule A , Pagès S , Boemare N. Phylogeny of *Photorhabdus* and *Xenorhabdus* based on universally conserved protein-coding sequences and implications for the taxonomy of these two genera. Proposal of new taxa: *X. vietnamensis* sp. nov. , *P. luminescens* subsp. *caribbeanensis* subsp. nov. , *P. luminescens* subsp. *hainanensis* subsp. nov. , *P. temperata* subsp. *Khanii* subsp. nov. , *P. temperata* subsp. *tasmaniensis* subsp. nov. , and the reclassification of *P. luminescens* subsp. *thracensis* as *P. temperata* subsp. *thracensis*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2010 , 60 (8) : 1921-1937.
- [2] Tailliez P , Pagès S , Edgington S , Tymo LM , Buddie AG. Description of *Xenorhabdus magdalenensis* sp. nov. , the symbiotic bacterium associated with *Steinernema australe*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , 2011 , doi: 10. 1099/ijs. 0. 034322-0.
- [3] Waterfield N. Host-pathogen interactions: proline gives insect pathogens the green light. *Current Biology* , 2010 , 20 (1) : 69-74.
- [4] Brown SE , Cao AT , Dobson P , Hines ER , Akhurst RJ , East PD. Txp40 , a ubiquitous insecticidal toxin protein from *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* , 2006 , 72 (2) : 1653-1662.
- [5] Li J , Chen G , Webster JM. Nematophin , a novel antimicrobial substance produced by *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae). *Canadian Journal of Microbiology* , 1997 , 43 (8) : 770-773.
- [6] Ji D , Yi Y , Kang GH , Choi YH , Kim P , Baek NI , Kim Y. Identification of an antibacterial compound , benzylideneacetone , from *Xenorhabdus nematophila* against major plant-pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Letters* , 2004 , 239 (2) : 241-248.
- [7] Gualtieri M , Aumelas A , Thaler JO. Identification of a new antimicrobial lysine-rich cyclolipopeptide family from *Xenorhabdus nematophila*. *The Journal of Antibiotics*. 2009 , 62 (6) : 295-302.
- [8] Lang G , Kalvelage T , Peters A , Wiese J , Imhoff JF. Linear and cyclic peptides from the entomopathogenic bacterium *Xenorhabdus nematophilus*. *Journal of Natural Products* , 2008 , 71 (6) : 1074-1077.
- [9] Joshi MC , Sharma A , Kant S , Birah A , Gupta GP , Khan SR , Bhatnagar R , Banerjee N. An insecticidal GroEL protein with chitin binding activity from *Xenorhabdus nematophila*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008 , 283 (42) : 28287-28296.
- [10] Gürtler V , Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using 16S-23S rDNA spacer region. *Microbiology* , 1996 , 1 (142) : 3-16.
- [11] Ludwig W , Rossellö-Mora R , Aznar R , Klugbauer S , Spring S , Reetz K , Beimfohr C , Brockmann E , Kirchhof G , Dorn S , Bachleitner M , Klugbauer N , Springer N , Lane D , Nietupsky R , Weizenegger M , Schleifer KH. Comparative sequence analysis of 23S rRNA from proteobacteria. *Systematic and Applied Microbiology* , 1995 , 2 (18) : 164-188.
- [12] Roller C , Ludwig W , Schleifer KH. Gram-positive bacteria with a high DNA G + C content are characterized by a common insertion within their 23s rRNA genes. *Journal of General Microbiology* , 1992 , 138 (6) : 1167-1175.
- [13] Akhurst RJ. Morphological and functional Dimorphism in *Xenorhabdus* spp. , Bacteria symbiotically associated with the insect pathogenic nematodes *Neoaplectana* and heterorhabditis. *Journal of General Microbiology* , 1982 , 128 (12) : 3061-3065.
- [14] Brunel B , Givaudan A , Lanois A , Akhurst RJ , Boemare N. Fast and accurate identification of *Xenorhabdus* and *Photorhabdus* species by restriction analysis of PCR amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* , 1997 , 63 (2) : 574-580.
- [15] Tamura K , Dudley J , Nei M , Kumar S. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4. 0. *Molecular Biology and Evolution* , 2007 , 24 (8) : 1596-1599.
- [16] Saitou N , Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* , 1987 , 4 (4) : 406-425.

Variable fragment of 23S rDNA for classification and identification of *Xenorhabdus*

Jingxiu Zhao , Chunlin Liu , Lihong Qiu* , Yi Pang

State Key Laboratory of Biocontrol , School of Life Sciences , Sun Yat-sen University , Guangzhou 510275 , China

Abstract: [Objective] Members of *Xenorhabdus* are symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes *Steinernema* , and can be applied as biopesticides against insects. Therefore , a rapid and accurate method for classification and identification of *Xenorhabdus* is essential. [Methods] An 845bp-fragment of 23S rDNA sequence of 26 strains of *Xenorhabdus* representing 20 described species was PCR amplified and sequenced. A phylogenetic tree of *Xenorhabdus* based on the sequences obtained was constructed and compared to that based on nearly complete 16S rDNA sequences for suitability as molecular maker for classification and identification of *Xenorhabdus*. [Results] The 23S rDNA fragment contained more variable and parsimony-informative sites proportionally , and with greater pairwise distances among sequences compared to those of 16S rDNA. [Conclusion] The 23S rDNA fragment can be used to identify *Xenorhabdus* , especially for a large number of *Xenorhabdus* strains obtained from field survey.

Keywords: 23S rDNA , 16S rDNA , *Xenorhabdus* , classification and identification

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30771457) and by the Ph. D. Programs Foundation(20100171110032)

* Corresponding author. Tel: +86-20-84113009; E-mail: qiulh@mail.sysu.edu.cn

Received: 27 September 2011 /Revised: 27 February 2012

科学出版社新书推介(2011年9、10月)

图解微生物实验指南



J. P. 哈雷 科学出版社生物分社,定价:65,出版时间:2012.1,书号:978-7-03-033147-2,装帧:平装,版本:第一版

内容简介:本书中的实验均用于说明和演示普通微生物学的基本原理,涵盖了微生物学学科概论及其分支。本书的特色在于有很多引人入胜的图片和独立的习题,适合不同大专院校的师生使用。本书分为十一个部分,分别为显微镜技术、细菌形态和染色、基础实验室培养技术、细菌的生化活性、快速多参数检测系统、未知微生物鉴定、影响微生物生长的环境因子、环境和食品微生物、精选真核微生物概述、微生物遗传学和基因组学、科学调查。每个实验均包括安全注意事项、实验材料、学习目标、原理、实验步骤,以及提示与警告和复习题,旨在培养学生的实验操作技能和实验思考技能。

本书适用于大专院校生命科学领域微生物学专业的师生参考使用。

获取更多图书信息请您关注

<http://www.lifescience.com.cn/>; 欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书

购书网站:

学士书店:<http://www.xueshi.com.cn/>; 当当网:<http://www.dangdang.com/>; 亚马逊:

<http://www.Amazon.cn>; 京东图书:<http://book.360buy.com/>

科学出版社 科学销售中心

联系人:周文宇; 电话:010-64022646 010-64017321; <http://shop.sciencepress.cn/>;

E-mail: zhouwenyu@mail.sciencepress.com