

促旋酶(*gyrase*) B 亚单位基因 *gyrB* 在鉴别细菌近缘种中的应用

李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 高秀芝, 崔宗均*

(中国农业大学农学与生物技术学院, 中国农业大学生物质工程中心, 北京 100094)

摘要: 单拷贝的 *gyrB* 是普遍存在于细菌中编码促旋酶 B 亚单位的基因, 该基因进化速率快, 每 100 万年的平均碱基替换率为 0.7%~0.8%。研究证明, 该区段基因能对假单胞菌、芽孢杆菌、弧菌、肠杆菌、分枝杆菌、气单胞菌、乳酸菌等不同属或科内的近缘种进行区分鉴定, 还可通过设计种特异性引物进行定量 PCR 或者限制性片段分析, 同时也能结合变性梯度凝胶电泳技术 (DGGE) 追踪微生物的动态。*gyrB* 基因弥补了非蛋白编码基因 16S rDNA 或者基因间隔序列 (ITS) DNA 无法区分近缘种的缺陷, 给近缘种的鉴别或者其群体指纹图谱的分析带来了新的希望, 为当前国内外用于近缘种研究的热点, 是细菌系统发育分析上非常值得重视的新靶标。

关键词: 促旋酶; *gyrB*; 近缘种; 系统发育

中图分类号: Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 05-0701-06

素有“细菌化石”之称的 16S rDNA 是编码原核生物核糖体小亚基 rRNA (16S rRNA) 的基因, 长度约为 (1550 ± 200) bp。其序列包含 10 个可变区 (variable region) 和 11 个恒定区 (constant region), 可变区因细菌而异, 变异程度与细菌的系统发育密切相关^[1,2]。该基因序列几乎可以对所有的细菌进行属水平上的鉴定^[3], 是细菌分类学研究中最常用、最有用的“分子钟”。多年来, 以 PCR 为基础、该区段为靶标的诸如 (T) DGGE、LH-PCR、cPCR、SSCP、ARDRA、AFLP、RFLP、FISH 以及 T-RFLP^[4] 等的现代分子生物学技术的发展与应用, 更加方便了细菌的分类鉴定及环境中菌群的动态分析。然而, 由于 16S rDNA 的高度保守性, 对相似率极高的近缘种无法做进一步区分^[5], 也就难以设计出定量分析的种特异性引物, 限制了对目的菌的正确定量分析。此外, 其多拷贝的特点使得某些单菌的 DGGE 图谱中出现多个条带^[6], 难免对微生物的多样性造成假象。而近年来研究者发现以编码蛋白的基因作为系统发育鉴定标

记可以弥补 16S rDNA 的这些缺陷^[7], 其中编码促旋酶的 *gyrB* 基因正逐渐成为研究者欢迎的近缘种鉴别新靶标。

该基因由 Yamamoto 等 1995 年第一次应用于假单胞菌近缘种的鉴别^[8], 此后的研究证明, 该基因能够区分出大部分细菌的近缘种, 将成为鉴别近缘种的重要有效靶标。本文就该基因在 10 类细菌的系统分类与鉴定、定量和动态分析中的应用进行了阐述和探讨, 介绍了其作为指纹基因的有效性, 以期为提高微生物分类和检测的准确性提供参考依据。

1 促旋酶(*gyrase*)B 亚单位基因-*gyrB*

细菌 DNA 促旋酶(*gyrase*)由两个亚单位组成: *GyrB* 和 *GyrA*。该酶的活性结构是由 2 个 A 亚基和 2 个 B 亚基组成的四聚体, 即 (BA)₂, 其中 B 亚基由基因 *gyrB* 编码, 分子量约 90 kDa 或者 70 kDa^[9]。该 *gyrB* 是单拷贝的看家基因, 序列长度约 1.2~1.4 kb, 平均碱基替换率为每 100 万年变化 0.7%~0.8%, 比

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划(2006BAD07A01; 2006BAD25B04)

