

细菌分类与鉴定的新热点:16S-23S rDNA 间区

焦振泉 刘秀梅

(中国预防医学科学院营养与食品卫生研究所 北京 100050)

摘要:随着分子生物学的迅速发展,细菌的分类鉴定亦从传统的表型分类进入到各种基因型分类水平,如(G+C)mol%、DNA杂交、rDNA指纹图、质粒图谱和16S rDNA序列分析等。rRNA存在于所有细菌中,rRNA基因由保守区和可变区组成,在细菌中高度保守。rRNA基因包含5'端到3'端的若干种成分,分别是16S rDNA、间区、23S rDNA、间区和5S rDNA。16S-23S rDNA间区近年来在细菌系统发育学,特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面倍受关注。作为细菌分类和鉴定中的一个热点,本文将就16S-23SrDNA间区的一些特性及其在细菌分类鉴定方面的作用做一简要的介绍。

关键词:细菌系统发育学,16S rRNA基因,23S rRNA基因,16S-23S rRNA间区

中图分类号:Q93 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2654(2001)01-085-05

细菌的分类和鉴定经过了漫长的研究阶段。传统上,细菌主要依靠培养和生化等表型特征进行分类鉴定,这就是表型分类法。近几十年来,分子生物学发展迅速,自从1953年Watson和Crick^[1]阐明了DNA的二级结构,特别是1986年Mullis^[2]发明PCR技术以来,细菌的分类鉴定开始进入分子水平,各种基因型分类方法也应运而生,如(G+C)mol%、DNA杂交、rDNA指纹图、质粒图谱和16SrDNA序列分析等等。

rRNA是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标,它含量高(约占细菌RNA总量的80%),并存在于所有细菌中。rRNA基因由保守区和可变区组成,在细菌中高度保守,素有“细菌化石”之称,是细菌系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟。原核生物的rRNA分为3种,分别为5S rRNA、16S rRNA和23S rRNA,并且它们位于同一操纵子(rrn)上。rRNA的基因在大多数原核生物中都具有多个拷贝^[3],拷贝数目从1到14不等。其中,16S rDNA序列分析已经成为细菌种属鉴定和分类的标准方法,大约2500个种的16S rDNA全序列已经被报道^[4]。根据它们的序列同源性,已经构建了各种属的系统发育树。但由于16S rDNA序列在原核生物中的高度保守性,对于相近种或同一种内的不同菌株之间的鉴别分辨力较差。23S rRNA分子比较大(约3kb左右),并且只有少数种的核酸序列被报道^[5],尚未在细菌的分类和鉴定中得到广泛应用。16S-23S rDNA间区(Intergenic Spacer Region, ISR)由于没有特定功能和进化速率比16S rDNA大10多倍近几年来在细菌鉴定和分类方面倍受关注。一些细菌的16S-23S rDNA ISR的数目、大小和序列已经报道,它们之间的不同使其在细菌系统发育学,特别是相近种和菌株的区分和鉴定方面占据了一席之地。作为细菌分类和鉴定中的一个热点,本文将就16S-23S rDNA ISR的一些特性及其在细菌分类鉴定方面的作用进行讨论。

1 16S-23S rDNA ISR的结构和保守区域

rRNA基因包含5'端到3'端的若干种成分,分别是16S rRNA基因、间区、23S rRNA基因、间区和5S rRNA基因^[6](图1)。对细菌的16S-23S rRNA ISR进行系统研究需要利用PCR对间区进行扩增,而PCR所利用的引物往往是根据16S rRNA和23S rRNA两侧适宜和高度保守的区域进行设计的。通过对16S rRNA序列的分析发现在保守区域内存在3个适合扩增16S-23S rRNA ISR的区域,分别是2、3和4,其中2是在细菌和古菌中最高度保守的序列^[7],3、4分别在多数真核生物中存在^[8]。在对代表18个属、21个种的细菌的23S rDNA序列分析时发现:在基因的前520个碱基中有6个保守区域,分别是5~10。这些区域的开始部分特别重要,因为这个部位的碱基错配将导致Taq DNA聚合酶结合的失败^[9]。根据这些原则,10是最保守的区域,其它区域保守性顺序依次为6,9,8,7和5。所以理论上保守区域2和10是扩增16S-23S rDNA ISR的最佳引物设计部位(图1)。

