

# 微生物系统发育与进化关系研究的方法及其应用\*

张晓君<sup>1</sup> 姚檀栋<sup>1</sup> 马晓军<sup>2</sup>

(中国科学院寒区旱区环境与工程研究所 兰州 730000)<sup>1</sup>

(兰州大学生命科学学院 兰州 730000)<sup>2</sup>

**摘要:** 综述了脂肪酸分析、同工酶分析、16S rRNA 序列比较和 RAPD 分析在微生物系统发育和进化关系研究中的应用。对它们原理的简明介绍及典型应用上的比较, 可以更加全面地了解这些方法。

**关键词:** 系统发育, 进化, 脂肪酸, rRNA, 核酸扩增

**中图分类号:** Q93    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0253-2654 (2001) 04-0092-04

## 1 生物化学方法

**1.1 脂肪酸的测定与比较** 脂肪酸作为细胞的组分是细菌系统发育研究中一个重要的指标, 其组成和相对含量具有很好的种属特异性。利用脂肪酸差异来研究微生物的系统发育已取得了一系列进展。

Sasser 研究了 *Pseudomonas sp.* 和其它一些具有相同表型的纯培养物, 发现脂肪酸甲酯 (Fatty acid methyl ester, FAME) 分析与 rRNA 及 rDNA 分析结果具有良好的一致性<sup>[1]</sup>。FAME 分析法为种内关系的建立提供了一个快速而可靠的方法。但是, 不同属甚至不同科的微生物的 FAME 有可能出现重叠, 因此在区分关系较远的微生物的应用上出现一些困难, 使该技术主要应用于种、属水平的研究。例如, 以脂肪酸作为表型标记来研究 methylotrophs 的系统发育关系、区分不同属的蓝细菌或根据 3-羟基脂肪酸的组成将 *mycobacteria* 的菌株分成不同的群等。美国的一些著名实验室组成的指导委员会编制了“支原体高压液相色谱鉴定的标准方法”(1996), 使利用高压液相色谱 (HPLC) 测定的脂肪酸指纹图对支原体进行鉴定的方法得到标准化规范。Holmes 等通过脂肪酸组成分析来比较 *Achromobacter* 各菌株间的关系, 这种关系与全细胞蛋白电泳图谱分析。DNA-DNA 及 rRNA-DNA 杂交结果一致<sup>[2]</sup>。

**1.2 同工酶分析** Market 和 Moller (1995 年) 最早提出同工酶的概念。有机体中存在的各种酶蛋白在结构或组成上的多态性是长期进化中的一种适应。

同工酶电泳分析技术的应用是近 30 年来现代生物进化论迅速发展的主要原因之一。进化研究可以看作是对生物种群间亲缘关系和演化过程的研究, 它包括对系统发育和进化机制的研究。进化的实质, 在一定程度上可以说就是居群遗传构成上或基因频率上的变化和积累。通过一个居群内各种酶蛋白质的表现型, 就可以找出各种酶基

\* 国家重点基础研究发展规划 (No. G1998040800)

中国科学院青藏高原研究资助项目 (No. KZ951-204 KZ95T-06)

中国科学院寒区旱区环境工程研究所冰芯室创新项目 (No. 210505)

收稿日期: 2000-03-27, 修回日期: 2000-09-25

因位点的等位基因,并计算等位基因频率等指标,进而可以了解一个种内的各居群间的遗传学变异情况。在一个居群存在的历史时期内,如果有一段时间环境条件变化或者恶化,某些等位基因就可能频率下降或淘汰,另一些等位基因的频率就可能上升。所以,同工酶分析资料在生物地理研究中有着巨大潜力。

Pons 等通过对 71 个 *Clostridium perfringens* 的人源菌株和 17 个动物源菌株的 MLEE (Multilocus enzyme electro-phoresis) 分析表明该方法是一个可靠的遗传多样性的识别标志<sup>[3]</sup>。Rodriguez 等对 63 个 *Asperigillus fumigatus* 的分离物的 MLEE 分析发现:所研究的 17 个酶中 12 个具有多态性,电泳型的数量分析显示出 3 个采样点的分离物具有明显的遗传差异<sup>[4]</sup>。Davies 等对 60 个 *Pasteurella trehalosi* 分离物进行了多位点酶电泳分析,并将 MLEE 分析的遗传关系与血清型脂多糖 (LPS) 和外膜蛋白 (OMP) 的分型结果进行了对比,结果前者有更强的分型能力,可将 *P. trehalosi* 分为 20 个亚类,而后几种方法只能分成 14 亚类<sup>[5]</sup>。

## 2 现代分子生物学方法

自 1985 年 Pace 等报道以核酸测序技术来研究微生物的生态和多样性问题以来,对微生物系统发育和进化的研究进入了一个新的阶段。近 10 多年来,分子生物学理论和技术迅速发展,如:质粒图谱、限制性片段长度多态性分析、脉冲场凝胶电泳、随机扩增多态性分析、rDNA 指纹图、16SrRNA 基因序列分析等。其中聚合酶链反应 (PCR) 的应用作为生物技术的里程碑,使细菌染色体直接的 DNA 分析更为简便易行,使我们真正从遗传进化的角度去认识细菌,从分子水平进行系统发育关系的研究。