*通讯作者。Tel: +86-10-62733437; Fax: +86-10-62731857; E-mail: acuijzj@cau.edu.cn

作者简介: 李献梅(1982-), 女, 博士研究生, 从事生物质资源利用及微生物生态研究。E-mail: starofchina@gmail.com

收稿日期: 2007-11-23; 修回日期: 2008-02-18

16S rDNA 的每 5000 万年变化 1% 的速率要快^[10~13], 而且不发生水平转移, 并普遍存在于各种细菌中, 满足了作为系统发育分析靶基因的要求^[8], 同时越来越多的研究证明了该基因序列在区分和鉴定细菌近缘种方面比非蛋白编码基因 16S rDNA 具有较强的优势, 使人们克服了以高度保守的 16S rDNA 或者相对具有可变性的 ITS DNA 难以准确区分细菌近缘种的困难, 为近缘种的研究带来了新的希望。

2 *gyrB* 在细菌分类与鉴定中的应用

2.1 假单胞菌近缘种的鉴别与分析

Yamamoto 等首次用兼并引物 UP-1、UP-2 扩增了不同细菌的 *gyrB* 基因, 该组引物由大肠杆菌(*E. coli*) (SWISS-PROT code, *GYRB_ECOLI*; 序列号 P06982)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) (*GYRB_PSEPU*; P13364) 和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) (*GYRB_BACSU*; P05652) 的促旋酶(*gyrase*) B 亚单位蛋白的两段保守氨基酸序列经反转录后合成。研究证明该组引物除了能扩增 gamma 和 alpha 亚门紫色细菌以及低 (G+C) 含量的革兰氏阳性细菌外, 还可扩增大部分革兰氏阴性细菌和某些阳性细菌。作者根据序列特征, 设计了能区分不同恶臭假单胞菌的引物 P734、P895、P1213r 和 P1455r。应用该方法较快速方便地鉴别出细菌近缘种, 监测自然环境的微生物^[8]。Watanabe 等用该基因将活性污泥中主要菌群 R6 分成两组, 并以该基因为靶标, 通过竞争 PCR 监测了该菌群随着酚量的增加所发生的变化^[14]。Izumi 等通过分析 9 株变形假单胞菌(*Pseudomonas Plecoglossicida*) 和 2 株其他类假单胞菌的 *gyrB* 基因序列, 设计了该区段的内外两套特异性引物 PL-G1F/PL-G1R 和 PL-G2F/PL-G2R, 做了肠道和肾脏样品的巢式 PCR 分析研究, 证明了该方法可以快速检测出由变形假单胞菌引起的细菌性发热腹水疾病^[15]。

2.2 芽孢杆菌类的系统发育分析

芽孢杆菌是一类革兰氏阳性、产芽孢、好氧的发酵杆状细菌, 其中枯草芽孢杆菌类主要包括: 枯草芽孢杆菌枯草亚种(*B. subtilis* subsp. *subtilis*)、地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)、解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌黑色变种(*B. atrophaeus*)、莫哈维芽孢杆菌(*B. mojavensis*)、*B. vallismortis*、*B. subtilis* subsp. *spizizenii*、*B. sonorensis*; 蜡状芽孢杆菌类包括: 蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*)、炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*)、苏云金芽孢杆菌(*B. thuringiensis*)、蕈状芽孢菌(*B. mycoides*)^[5,16]。研究证明,

这些菌之间在 16S rDNA 序列上具有高度相似性^[17], 限制了对它们间系统发育关系的准确区分。

Wang 等通过对枯草芽孢杆菌类的 *gyrB* 基因序列、16S rDNA 基因序列以及 DNA 杂交的比较分析, 结果表明 8 种近缘枯草芽孢杆菌的 16S rDNA 序列的相似性在 98.1%~99.8% 之间, 难以区分, 而 *gyrB* 基因的相似性则在 75.4%~95.0% 之间, 该结果和 DNA 杂交技术分析结果吻合^[5], 表明以 *gyrB* 为靶标能够在种水平上区分枯草芽孢杆菌近缘种。蜡状芽孢杆菌类的 16S rDNA 以及 DNA 杂交结果显示他们间的相似率在 99% 以上, 且炭疽芽孢杆菌(*B. anthracis*) 和蜡状芽孢杆菌(*B. cereus*) 的 23S rDNA 序列也相同。为突破这些分类限制, Yamada 等通过对长达 1.2kb 的 *gyrB* 基因进行扩增、克隆和测序分析发现, 原来被定为苏云金芽孢杆菌的血清型菌株 *B. thuringiensis kurstaki* 和 *aizawai* 应归属于蜡状芽孢杆菌^[17]。另外, Myron 等研究发现, 18 株 H 血清型蜡状芽孢杆菌间的相似率均在 99% 以上, 与苏云金芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌、蕈状芽孢菌的相似率也大于 99%, 表明该 16S rDNA 序列无法将它们区分开, 而基于 *gyrB* 序列的系统发育树明显分为四组^[11]。以上研究结果充分证明了 *gyrB* 基因能够鉴别出芽孢杆菌的近缘种。

