

海绵 *Pachychalina* sp. 体内细菌多样性的研究

方再光 黄惠琴 蔡海宝 吕家森 鲍时翔*

(中国热带农业科学院 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101)

摘 要 通过非分离培养分析方法,直接从海绵体内提取细菌总 DNA。以样品总 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得细菌 16S rDNA。用 16S rDNA 限制性酶切片段长度多态性(ARDRA)和测序方法对南海湛江海域海绵 *Pachychalina* sp. 体内的细菌多样性进行了研究。在细菌 16S rDNA 的 ARDRA 图谱中,大多数克隆的酶切带谱间存在差异,随机挑选 22 个克隆进行测序得到它们的 16S rDNA 部分序列,大部分序列属于 γ -proteobacterium 和 α -proteobacterium,但有少数克隆序列与 RDP 数据库中收录的 16S rDNA 序列间的相似性极小,不参与系统发育树的构建。研究结果表明海绵 *Pachychalina* sp. 体内细菌组成具有丰富的多样性。

关键词 海绵 *Pachychalina* sp., 16S rDNA 细菌多样性

中图分类号:Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2004)04-0427-04

用分子生物学方法来研究微生物的多样性,有助于人类更深入研究和认识自然界微生物群落组成的多样性。现在普遍认为,用传统的微生物分离培养方法来研究环境样品中微生物群落的多样性是远远不够的,因为许多微生物物种用当前传统的方法不能进行分离培养^[1]。16S rRNA 基因的克隆和测序可以为描述复杂的微生物群落组成、揭示某些微生物培养所需的营养条件以及系统分类关系提供重要的信息,并为确定微生物的培养条件提供重要的实验数据^[2,3],为目标微生物创造更为合适的生长环境。

海绵体内含有丰富的对人类有潜在意义的新型化合物^[4],而且已经认识到海绵体内生微生物占海绵生物总量的很大部分^[5,6]。由此,海绵体内的许多天然产物被认为也许是由海绵体内的微生物合成的。目前国内外学者对海绵-细菌间的生物学关系充满着浓厚的兴趣。*Pachychalina* sp. 是一种在南海海域中较常见的海绵,本研究的主要目的是调查海绵 *Pachychalina* sp. 体内总体细菌群落组成,建立细菌 16S rDNA 的限制性酶切图谱和系统发育树,获得不依赖细菌人工分离培养方法的海绵细菌群落组成的多样性。

1 材料和方法

1.1 主要材料

PCR 扩增试剂购自鼎国生化试剂公司;引物

27F、1510R、T7 和 SP6 由上海生工生物工程技术有限公司合成,UNI-Q-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司合成;pGEM-T 载体为 Promega 公司产品,银染试剂为国产分析纯。

1.2 样品采集

海绵采自南海湛江海域,经中国科学院海洋研究所鉴定为厚指海绵 *Pachychalina* sp.。用灭菌的塑料袋在水下采集海绵,用无菌水将表面清洗干净,-70℃处理 24h,然后低温真空干燥。

1.3 细菌总 DNA 的提取

称取 1.5g 干燥的海绵组织,用 Pitcher 等^[7]方法提取细菌基因组 DNA。

1.4 16S rDNA 的 PCR 扩增反应

根据细菌 16S rDNA 的保守序列,合成一对细菌特异性引物:正相引物 27F(5'-AGAGTTTGATCATG-GCTCAG-3')和 1510R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')。在进行 PCR 反应前,将 PCR 反应混合物(不含模板 DNA)用限制性内切酶 *Alu* I,37℃处理 1h,然后 60℃处理 15min。PCR 反应体系为 50 μ L:5 μ L 10 \times buffer,1.0 μ L 10mmol/L dNTPs,10mmol/L 引物 27F/15PR 各 1 μ L,1.0 μ L 细菌基因组 DNA,2U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增条件:94℃ 3min;94℃ 50s,52℃ 1min,72℃ 1.5min,30 个循环,72℃ 10min。

