

55株芽孢杆菌 16S rRNA 基因序列测定与系统发育学分析*

程 池 刘光全 李金霞 姚 粟

(中国工业微生物菌种保藏管理中心,中国食品发酵工业研究院,北京,100027)

摘 要 采用 16S rRNA 基因序列分析法对中国工业微生物菌种保藏管理中心(CCIC)保藏的 55 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)进行复核鉴定。菌株经纯化培养,以改良 CTAB 法提取总 DNA,采用细菌 16S rRNA 通用引物、TD-PCR 方法(touchdown-PCR)进行 16S rRNA 基因序列扩增,PCR 产物纯化后直接进行序列测定,序列经人工校对后用 Clustal X 进行比对分析,最后用 MEGA3.1 软件构建系统发育树。系统发育分析结果表明:55 株枯草芽孢杆菌中有 52 株菌种与原鉴定结果一致,有 3 株菌种与原鉴定结果存在差异,其中 2 株鉴定结果为巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*),另 1 株鉴定结果为地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)。

关键词 枯草芽孢杆菌,16S rRNA 基因,TD-PCR,序列分析,系统发育树

枯草芽孢杆菌是一种重要的工业微生物菌种,其应用历史可追溯到一千多年前,日本在平安时代(794~1192 年)就开始利用枯草芽孢杆菌采用固态发酵的方法生产纳豆,开创了利用枯草芽孢杆菌的历史^[1]。枯草芽孢杆菌也是最早被研究的模式生物之一,1835 年被命名为“*Vibrio subtilis*”,1872 年正式更名为“*Bacillus subtilis*”^[2],并一直延续使用至今。枯草芽孢杆菌具有生长速度快,代谢产物丰富,可利用开发价值高以及食用安全等显著优点,在过去的一百多年中,其在发酵工业、农业生物防治、医药生产、环境保护、饲料添加剂、保健食品、能源开发、工程菌等方面的应用有了长足的进步和发展,国家农业部 1999 年将枯草芽孢杆菌列入《允许使用的饲料添加剂品种目录》。近年来,分子生物学手段和技术的发展使得枯草芽孢杆菌的研究利用进入了新时期,第 1 株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*

str. 168)全基因组序列测定由法国巴黎巴斯德研究所的 Bolotin 等人于 1997 年完成,该基因组序列全长 4.2 M bp,G C 含量为 43%,包含了 4 100 个编码基因,共有 5 个 16S rRNA 基因拷贝^[2]。

本研究采用 16S rRNA 基因序列分析法对 CICC 保藏的 55 株枯草芽孢杆菌进行了复核鉴定。系统发育学分析结果表明,有 52 株菌种与原鉴定结果一致,3 株菌种与原鉴定结果存在差异,其中 2 株属于巨大芽孢杆菌(*B. megaterium*)、1 株属于地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*)。

1 材料与方法

1.1 实验菌株

实验所用菌株共 55 株,均为 CICC 保藏^[4]。各菌株相关信息如表 1 所示。

表 1 实验所用菌株

序号	菌株编号 (CICC)	平台资源号	收藏时间 /年	来源历史	具体用途
1	9011	1511C0005000001518	1954	←金培松分离	用于麻发酵
2	10002	1511C0005000001523	1953	←美国引进	链霉素鉴定菌
3	10025	1511C0005000001538	1959	←茅台酒厂(茅 B12)	产 2,3-丁二醇
4	10026	1511C0005000001539	1959	←茅台酒厂(茅 B17)	产 2,3-丁二醇
5	10027	1511C0005000001540	1959	←中科院微生物研究所	用于纺织脱浆
6	10028	1511C0005000001541	1959	←第一轻工业部发酵工业科学研究所分离	淀粉液化
7	10033	1511C0005000001545	1963	←中科院微生物研究所	产 α-淀粉酶
8	10034	1511C0005000001546	1963	←中科院微生物研究所	产 α-淀粉酶
9	10035	1511C0005000001547	1963	←第一轻工业部发酵工业科学研究所分离	淀粉液化,产蛋白酶

第一作者:学士,教授级高工。

* 国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21204)