2.3 弧菌科致病菌的区分

能引起霍乱及食物中毒的主要弧菌科致病菌有霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*)、创伤弧菌(*V. vulnificus*) 和霍氏弧菌(*V. hollisae*)。这些致病菌会引起腹泻、霍乱、败血症, 主要存在于海产食品中, 比如沿岸鱼、牡蛎、海虾等^[18~21]。能够快速而准确地鉴定出这些致病菌具有重要的医学意义。Venkateswaran 等通过对 1258 bp 的 *gyrB* 基因序列分析发现, 副溶血弧菌与溶藻弧菌的 16S rDNA 的相似率为 99.7%, 而 *gyrB* 的相似率仅为 86.8%^[19], 可以明显区分出这两种致病菌。Vuddhakul 等通过对霍氏弧菌部分 *gyrB* 基因序列分析发现, 该段序列与副溶血弧菌(*V. parahaemolyticus*) 的相似率为 80%, 可明显看出两者不同。且通过构建该区段的特异性引物, 用 PCR 方法便可从其他菌中将霍氏弧菌鉴别出来^[20]。Kumar 等使用创伤弧菌的特异引物 *gyr-vv1* 和 *gyr-vv2* 扩增了 285 bp 长度的 *gyrB* 片段, 可以快速准确地将该菌与其他种的弧菌或者非弧菌类微生物区分开, 以此为基础的 PCR 方法可以直接检测出人工配制的牡蛎混合液中浓度为

300CFU/g 的创伤弧菌;在富集培养 18 h 的情况下,可以检测出浓度为 30 CFU/g 的创伤弧菌^[21],为该菌的检测提供了便捷的方法。侯晓丽等通过 *gyrB* 基因的通用引物分析了霍乱弧菌和副溶血弧菌分离菌株间的系统发育关系,也发现该区段的基因可以明显区别开不同的菌株^[18]。

2.4 肠杆菌科菌株的 16S rDNA 和 *gyrB* 基因的比较分析

Dauga 等比较了肠杆菌科菌株的 16S rDNA 和 *gyrB* 基因。基于 16S rDNA 的系统树中阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 与沙门氏菌和柠檬酸菌的关系较近,而产气肠杆菌 (*Enterobacter aerogenes*) 却与克雷伯氏菌归于一组,使得肠杆菌、柠檬酸菌和克雷伯氏菌间的关系交错重叠,这不符合细菌分类法。而以 *gyrB* 为靶标得出的系统树形成如下 3 个分枝:①沙雷氏菌属 (*Serratia*) 分枝;②变形杆菌属 (*Proteus*)、普罗威登斯菌属 (*Providencia*)、摩根菌属 (*Morganella*) 形成的分枝;③埃希氏菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*)、肠杆菌属 (*Enterobacter*) 和柠檬酸细菌 (*Citrobacter*) 形成的分枝,由此明显区分开了不同的肠杆菌。结果还表明 *gyrB* 基因对沙雷氏菌属 (*Serratia*) 种间关系的鉴定要比 16S rDNA 的结果更为可靠,16S rDNA 更适合于分析进化距离较远的肠杆菌科^[22]。张嵘等比较了 10 株沙门氏菌的 16S rDNA 和 *gyrB* 基因的系统发育树,发现 *gyrB* 基因的进化距离为 0.9%~2.7%,大于 16S rDNA 的进化距离 0.1%~1%^[23],由此证明 *gyrB* 基因能够明显区分开沙门氏菌的近缘种。