1.5 克隆、转化和酶切

PCR 扩增产物使用 DNA 快速纯化回收试剂盒

* 通讯作者。Tel 86-898-66890695;Fax 86-898-66890978;E-mail fbsxhq@yahoo.com.cn

作者简介:方再光(1975-)男,博士研究生,主要从事南海海域海洋微生物方向的研究。E-mail fbslont@hotmail.com

收稿日期:2003-12-15,修回日期:2004-03-01

进行纯化,再与 pGEM-T 载体连接,连接产物转入大肠杆菌(*Escherichia coli*) XL1 blue。挑取阳性菌株用 pGEM-T 载体克隆位点两端的引物 T7 和 SP6 进行 PCR 扩增反应。反应体系为 50 μ L :5 μ L buffer, 1 μ L 10mmol/L dNTPs, 10mmol/L 引物 T7/SP6 各 1.5 μ L, 2U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增条件:94 $^{\circ}$ C 5min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1.5min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10min。在 1.2% 琼脂糖凝胶上进行电泳,用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的片段,并用内切酶 *Hae* III 酶切回收产物 3h。

1.6 银染

将酶切反应产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,采用两步银染法进行银染^[8]。

1.7 16S rDNA 测序和序列分析

随机从转化子中挑取 22 个克隆进行测序,其序列编号依次为:A1、A2、A7、A9、A11、A13、A14、A18、A23、A25、A26、A52、B23、B24、B26、B27、B29、B30、B33、B34、B35 和 B38,测序工作由上海晶泰生物技术有限公司完成。采用 CLUSTALW 软件进行多序列匹配排列,再使用 Treeconw(1.3b)和 PHYLIP (v 3.57)软件构建系统发育树。根据序列分析进一步研究海绵 *Pachychalina* sp. 体内细菌组成的多样性。

2 结果

2.1 DNA 提取和 PCR 扩增

本实验从海绵体内提取得到了比较满意的细菌总 DNA, DNA 大小约为 21.0kb。用引物 27F 和 1510R 在含细菌基因组 DNA 模板的反应体系中扩增得到了一大小约 1.5kb 的目的片段,而在用内切酶 *Alu* I 处理过的对照中扩增不出这一条带,说明无明显非特异性扩增现象,且所扩增到的 16S rDNA 是真实可靠的(图 1)。在转化子中,用引物 T7 和

SP6 进行 PCR 反应,扩增到一条大小约为 1.7kb 目的带(T-vector 上引物 T7 和 SP6 之间的 DNA 片段大小约为 209bp,图 2)。

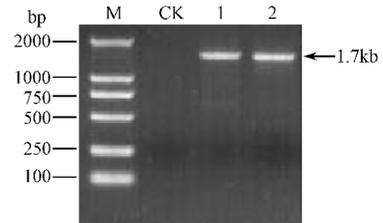


图 1 细菌 16S rDNA 的 PCR 扩增产物

Fig.1 PCR amplification of total DNA with bacterial 16S rDNA primer M. DNA Marker DL2000 ;CK. Control ;1~2. PCR amplification of bacterial 16S rDNA.

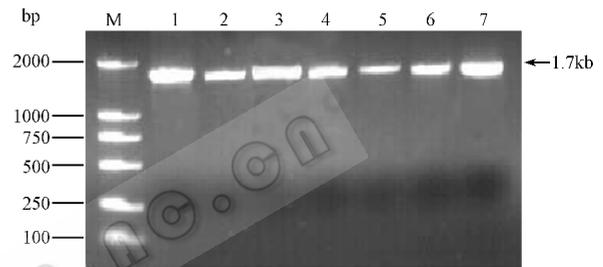


图 2 16S rDNA 的再次克隆结果

Fig.2 Secondary PCR amplification of bacterial 16S rDNA with T7 and SP6

M. DNA Marker DL2000 ;1~7. Secondary PCR amplification of bacterial 16S rDNA.

2.2 银染

我们对部分内切酶 *Hae* III 的酶切产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上,采用两步银染法进行了银染分析(图 3)。结果发现在所实验的样品中,大多数样品间的 ARDRA 带型存在差异。虽然单纯根据样品的 ARDRA 带型的差异不能对海绵体内微生物的多样性进行准确反映,但也在一定程度上说明海绵体内微生物种类存在着多样性。