**2.1 rRNA 基因序列差异的比较** rRNA 是目前细菌系统分类学研究中最常用的分子钟,其种类少,含量大(约占细菌 RNA 含量的 80%)。不同的微生物 rRNA 基因序列在某些位点会以不同的几率发生突变,它们在种、属、界等水平上表现出结构与功能的高度保守性,素有“细菌化石”之称,特别是其进化具有良好的时钟性质,形象地说它可作为生物进化史的记时器。序列的相似程度可以反映出它们的系统发育关系 (Phylogenetic relationship)。

1985 年, Lane 等第一次通过 rRNA 来确定环境样品中的微生物,他们直接从混合样品中提取出 5S rRNA 分子,并且通过电泳将属于不同种微生物的 5S rRNA 进行了分离,然后分别测序后确定系统发育位置,这一研究为微生物生态学的研究打开了一个新视野。但是,5S rRNA 相对过小,它的分离仅限于研究比较简单的生态系统,因此,对 16S rRNA 分子的研究随后就开展起来了。16S rRNA 由于分子大小适中(约 1.5kb 左右),既能体现不同菌属之间的差异,又能利用测序技术来较容易地得到其序列而得到有关系统发育关系的充足信息,故被细菌学家及分类学家所接受。16S rRNA 的同源性分析最适用于属及属以上的远缘关系。目前,已对 2000 种(约相当于 50%)以上的已知真细菌的 16S rRNA 进行了测序,通过同源性比较,可以了解不同菌属、菌种在遗传进化方面的距离。

该方法的基本步骤是:(1)样品中总 DNA 的提取;(2)建立 DNA 文库;(3)以 16S rRNA 探针杂交法来筛选含 rDNA 的克隆;(4)测序;(5)序列的比较分析。PCR 技术发明后,这一费时费力的方法得到简化。混合的 DNA 样品进行选择性的扩增,从扩增

产物建立的基因文库中包含有确定的 16S rRNA 基因片段, 对这些片段可进行快速的测序。另一途径是以 16S rRNA 反转录 cDNA, 建 cDNA 文库, 或者在反转录结束后, 加入一个 rDNA 专一性引物进行扩增, 然后克隆测序。一般地讲, 从 rRNA 着手, 优于从 DNA 着手, 因为 rRNA 分子较小, 易于提取, 而且利用 rRNA 时可以得到更多的模板 (在有代谢活性的细胞内存在大量的 rDNA)。

有人通过对 *Staphylococcus*、*Coxiella*、*Rickettsia*、*Clostridium*、*Neisseria*、*Mycobacterium*、*Bilophila*、*Eubacterium*、*Fusobacterium*、*Lactobacillus*、及肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 成员 16S rRNA 的扩增来进行系统分类研究。Weisburg 等筛选了多种细菌的 16S rDNA 的扩增引物, 并以扩增的序列对具有高度传染性的病原菌进行系统发育和分类的研究, 不经过病原菌的培养, 降低了危险性<sup>[6]</sup>。

选择一些其它位点进行基因的克隆测序, 通过序列比较来分析属、种水平内的菌株的进化关系也是非常有用的, 如 Lawrence 等通过对 3-磷酸甘油酸脱氢酶和外膜蛋白 3A 的基因序列比较分析了一些肠道细菌的进化关系, 发现同属埃希氏菌属 (*Escherichia*) 的 5 种菌在系统发育上有很大差异<sup>[7]</sup>。

## 2.2 随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD) 分析

RAPD 技术又称随机引物多聚酶链式反应 (Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction, AP-PCR) 是 Williams 等与 Welsh 和 McClelland 于 1990 年分别同时创立的一种相同的 DNA 分子标记技术。它应用短的任意序列引物, 在非严格条件下进行 PCR, 结果基因组的许多位点同时得以扩增。一般应用凝胶电泳分析 PCR 产物, 并检测基因多个位点的多态性。由于 RAPD 技术具有快速简便通用性好, 对 DNA 的需要量小, 质量要求低等优点, 一经问世就受到了广泛的注意, 并被成功地用于动物、植物、人和微生物的遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、医学诊断、遗传图谱构建和系统学研究等。在分析生物间系统发育关系、分析突变以及亲缘关系鉴定等方面显示出卓越的功能, 一些表型上不能反映的遗传物质的细微变化都可以通过 RAPD 技术显示出来。突变通过 4 种途径影响 DNA “指纹谱”: (1) 改变引物退火的能力; (2) 改变一对引物间的距离; (3) 改变聚合酶的延伸能力; (4) 改变扩增靶点的相对数量。突变对于引物-模板相互作用的稳定性与动力学影响很难预测, 单个碱基的改变很可能对一个短引物的稳定性产生很大影响。因此, 以上 4 种突变都可以方便地通过 PCR 扩增而检测出来。