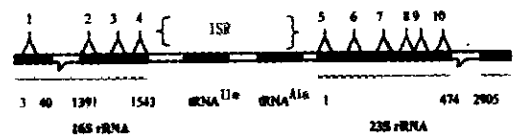


图1 rRNA操纵子保守序列的位置

注:黑框部分代表rRNA操纵子的各个基因,转录从左向右,一些细菌有两个tRNA,如图所示;其它的或有一个或无(tRNA^{Glu}、tRNA^{Ile}或tRNA^{Ala});白框部分代表各个基因的间区,锯齿状白框部分代表16S rRNA、23S rRNA基因未完全显示部分,虚线数字部分代表大肠杆菌的16S和23S rRNA基因的对应碱基数,数字1~10代表下列碱基部位:1:8~27,2:1390~1407,3:1491~1506,4:1525~1541,5:21~38,6:115~132,7:188~208,8:422~437,9:441~460,10:456~474 (Microbiology, 1996, 142:3~16)

2 16S-23S rDNA ISR 序列的特性

将基因组 DNA 用常见的限制性内切酶(如 *Hind*III 或 *Eco*RI)酶切后与 16S rDNA Southern 杂交发现,有几条带可以杂交上,而且带数与基因组的 rRNA 操纵子(*rrn*)数目相一致,如:大肠杆菌是 7 个拷贝,枯草芽孢杆菌 10 个拷贝,产气荚膜梭菌 10 个拷贝,分枝杆菌 1 个拷贝。

在对 22 株革兰氏阴性细菌和 20 株革兰氏阳性细菌的试验中,分别有 13 株和 11 株细菌带有多个 *rrn* 拷贝。在许多种中,拷贝数多至 5~10,但在其它一些种,只有 1~2 个拷贝。*rrn* 拷贝数的不同,说明 16S-23S rRNA ISR 的拷贝数也是不同的。另外,不同种及一个种内的不同型之间的 16S-23S rRNA ISR 的长度也不同,如附着热变性菌(*Thermoproteus tenax*)的 ISR 是 60bp,伊氏巴尔通氏体(*Bartonella elizabethae*)的 ISR 是 1529bp。16S-23S rRNA ISR 长度的不同,通常是由于所包含 tRNA 的数量和类型的不同,大多数革兰氏阴性细菌的 16S-23S rRNA ISR 都包含 tRNA^{Ala} 和 tRNA^{Leu},但是其它一些细菌只包含 tRNA^{Glu};相反,革兰氏阳性细菌的 16S-23S rRNA ISR 包含 tRNA^{Ala} 或 tRNA^{Leu};还有一部分细菌根本不包含 tRNA 基因。如大肠杆菌含有 7 个 *rrn*,其中 3 个 16S-23S rDNA ISR 含有 2 个 tRNA^{Leu},4 个含有 tRNA^{Glu},所以 16S-23S rDNA ISR 的差别不仅在菌株之间,甚至在同一个菌株内部也有所不同。以上这些说明一些真细菌和古菌的 16S-23S rDNA ISR 的数目、长度和序列都不同,这就为它们在细菌分类和鉴定中的作用提供了基础。

3 16S-23S rDNA ISR 序列的排列比较

通过对核酸序列库中 13 个种的 33 个 16S-23S rDNA ISR 序列进行比较发现,它们没有高度保守区域,同源性最高的是编码 tRNA 的基因。但我们知道,这些基因既不存在于所有的菌株中,也不存在于一个菌株所有拷贝的 *rrn* 中,这就提示我们:利用多拷贝的 *rrn* 的 16S-23S rDNA ISR 的长度和数目的差异可以鉴别不同属、种及型的细菌。