2.5 分枝杆菌属的 *gyrB* 基因分析

分枝杆菌属 (*Mycobacteria*) 中致病菌主要为结核分枝杆菌复合群 (*M. tuberculosis complex*)。它的近缘种包括结核杆菌 (*M. tuberculosis*)、牛分枝杆菌 (*M. bovis*)、非洲分枝杆菌 (*M. africanum*)、田鼠分枝杆菌 (*M. microti*)。研究证明该类菌种之间的 16S rDNA 和 16-23S rDNA 序列相似,很难准确地区分开。为此, Kasai 等设计了该复合群 *gyrB* 基因区段的特异性引物 MTUB-f 和 MTUB-r,并结合限制性内切酶 *RsaI* 或者 *TaqI*,进行了限制性消化分析,成功地区分出不同的菌种。同时也设计了复合群中的种特异性引物 756-G 和 1410-C、756-A 和 1410-A、756-G 和 1410-A、756-G 和 1450-A、675-T 和 1410-G 可准确地将复合群中的近缘种区分开^[24]。而 Niemann 等用 *gyrB* 基因引物 MTUB-f 和 MTUB-r 结合限制性片段长度多态性

(RFLP) 技术,也快速准确地区分出了这些菌种^[25]。

2.6 气单胞菌 *gyrB* 基因分析

气单胞菌属 (*Aeromonas*) 是一类氧化酶、接触酶阳性的兼性厌氧杆菌,会引起人类腹泻。正确对该属的菌种进行区分鉴定在临床上具有重要意义。但基于 16S rDNA 的各种分析方法均因该区段的高度保守性而使鉴定工作陷入了新的迷惑。为此, Yáñez 等分析了 53 株气单胞菌的 *gyrB* 基因序列,结果表明该属可以明显与霍乱弧菌 (*V. cholerae*)、大肠杆菌 (*E. coli*) 以及志贺邻单胞菌 (*Plesiomonas shigelloides*) 区分开来,其种间相似率为 86.7%~100%,碱基替代速度约为 16S rDNA 的 6 倍^[26]。Tacao 等结合变性梯度凝胶电泳技术 (DGGE) 研究了虹鳟鱼皮肤和肾脏以及水中分离的气单胞菌,并分析了样品中微生物群体变化,使得 *gyrB*-DGGE 技术能够追踪环境样品中微生物的动态变化^[27]。

2.7 植物致病菌苛养木杆菌的检测

Rodrigues 等结合 16S rDNA 和 *gyrB* 基因对昆虫传播致病菌-苛养木杆菌 (*Xylella fastidiosa*) 进行了多重 PCR 研究,结果表明该方法可以检测出田间收集的植物、携带病源的昆虫以及已经感染但未表现症状的植物中的苛养木杆菌,这一结果为很好地控制该菌引起的经济作物病害提供了快速的检测方法。在植物坏死细胞样品 DNA 多重 PCR 结果中仅仅检测出 *gyrB* 基因区段的目的条带,同时研究证明,由于 16S rDNA 序列高度相似,不能有效区分出不同宿主的所有木质部小菌属 (*Xylella*),而基于 *gyrB* 基因序列的系统树能够清晰的区分出这些致病菌^[28]。表明,该区段的基因分析比 16S rDNA 要灵敏。

2.8 草酸降解菌不同菌种的区分

Coenye 等对草酸菌属 (*Pandora*) 中 5 种已命名和未命名的菌株进行了 *gyrB* 基因的 PCR 和 RFLP 分析,结果表明,无论是限制性片段长度分析还是直接测序均可区分出草酸菌属的不同种^[29]。

2.9 降解染料新菌种—中国希瓦氏菌的鉴定

许玫英等结合生理生化特征和 16S rDNA 序列分析确定了降解染料的一株微生物为希瓦氏菌,同时 *gyrB* 基因序列结果表明该株微生物与近缘菌株 *Shewanella putrefaciens* ATCC8071T 的相似率为 87%,综合分析后确定该株希瓦氏菌为新菌,并命名为中国希瓦氏菌 *Shewanella cinica* D14^{T[30]}。这一研究为新菌种的鉴定提供了新靶标新方法。

2.10 乳酸菌 *gyrB* 基因的分析

赵敏等用设计的特异性兼并引物 Lact73F 和 Lact1066R 扩增了短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 的 *gyrB* 基因, 通过克隆、酶切和测序分析, 得知其氨基酸序列与植物乳杆菌的相似性为 81%, 能与植物乳杆菌区分开, 为以后快速检测短乳杆菌提供了 PCR 方法和 *gyrB* 基因序列^[31]。该研究为乳酸菌类近缘种的鉴别和分析提供了新的方法。