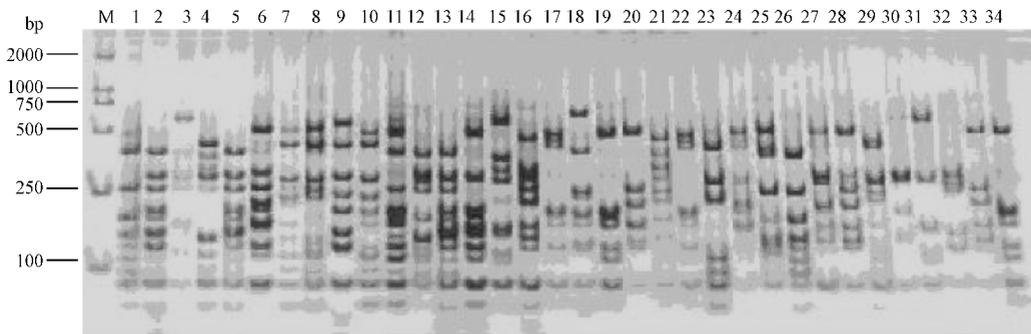


图 3 细菌 16S rDNA 的 ARDRA 银染结果

Fig.3 The silver-staining result of 16S rDNA restricted by *Hae* III M. DNA Marker DL2000 ;1~34. The bands of 16S rDNA restricted by *Hae* III.

2.3 16S rDNA 测序和系统发育分析

随机挑选 22 个克隆,对其 16S rDNA 的部分序列进行了测序分析,所测序列大小为 700~750bp,介于细菌 16S rDNA 的 27~700 位点之间,含有细菌 16S rDNA 丰富的保守区。将所得序列与 GenBank 库中已有的细菌 16S rDNA 序列进行 BLAST 比较,用 CLUSTALW 软件对序列进行多序列 Alignment 分析,结果发现 22 个克隆序列分成 3 大类,其中 A1、A7、A9、A11、A13、A14、A26、A18、A52、B23、B26、B27、B29、B33 和 B34 等 15 个克隆序列属于一类,它们之间序列的相似性高达 99%,与已报道 Unidentified α -proteobacterium strain BD1-8 的 16S rDNA 序列间的

相似性为 90%,但它们与海绵 *R. odorabile* 体内最为常见的 α -proteobacterium NW001^[5] 的 16S rDNA 序列间的相似性小于 90%;A2、A23、A25、B24 和 B30 等 5 个克隆序列属于 γ -proteobacterium,彼此间序列的相似性高达 99%,但与库中收录的 γ -proteobacterium 细菌 16S rDNA 序列间的相似性不超过 88%;另外,序列 B38 和 B32 在 RDP 数据库中进行 Alignment 分析时相似值仅为 0.11,而其他 19 条序列的相似值均介于 0.5~0.6 之间。根据所获得的 22 个 16S rDNA 克隆序列构建细菌系统发育树(图 4),其中 B38 和 B32 因与 RDP 数据库中细菌 16S rDNA 序列间的相似值仅为 0.11 而不能参与系统发育树的构建。