随着 PCR 和 DNA 测序技术的快速发展,获得所有细菌 16S-23S rDNA ISR 的全部序列已有可能。而且利用 PCR 扩增 16S-23S rDNA ISR 还可以鉴别细菌不同种之间及同一种内的差异,这种差异主要表现在 16S-23S rDNA ISR 的数目和长度的不同。这就为细菌的分类和鉴定提供了一种快速、自动化和常规的方法。但对于只有一个或两个 *rrn* 拷贝的细菌,利用 16S-23S rDNA ISR 的数目和长度就不太可能,而需对扩增产物进行酶切或测序从而进行鉴定。

现今细菌核酸序列库中有 27 个属和 44 个种的细菌 16S-23S rDNA ISR 已被测定和分析,在种的水平上和同种不同菌株之间至少有一半的 16S-23S rDNA ISR 具有差异。在细菌的鉴定中,16S-23S rDNA ISR 比 RFLP 和 SSCP 的检测敏感性和重复性均高。

4 16S-23S rDNA ISR 在细菌分类和鉴定中的应用

作为细菌分类和鉴定上的热点,16S-23S rDNA ISR 在这些方面得到了越来越多的应用,利用 16S-23S rDNA 的 ISR 大小、数目和序列的不同区分和鉴定亲缘关系相近的种和菌株的研究很多。

Jensen^[10]等建立了一套用来扩增原核生物 16S-23S rRNA 基因间区的 PCR 扩增体系,并对包括李斯特氏菌(*Listeria*)、葡萄球菌(*Staphylococcus*)和沙门氏菌(*Salmonella*)在内的 8 个属 28 个种或亚种的 300 多株细菌进行了扩增,结果显示,16S-23S rDNA ISR 的电泳图谱可以区分所有试验的种或亚种,所以根据细菌 16S-23S rDNA ISR 的大小和数目的不同,可以建立相应的核酸序列库,进而对细菌进行分类和鉴定。

Aakra^[11]等发现 16S rDNA 序列在研究氨氧化细菌(Ammonia-oxidizing bacteria, AOB)的系

统分类方面有一定的局限性,所以他们测定了12株AOB细菌的16S-23S rDNA的ISR序列。结果发现:每个AOB细菌的基因组都含有一个rrn,而大多数细菌的每一个基因组中都含有5~10个rRNA基因的拷贝,这说明AOB细菌的单拷贝rRNA可能与这种细菌生长速度慢有关。另外,AOB细菌之间亲缘关系尽管比较相近,但rRNA基因的大小是不同的。在亚硝化单胞菌中ISR的大小是400bp,而在亚硝化螺菌中却是645~694bp,这说明它们的ISR大小具有种特异性。但有一点是相同的,即在ISR的5'端都具有2个tRNA基因。与16S rDNA序列的同源性相比,16S-23S rDNA ISR的同源性是比较低的。

16S-23S rDNA的ISR序列作为16S rDNA序列系统分类的一个有力补充,不仅能根据16S-23S rDNA的ISR的大小,而且还能根据它所包含的tRNA种类和数目的不同进行分类。

霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和最小弧菌(*Vibrio mimicus*)因在16S rRNA基因序列方面极其相似而不能区分。Chun^[12]等对2个种的16S-23S rDNA ISR进行了扩增和序列测定,发现二者均产生两个很强的条带(580bp和500bp)和一个弱的条带(750bp),序列分析结果显示,大的条带含3个tRNA基因,分别是tRNA^{Glu}和tRNA^{Lys}和tRNA^{Val},580bp的条带含tRNA^{Ile}和tRNA^{Val},500bp的条带含tRNA^{Glu}和tRNA^{Ala}。在霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)和最小弧菌(*Vibrio mimicus*)之间核苷酸序列有2%~3%的差异,利用这个差异设计的霍乱弧菌特异性引物,经鉴定敏感性和特异性均很好,从而建立了霍乱弧菌的第一个分子鉴定手段。