Espinasa 等通过对不同类生物的 AP-PCR 结果的分析认为: 可作为分子钟的一些 DNA 片段 (如 16S rDNA 等) 的进化速率在不同的生物体内是不相等的, 虽不能以 AP-PCR 结果差异率作为不同生物的共同生物 “计时钟”, 但在亲缘关系较近时 (如属或种内) RAPD 结果完全可以用来分析它们的进化关系以及用于种属鉴定<sup>[8]</sup>。Pujol 等比较了 RAPD、MLEE 和 Southern 杂交方法在鉴别高度相关的 *Candida albicans* 分离物并评价菌株内的微进化等方面的能力。结果表明 3 种方法均可用来分析菌株内的微进化, 而以 Ca3 为探针的杂交法的分析能力最强。Bert 等 RAPD 技术对 99 株已用 MLEE 分型的 *Streptococci* 的群 A、C、G、进行扩增分析, 显示出该技术的优越性<sup>[9]</sup>。Lehmann 等以 RAPD 技术鉴定 *Candida* 属菌株时, 发现该技术可将生理均一性的 *C. parapsilosis* 分成 3 个群, 而且菌株在长期保存过程中发生的一些突变也可通过 RAPD 的结果的差导来显

示<sup>[10]</sup>。

国内有人利用 RAPD 对白色念珠菌、淋球菌、水稻白叶枯病菌进行分型取得了很好的结果。该法对疾病的流行病学调查,尤其是对各病菌株自然疫源地与宿主来源的分析有重要意义,并对毒力株的鉴定抗药性及种系发育与基因组的复杂关系可提供一定参考依据。

Wang 等将 RAPD 技术和 MLEE 技术 (Multilocus enzyme electrophoresis) 在区分相关微生物中的应用进行了比较,结果说明 RAPD 结果与 MLEE 结果有良好的一致性,但前者在区分种内菌株时更灵敏,它可以检测到 MLEE 无法分辨的差异<sup>[11]</sup>。Brandt 等对 344 个 *Cryptococcus neoformans* 分离物以 MLEE 和 RAPD 技术分型进行了比较, RAPD 在某些 MLEE 电泳型中增强了分型的灵敏性,但在有些 MLEE 电泳型中灵敏性反而更低。然而,将 RAPD 和 MLEE 结合起来对测定菌株的地理源及菌株随时间变异的情况等很有用<sup>[12]</sup>。Sun 等对 33 株 *Elymus caninus* 的遗传多样性以同工酶、RAPD 和微卫星标记 (microsatellite marker) 技术进行了调查,结果发现同工酶与 RAPD 的距离模式间, RAPD 与微卫星距离模式间及同工酶与微卫星距离模式间的相关系数分别为 0.204、0.267、0.164。3 种方法在不同的水平上显示了 *Elymus caninus* 的高度遗传变异。他们还指出,地理隔离强烈地影响着种群的进化<sup>[13]</sup>。

Welsh 对几种基于 PCR 扩增的核酸指纹技术 (RAPD, RAP-PCR 和 DD 等) 在研究细胞老化和突变问题中的应用进行了综述<sup>[14]</sup>。Clark 对用 RAPD 技术估测核酸差异的前景进行了讨论,总结了以 RAPD 测定种群遗传参数的标准及限制条件<sup>[15]</sup>。

## 参 考 文 献

- [1] Sasser M, Smith D H. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol. 1987, 241.
- [2] Holmes B, Moss C W, Daneahvar M I. J. Clin. Microbiol., 1993, 31 (4): 1007 ~ 1008.
- [3] Pons J L, Combe M, Leluan G. FEMS Microbiol. lett, 1994, 121: 25 ~ 30.
- [4] Rodriguez E D E, Meeus J, Mallie M, et al. J Clin Microbiol, 1996, 34: 2559 ~ 2568.
- [5] Davies R L, Arkinsaw S, Selander R K. Microbiology, 1997, 143: 2841 ~ 2849.
- [6] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, et al. J Bacteriol., 1991, 173 (2): 697 ~ 703.
- [7] Lawrence J G, Ochman H, Hartl D L J. Gen. Microbiol, 1991, 137: 1911 ~ 1921
- [8] Espinasa L, Borowisky R. Mol Biol Evol., 1998, 15 (4): 406 ~ 414.
- [9] Bert F, Picard B, Branger C, et al. J. Med. Microbiol., 1996, 45 (4): 278 ~ 284.
- [10] Lehmann P F, Lin D, Lasker B A. J. Clin. Microbiol, 1992, 30 (12): 3249 ~ 3254.
- [11] Wang G, Whittam T S, Berg C M, et al. Nucleic Acids Research, 1993, 21 (25): 5930 ~ 5933.
- [12] Brandt M E, Hutwagner L C, Kuykendall R J, et al. J. Clin. Microbiol., 1995, 33: 1890 ~ 1895.
- [13] Sun G L, Diaz O, Salomon B, et al. Genome, 1999, 42 (3): 420 ~ 431.
- [14] Welsh J, Rampino N, McClelland M, et al. Mutat. Res, 1995, 338: 215 ~ 219.
- [15] Clark A G, Lanigan C M. Mol Biol Evol 1993, 5: 1096 ~ 1111.