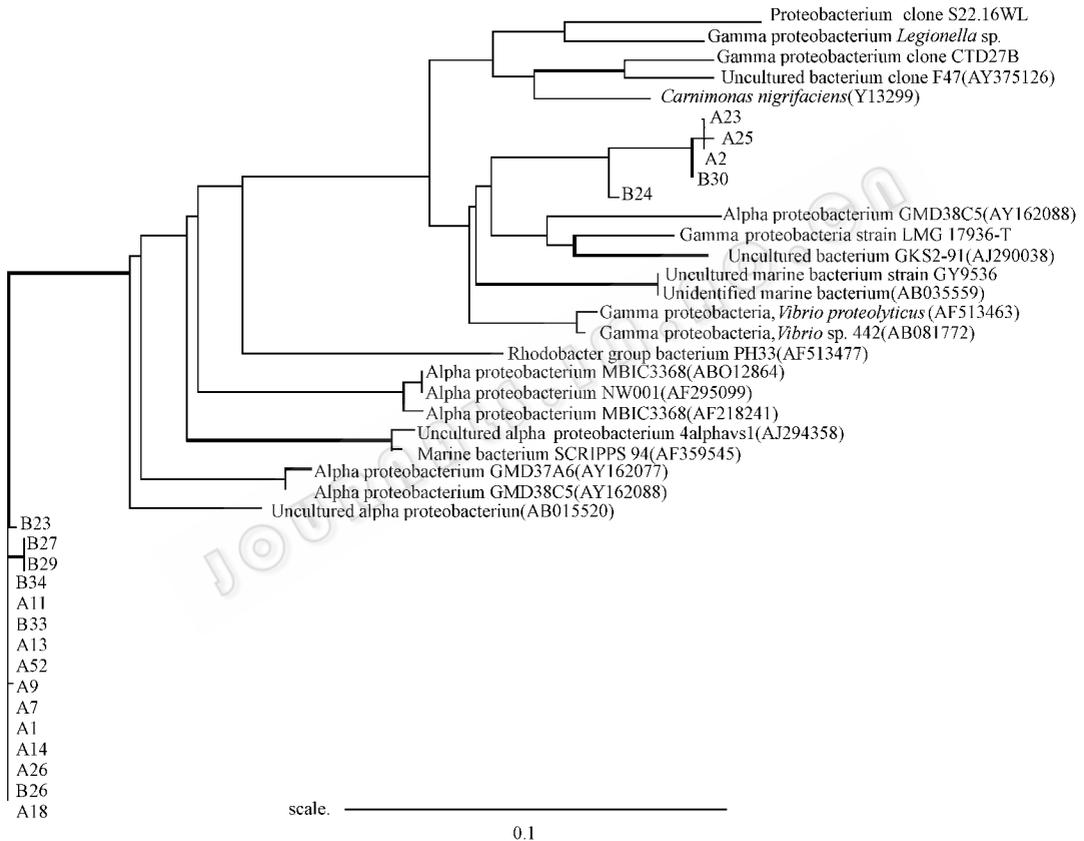


图 4 以 16S rDNA 序列为基础的厚指海绵 *Pachychalina* sp. 体内细菌系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree of the bacterium associated with the Marine sponge *Pachychalina* sp.

Evolutionary distances were calculated by the method with Kimura 2-parameter calculation model and the topology was inferred by the neighbor-joining method based on bootstrap analysis of 100 replicates. Bar 0.1 substitution per nucleotide.

3 讨论

16S rDNA 是原核生物核糖体 16S rRNA 的编码基因。目前,在细菌的系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟是 RNA,其种类少,含量大,分子大小适中,存在于所有的生物中,在结构和功能上具有高度保守性,素有“细菌化石”之称。由于 16S rDNA 大小适中,约 1.5kb 左右,既能利用测序技术来较容易地得到其序列,故被细菌学家和分类学家所接受。

通过对其序列的分析,可以判定不同菌属、菌种间遗传关系的远近。

用分子生物学的方法来研究海绵体内的细菌多样性,是一种快速、简便和有效的方法。目前,国内外研究微生物多样性最常用的分子生物学方法有细菌 16S rDNA 测序法、荧光原位杂交(FISH)和 16S rDNA 扩增片段限制性酶切分析(ARDRA),它们都能准确反映出环境样品中细菌的多样性^[2,6,9]。我们采用 16S rDNA 限制性酶切片段长度多样性分析

方法对海绵 *Pachychalina* sp. 体内细菌的多样性进行了初步的研究,大部分克隆序列间的 ARDRA 带谱存在差异,在一定程度上反映了海绵体内细菌组成具有多样性。