Appuhamy S等^[3]测定了种子放线杆菌(*Actinobacillus seminis*)的16S-23S rDNA ISR序列,并根据它的rrnB设计了种特异性引物。利用这对引物进行的PCR反应特异地扩增种子放线杆菌,而对其它相近的菌如绵羊嗜组织菌等不能扩增出产物,这说明这对引物是对种子放线杆菌种特异的。

有关ISR在细菌的分子流行病学上应用的研究也有许多。Simon^[14]等利用艰难梭菌的16S-23S rDNA ISR的序列设计了引物,对它的模式株及2030株环境中分离出的艰难梭菌进行了分型研究,建立了包含116个不同核糖型的艰难梭菌核酸序列库,这对艰难梭菌的流行病学,特别是鉴定它的地区来源具有重要作用。

葡萄球菌属和链球菌属中的某些种是导致牛乳腺炎的主要病原微生物,Forsman^[15]等对这2个属中的9株与牛乳腺炎相关种的菌株进行了16S-23S rDNA ISR序列测定和分析,发现不同种之间的ISR长度从240~461bp不等,在属与属间只有8~9bp大小的保守区域,在同一个属内的不同种间序列的可变区域为53%~85%不等。作者利用可变区域设计的引物对25个种的菌株和从患有乳腺炎的牛身上分离到的51株分离物进行了PCR验证,证明从16S-23S rDNA ISR区域获得的引物是特异的,并且敏感性很高。

16S-23S rRNA ISR尽管在细菌的分类和鉴定方面有了一定的应用,但需要测定大部分细菌的16S-23S rDNA ISR序列,建立核酸序列库,以便进行对比研究。还有一点值得注意的是要利用一有效的技术手段来克服16S-23S rDNA ISR的不同拷贝之间大小比较相近和不易区分的特点,确保能够扩增出所有的拷贝。另外,16S-23S rDNA ISR并不是万能的,它不能对所有的菌株进行鉴别,如大肠杆菌的不同血清型等。但作为细菌分类和鉴定的热点问题,相信它将具有无可比拟的优越性,为细菌的系统发育学带来一个新的飞跃。

参 考 文 献

- [1] Watson J D, Crick F H C. Nature, 1953, 171: 737~738.
- [2] Mullis K B, Faloona F A. Methods Enzymol. 1987, 155: 335~350.

- [3] Kenerly M E, Janc M. *J Bacteriol*, 1977, **132**:931~949.
- [4] Olsen G J, Pace N R, Nuell M, *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1991, **19**(suppl):2017~2021.
- [5] Ludwig W, Kirchof G, Klugbauer N, *et al.* *Syst Appl Microbiol*, 1992, **15**:487~501.
- [6] Watson J D, Hopkins N H, Robert J W, *et al.* *Molecular Biology of the Gene*, Menlo Park, CA, The Benjamin/Cummings Publishing Company. 1987.
- [7] Lane D J, Pace B, Olsen G J, *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, **82**:6955~6959.
- [8] Weisberg W G, Barns S M, Pelletier D A A, *et al.* *J Bacteriol*, 1991, **173**:697~703.
- [9] Gurtler V, Stanisich V A. *Microbiology*, 1996, **142**:3~16.
- [10] Jensen M A, Webster J A, Straus N. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**(4):945~952.
- [11] Aakra A, Utaker J B, Nes I F. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**:123~130.
- [12] Chun J, Huq A, Colwell R. *Appl Environ Microbiol*, 1999, **65**(6):2202~2208.
- [13] Appuhamy S, Low J C, Parton R, *et al.* *J Appl Microbiol*, 1998, **85**:941~948.
- [14] Simonl J S, Brazier J, Neill G, *et al.* *J Clin Microbiol*, 1999, **37**(2):461~463.
- [15] Forsman P, Tilsala-Timisjarvi A, Alatosava T. *Microbiology*, 1997, **143**:3491~3500.