3 *gyrB* 在定量 PCR 中的应用

早在 1998 年, Watanabe 等通过菌种特异性引物扩增了活性污泥中恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 和从毛单胞菌 (*Comamonas*) 的 *gyrB* 基因, SYBRGreen 染色 PCR 产物后, 根据紫外下条带的浓度, 定量分析了这两种菌的含量, 其结果与平板分析一致^[32], 证实了以 *gyrB* 基因为靶标可以定量分析近缘种的含量。蒋鲁岩等根据 *gyrB* 基因设计了特异性引物和 TaqMan 探针, 定量分析了海虾仁、牡蛎、鲜牛肉、熟食以及牛奶中的副溶血性弧菌, 结果表明定量 PCR 每反应的检测灵敏度小于 10 CFU, 相关系数为 1, 证明基于该基因进行定量分析可靠性较高^[33]。赵敏等不仅根据 *gyrB* 基因进行了短乳杆菌的序列分析, 还设计了特异引物 Lact232F 和 Lact306R 和探针 Lact282 进行了短乳杆菌的定量分析, 其标准曲线的相关系数大于 0.99^[34]。这些研究结果证实了以 *gyrB* 基因为靶标可以定量分析细菌的不同近缘种。

4 展望

gyrB 基因的广泛应用充分证明该区段基因在微生物的系统发育分析以及区分和鉴定上的重要性, 尤其对于 16S rDNA 无法解决的近缘种来说, 基于该基因的分析尤为有效。以该基因为靶标不但可以区分不同的近缘种^[8], 还可设计特异性引物进行定量 PCR 分析, 结合多重、巢式 PCR 对目的细菌进行检测和鉴别^[15,28,33,34]。而且和 DNA 杂交技术相比, 该靶标同样能够鉴定新菌种^[30], 为鉴定不同环境下细菌近缘种新菌种带来了新方法。但目前, 该 *gyrB* 基因序列库的信息量还比较少, 更多细菌的 *gyrB* 基因序列还未测出, 同时 Chelo 等的研究也证明 16S rDNA 在明串珠菌类乳酸菌 (包括明串珠菌 (*Leuconostoc*)、酒球菌 (*Oenococcus*)、魏斯氏菌 (*Weissella*)) 的系统发育分析中有重要的分类学意义^[7]。因此 *gyrB* 基因

最好与诸如 16S rDNA 或者 16S-23S rDNA 等非蛋白编码基因相结合, 以便得到更为详细而全面的微生物信息。

以 *gyrB* 为靶标发展起来的快而准确的鉴定技术也为临床上致病微生物的鉴定提供了有效方法^[25]。同时对食品病原微生物的快速检测更加保障了人类的饮食健康^[18~21], 提高了饮食质量。然而, 目前的编码蛋白基因的研究主要以细菌为多, 真菌的分析也有望突破以非蛋白编码基因为基础的思路, 为更加准确地认识和研究利用微生物开辟更多有效的综合方法。

此外, 本实验室以前的研究表明, 乳酸菌有些菌株的 16S rDNA 的 DGGE 图谱有多个条带^[6]; 不同克隆子和单菌与 GenBank 上的同一近缘种的相似率均在 99% 以上^[35], 难以准确区分, 也给定量 PCR 特异性引物的设定带来困难; 我们在传统食品微生物分析中发现通过 16S rDNA 序列很难鉴别出芽孢杆菌的近缘种, 结合 *gyrB* 基因序列分析可以区分出枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、解淀粉芽孢杆菌 (*B. amyloliquefaciens*) (结果另文发表); 虽然以前的研究证明, T-RFLP 技术是一种高通量、快速而灵敏的微生物群体现代指纹分析方法^[36], 但以前的研究多以 16S rDNA 或 16S-23S rDNA 为基础, 近缘菌株的末端片段图谱相差无几; 可喜的是, 经研究证明, *gyrB* 基因可用于微生物的定量 PCR、DGGE 或者 RFLP 分析^[25,27,29,32~34], 因为该基因具有单拷贝的特点以及在种水平上能区分细菌近缘种的优势, 这为我们的研究提供了很好的思路和方法, 有望克服以前基于 16S rDNA 的缺陷, 探索 *gyrB*-T-RFLP 技术使其成为更加快速灵敏的微生物群体图谱分析技术, 为以后的研究创建更加准确的分子分析方法。

参 考 文 献

- [1] Woese CR, Fox GE, Zablen L, et al. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*, 1975, 254: 83–86.
- [2] 黄正根, 刘昕. 应用 16S rDNA 检测致病菌的研究进展. 中华检验医学杂志 (*Chinese Journal of Laboratory Medicine*), 2005, 28(6): 663–665.
- [3] Ward DW, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*, 1990, 345: 63–65.
- [4] Giraffa G, Neviani E. DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems.