我们随机挑选了 22 个克隆,对其 16S rDNA 进行了部分序列的测定,进一步研究了它们的系统发育树关系。系统发育分析可知海绵体内细菌具有丰富的多样性,它们绝大多数属于 proteobacterium。其中 A1、A11、A13、A14、A18、A26、A52 与已经报道的 Unidentified α -proteobacterium strain BD1-8 间的相似性达到 90% 之外,但它们与海绵 *Rhopaloeides odorabile* 体内最为常见的 α -proteobacterium NW001 的 16S rDNA 序列间的相似性不到 85%; A2、A23、A25、B23 和 B30 的与数据库中的 γ -proteobacterium 相似性都不大于 85%,因此,它们可能是一些仍未被发现的 γ -proteobacterium; 另外, B32、B38 目前在所有数据库中还没有与之匹配的 16S rDNA,不能参与系统发育树的构建。虽然在实验中我们挑选的克隆数量有限,但所测序列的分析结果也可以充分证明海绵 *Pachychalina* sp. 微生物组成有着丰富的多样性。

该研究较全面地认识了海绵 *Pachychalina* sp. 体内细菌的组成情况,为进一步研究、分离培养海绵体内的有益微生物,加快进行海绵体内天然活性产物的开发利用提供了重要的参考数据。

致谢 在该研究中,得到中国科学院海洋研究所李锦和教授和李新正教授的帮助,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Hugenholtz P, Goebel B M, Pace N R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol*, 1998, **180**: 4765 - 4774.
- [2] Distel D L, DeLong E F, Waterbury J B. Phylogenetic characterization and in situ localization of the bacterial symbiont of shipworms (Teredinidae: Bivalvia) by using 16S rRNA sequence analysis and oligodeoxynucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 2376 - 2382.
- [3] Polz F M, Distel D L, Zarda B, et al. Phylogenetic analysis of a highly specific association between ectosymbiotic, sulfur-oxidizing bacteria and a marine nematode. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 4461 - 4467.
- [4] Faulkner D J, He H, Unson M D, et al. New metabolites from marine sponges: Are symbionts important? *Gazz Chim Ital*, 1993, **123**: 301 - 307.
- [5] Wilkinson C R. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar Biol*, 1978b, **49**: 161 - 167.
- [6] Brantley S E, Molinski T F, Preston C M, et al. Brominated acetylenic fatty acids from *Xestospongia* sp., a marine sponge-bacteria association. *Tetrahedron*, 1995, **51**: 7667 - 7672.
- [7] Nicole S, Webster, Kate J, et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *rhopaloeides odorabile*. *Applied And Environmental Microbiology*, 2001, **67**(1): 434 - 444.
- [8] 许绍斌, 陶五芬, 杨昭庆, 等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法. *遗传*, 2002, **24**(3): 335 - 336.
- [9] Stefan W, Walter A, Alfred P, et al. Diversity of uncultured microorganisms associated with the seagrass *Halophila stipulacea* estimated by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, **62**(3): 766 - 771.

Phylogenetic Diversity of Bacterium Associated with the Sponge *Pachychalina* sp.

FANG Zai-Guang HUANG Hui-Qin CAI Hai-Bao LU Jia-Sen BAO Shi-Xiang*

(State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: With culture-independent approach, microbial DNA was directly extracted from *Pachychalina* sp. Using the microbial DNA as template, bacterial 16S rDNAs were amplified by PCR. Amplified products were cloned, sequenced and secondarily amplified by PCR. Then the secondarily amplified products were purified to be further characterized by termed ARDRA (amplified rDNA restriction analysis, ARDRA). According to the enzyme restriction mapping, the apparent difference among them were disclosed. Twenty-two different cloned partial sequences were acquired and most of them were related to proteobacter. In the phylogenetic tree, some clones came under alpha proteobacterium and some clones representing some novel groups, belonged to gamma proteobacterium. Others aligned with a similarity value of 0.11 in the RDP database could not be found in the phylogenetic tree. Result shows prolific bacterial diversity of marine sponge *Pachychalina* sp.

Key words: Marine sponge *Pachychalina* sp., 16S rDNA, Bacterial diversity

* Corresponding author. Tel 86-898-66890695 Fax 86-898-66890978 E-mail fbsxhq@yahoo.com.cn

Received date: 12-15-2003