- tems. *Int J Food Microbiol*, 2001, 67(1): 19–34.
- [5] Wang L, Lee F, Tai C, *et al.* Comparison of *gyrB* gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group. *Int J Syst Evol Micr*, 2007, 57: 1846–1850.
- [6] Wang X, Haruta S, Wang P, *et al.* Diversity of a stable enrichment culture which is useful for silage inoculant and its succession in alfalfa silage. *FEMS Microbiol Ecol*, 2006, 57: 106–115.
- [7] Chelo MI, Zé-Zé L, Tenreiro R. Congruence of evolutionary relationships inside the *Leuconostoc-Oenococcus-Weissella* clade assessed by phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene, *dnaA*, *gyrB*, *rpoC* and *dnaK*. *Int J Syst Evol Micr*, 2007, 57: 276–286.
- [8] Yamamoto S, Harayama S. PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61(3): 1104–1109.
- [9] 侯晓丽, 陈智. 分类及鉴别细菌的新靶标—*gyrB* 基因. 国外医学·流行病学传染病学分册(*Foreign Medical Sciences Epidemiology Lemology*), 2005, 32(1): 38–41.
- [10] Huang WM. Bacterial diversity based on type II DNA topoisomerase genes. *Annu Rev Genet*, 1996, 30: 79–107.
- [11] La Duc MT, Satomi M, Agata N, *et al.* *gyrB* as a phylogenetic discriminator for members of the *Bacillus anthracis-cereus-thuringiensis* group. *J Microbiol Meth*, 2004, 56(3): 383–394.
- [12] Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species detection in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol*, 1994, 44: 846–849.
- [13] Ochman H, Wilson AC. Evolution in bacteria: evidence for a universal substitution rate in cellular genomes. *J Mol Evol*, 1987, 26: 74–86.
- [14] Watanabe K, Teramoto M, Harayama S. An outbreak of nonfloculating catabolic populations caused the breakdown of a phenol-digesting activated-sludge process. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(7): 2813–2819.
- [15] Yamamoto I, Suzuki SM, Shimizu K, *et al.* Identification and detection of *Pseudomonas plecoglossicida* isolates with PCR primers targeting the *gyrB* region. *J Fish Dis*, 2007, 30(7): 391–397.
- [16] Jensen GB, Fisker N, Sparso T, *et al.* The possibility of discriminating within the *Bacillus cereus* group using *gyrB* sequencing and PCR-RFLP. *Int J Food Microbiol*, 2005, 104 (1): 113–120.
- [17] Yamada S, Ohashi E, Agata N, *et al.* Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(4): 1483–1490.
- [18] 侯晓丽, 曹清毅, 潘劲草, 等. 霍乱弧菌和副溶血弧菌分离株的 *gyrB* 基因系统发育分析. 微生物学报(*Acta Microbiologica Sinica*), 2006, 46(6): 884–889.
- [19] Venkateswaran K, Dohmoto N, Harayama S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(2): 681–687.
- [20] Vuddhakul V, Nakai T, Matsumoto C, *et al.* Analysis of *gyrB* and *toxR* gene sequences of *Vibrio hollisae* and development of *gyrB*- and *toxR*-targeted PCR methods for isolation of *V. hollisae* from the environment and its identification. *Appl Environ Microbiol*, 2000, 66 (8): 3506–3514.
- [21] Kumar HS, Parvathi A, Karunasagar I, *et al.* A *gyrB*-based PCR for the detection of *Vibrio vulnificus* and its application for direct detection of this pathogen in oyster enrichment broths. *Int J Food Microbiol*, 2006, 111(3): 216–220.
- [22] Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of *Enterobacteriaceae*: a model molecule for molecular systematic studies. *Int J Syst Evol Micr*, 2002, 52(2): 531–547.
- [23] 张嵘, 蔡加昌, 张书梅等. *gyrB* 基因和 16S rRNA 基因序列分析在沙门菌属细菌鉴别中的临床应用价值. 中华微生物学和免疫学杂志(*Chinese Journal of Microbiology and Immunology*), 2007, 27(4): 368–369.
- [24] Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing *mycobacteria* by their *gyrB* sequences. *J Clin Microbiol*, 2000, 38 (1): 301–308.
- [25] Niemann S, Harmsen D, Ruesch-Gerdes S, *et al.* Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(9): 3231–3234.
- [26] Yáñez MA, Catalán VA, Figueras D, *et al.* Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Micr*, 2003, 53(3): 875–883.
- [27] Moura TM, Alves A, Henriques A, *et al.* Evaluation of 16S rDNA- and *gyrB*-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 246(1): 11–18.
- [28] Rodrigues JL, Silva-Stenico M, Gomes ME, *et al.* Detection and diversity assessment of *Xylella fastidiosa* in field-collected plant and insect samples by using 16S rRNA and *gyrB* sequences. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(7): 4249–4255.
- [29] Coenye T, LiPuma JJ. Use of the *gyrB* gene for the identification of *Pandora* species. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, 208(1): 15–19.

- [30] 许玫英, 郭俊, 钟小燕, 等. 一个降解染料的希瓦氏菌新种-中国希瓦氏菌. *微生物学报(Acta Microbiologica Sinica)*, 2004, 44(5): 561–566.
- [31] 赵敏, 潘劲草, 李学梅, 等. 短乳杆菌 *gyrB* 基因的扩增与测序. *中国卫生检验杂志(Chinese Journal of Health Laboratory Technology)*, 2007, 8: 1378–1380.
- [32] Watanabe K, Yamamoto S, Hino S, *et al.* Population dynamics of phenol-degrading bacteria in activated sludge determined by *gyrB*-targeted quantitative PCR. *Appl Environ Microbiol*, 1998, 64(4): 1203–1209.
- [33] 蒋鲁岩, 蔡潭溪, 邵景东, 等. 应用双重 Real-time PCR 同步定量检测食品中的副溶血性弧菌及金黄色葡萄球菌. *中国食品卫生杂志(Chinese Journal of Food Hygiene)*, 2006, 18 (3): 205–209.
- [34] 赵敏, 潘劲草, 叶榕, 等. 实时荧光定量 PCR 快速鉴定短乳杆菌. *中国卫生检验杂志(Chinese Journal of Health Laboratory Technology)*, 2007, 17(2): 209–210.
- [35] 高丽娟, 王小芬, 崔宗均, 等. 秸秆发酵乳酸菌复合系 SFC-2 的构建及其组成多样性研究. *环境科学(Environmental Sciences)*, 28(5): 1088–1094.
- [36] Blackwood CB, Marsh T, Kim SH, *et al.* Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 926–932.

Application of *gyrB* in the identification of closely related bacteria—A review

Xianmei Li, Xiaofen Wang, Hongyan Yang, Xiuzhi Gao, Zongjun Cui*

(College of Agronomy and Biotechnology, Center of Biomass Engineering, China Agricultural University, Beijing, 100094)

Abstract: The single-copied *gyrB* gene, encoding the subunit B of gyrase and distributing universally in all bacteria, has the average substitution rate of 0.7%~0.8% per million years. It's proved that this region could be used to discriminate and identify the closely related species of different bacteria such as *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Enterobacteriaceae*, *Mycobacteria*, *Aeromonas*, *Lactic acid bacteria et.al*. It also can be used of quantitative or restriction fragment analysis of bacteria with the aid of species-specific primers or combined with DGGE(denaturing gradient gel electrophoresis). It really brings new promise for the identifying closest isolates or fingerprinting population due to overcoming the shortage of undistinguishing them acutely with the non-protein-encoding genes such as 16S rDNA or ITS(internal transcribed spacer) DNA. It's an important new molecular marker for researches of closely related species and becoming an attractive topic in current microbial research world.

Keywords: *gyrase*; *gyrB*; closely related species; phylogenetics

Supported by the 11th Five Years Key Programs for Science and Technology Development of China (2006BAD07A01; 2006BAD25B04)

*Corresponding author. Tel: +86-10-62733437; Fax: +86-10-62731857; E-mail: acuizj@cau.edu.cn

Received: 23 November 2007/ Revised: 18 February 2008