收稿日期:2006-08-04

续表 1

序号	菌株编号 (CICC)	平台资源号	收藏时间 /年	来源历史	具体用途
10	10036	1511C0005000001548	1963	←第一轻工业部发酵工业科学研究所分离	淀粉液化,产蛋白酶
11	10044	1511C0005000001556	1965	←第一轻工业部发酵工业科学研究所分离	产谷氨酸
12	10048	1511C0005000001560	1965	←第一轻工业部发酵工业科学研究所分离	产谷氨酸
13	10055	1511C0005000001567	1965	←第一轻工业部发酵工业科学研究所分离	产谷氨酸
14	10063	1511C0005000001574	1970	←北京啤酒厂←中科院微生物研究所	产蛋白酶
15	10066	1511C0005000001577	1970	←莫湘筠交来	产淀粉酶
16	10071	1511C0005000001582	1970	←浙江轻工业研究所	产蛋白酶
17	10073	1511C0005000001584	1979	←中科院微生物研究所(Q12)	产蛋白酶
18	10074	1511C0005000001585	1979	←中科院微生物研究所(BF-7658)	产 α -淀粉酶
19	10075	1511C0005000001586	1979	←中科院微生物研究所(GT32)	产蛋白酶
20	10076	1511C0005000001587	1979	←四川食品发酵研究设计院 ←湖南麻类研究所选育	苧麻脱胶
21	10077	1511C0005000001588	1979	←四川食品发酵研究设计院 ←株洲苧麻厂分离	苧麻脱胶
22	10078	1511C0005000001589	1979	←四川食品发酵研究设计院 ←北京光华木材厂分离	苧麻脱胶
23	10079	1511C0005000001590	1979	←天津工业微生物研究所选育(TUD-127)	产 α -淀粉酶
24	10080	1511C0005000001591	1979	←无锡酶制剂厂	产 α -淀粉酶
25	10081	1511C0005000001592	1979	←无锡酶制剂厂选育	产中性蛋白酶
26	10082	1511C0005000001593	1979	←上海工业微生物研究所(B60) ←上海肌苷协作组选育	产肌苷
27	10083	1511C0005000001594	1979	←上海肌苷协作组选育	产肌苷
28	10088	1511C0005000001599	1979	←上海工业微生物研究所(B47)	产半纤维素酶
29	10089	1511C0005000001600	1979	←上海工业微生物研究所(B48)	产半纤维素酶
30	10090	1511C0005000001601	1979	←上海工业微生物研究所(B49)	分解半纤维素
31	10147	1511C0005000001657	1979	←上海工业微生物研究所(B140) ←何方←美国	生产耐温淀粉酶
32	10148	1511C0005000001658	1979	←上海工业微生物研究所 ←无锡轻工业学院	研究
33	10149	1511C0005000001659	1979	←上海工业微生物研究所(B76) ←上海味精厂	产肌苷酸
34	10150	1511C0005000001660	1979	←无锡轻工业学院	研究
35	10151	1511C0005000001661	1979	←上海工业微生物研究所(B78) ←上海味精厂	生产肌苷酸
36	10152	1511C0005000001662	1979	←无锡轻工业学院	研究
37	10153	1511C0005000001663	1979	←上海工业微生物研究所(B8) ←中科院微生物研究所	生产淀粉酶
38	10154	1511C0005000001664	1979	←无锡轻工业学院	研究
39	10155	1511C0005000001665	1979	←无锡轻工业学院	研究
40	10156	1511C0005000001666	1979	←上海工业微生物研究所(B61) ←上海味精厂	生产肌苷酸
41	10157	1511C0005000001667	1979	←上海工业微生物研究所(B155) ←何方←美国 ATCC	生产耐温淀粉酶
42	10158	1511C0005000001668	1979	←无锡轻工业学院	研究
43	10159	1511C0005000001669	1979	←上海工业微生物研究所(B77) ←上海味精厂	生产肌苷酸
44	10160	1511C0005000001670	1979	←上海工业微生物研究所(B31) ←上海新型发酵厂←中科院微生物所	生产中性蛋白酶
45	10161	1511C0005000001671	1979	←无锡轻工业学院	研究
46	10162	1511C0005000001672	1979	←上海工业微生物研究所(B74) ←上海味精厂	生产肌苷酸
47	10163	1511C0005000001673	1979	←无锡轻工业学院	生产中性蛋白酶

续表 1

序号	菌株编号 (CICC)	平台资源号	收藏时间 /年	来源历史	具体用途
48	10164	1511C0005000001674	1979	←上海工业微生物研究所 ←无锡轻工业学院	研究
49	10165	1511C0005000001675	1979	←上海工业微生物研究所(B75) ←上海味精厂	生产肌苷酸
50	10166	1511C0005000001676	1979	←四川食品发酵工业研究设计院(1263)	研究
51	10167	1511C0005000001677	1979	←四川食品发酵工业研究设计院(1264) ←四川珙县	研究
52	10200	1511C0005000001706	1979	←上海工业微生物研究所(B154)←何方	生产耐温淀粉酶
53	10210	1511C0005000001716	1979	←四川食品发酵工业研究设计院(1.198)	产脂肪酶
54	10264	1511C0005000001769	2001	←国内收集	生产用菌株,产 α -淀粉酶(BF-7658)
55	10265	1511C0005000001770	2001	←国内收集	生产用菌株,产中性蛋白酶(1398)

1.2 试剂

Taq 酶、dNTP、DNA marker(购自天为时代生物有限公司),GoldView(购自北京塞百盛基因技术有限公司),溶菌酶、蛋白酶 K、CTAB、SDS(购自北京华绿渊生物技术发展公司)。

1.3 TD-PCR 引物

16S rRNA 基因序列扩增引物由上海生物工程有限公司合成,引物序列如下:

正向引物 27F: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3';

反向引物 1541R: 5'-AAG GAG GTG ATC CAC CC-3'^[5]。

1.4 菌体培养

将冻干保藏的菌种复状培养后,在平板上划线分离,培养 20 h 后挑取单菌落接种到 20 mL 液体培养基中,30℃ 200 rpm 培养 15 h。

1.5 基因组 DNA 提取

基因组 DNA 提取参照文献[6]。

1.6 TD-PCR 扩增^[7]

TD-PCR 反应条件:

95℃ for 5 min; 95℃ for 1 min, 58℃ for 1 min, -0.5℃/cycle, 72℃ for 1 min, 20 cycles; 72℃ for 5 min; 94℃ for 1 min, 48℃ for 1 min, 72℃ for 1 min, 15 cycles; 72℃ for 5 min; 4℃ save, end。

反应体系为 100 μ L:

Taq(5 U/ μ L) 0.8 μ L; 10 \times PCR Buffer(Mg²⁺ Plus) 10 μ L; dNTP Mixture(2.5 mM/each) 8 μ L; 模板 DNA 2.5 ng; 引物 F1(10 μ mol/L) 2 μ L, 引物 R1(10 μ mol/L) 2 μ L; ddH₂O 补足到 100 μ L。

1.7 电泳检测

用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。显色剂为 Gold-View。

1.8 序列测定

纯化后的 PCR 产物采用 ABI3700 基因测序仪测序。测序工作由上海基康生物工程有限公司完成。

1.9 序列分析与系统树的构建^[8]

采用序列图谱软件 Chromas, 参照正、反向序列图谱, 对序列人工校对。从 GenBank 核酸序列数据库中下载芽孢杆菌属相关菌株的 16S rRNA 基因序列, 与所测的 55 株芽孢杆菌序列一起, 用 Clustal X 软件进行序列比对(alignment); 然后利用 MEGA3.1 生物学软件构建系统发育树, 采用 Neighbor-Joining 法进行系统发育分析, 并进行 1025 次重复的 Bootstraps 统计学检验。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取结果与分析

部分菌株 DNA 提取结果见图 1, 所提取的 DNA 片段大于 23 kb, 满足 PCR 扩增的需求。

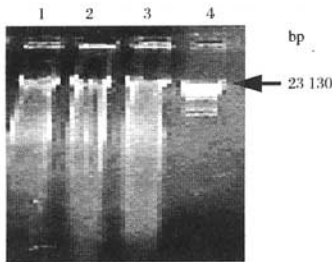
2.2 TD-PCR 扩增结果

提取的基因组 DNA 稀释 50~100 倍后用作 PCR 扩增的模板, 采用降落 PCR(TD-PCR) 扩增细菌 16S rRNA 基因序列。部分菌株的 16S rRNA 基因扩增结果见图 2, 其中 PCR 产物上样量为 4 μ L, DNA Marker 上样量为 6 μ L, 如图 2 所示, 在 1500 bp 处有一条特异性条带, 与目的条带大小一致。

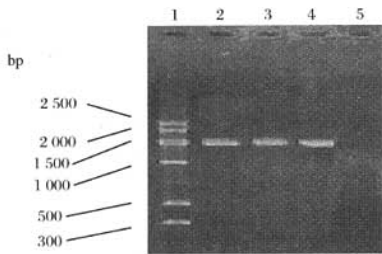
2.3 序列比对与系统演化分析

通过与芽孢杆菌属内相关菌株序列比对分析, 发现菌株 CICC 10044 和 CICC 10055 与 B.

megaterium 同源性均在 99.9% 以上,与 *B. subtilis* 同源性在 93.3% 以下; CICC 10157 与 *B. licheniformis* 同源性在 99.7% 以上,与 *B. subtilis* 在 95.2% 以下; 52 株 *B. subtilis* 的同源性都在 99.7% 以上。



1 - CICC 10157, 2 - CICC 10044,
3 - CICC 10055, 4 - λ DNA/EcoR I Marker
图 1 部分菌株基因组 DNA 电泳图



1 - Marker VII, 2 - CICC 10157, 3 - CICC 10044,
4 - CICC 10055, 5 - ddH₂O
图 2 部分 PCR 产物电泳图

以肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 为外群的 16S rRNA 基因序列系统发育树, 55 个芽孢杆菌的菌株形成 3 个主要分枝: CICC 10044、CICC 10055 和 *B. megaterium* 形成一个较远的分支; CICC 10157 和 *B. licheniformis* 形成一个独立的分支; 52 株 *B. subtilis* 聚在一起形成了一个分支。以上结果表明菌株 CICC 10044、CICC 10055 为巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*), CICC 10157 (*B. licheniformis*) 为地衣芽孢杆菌。

3 讨论

16S rRNA 基因序列的系统发育分析是细菌分类和鉴定的重要手段, 目前已被广泛应用于细菌分类学和系统学研究。论文中采用 TD-PCR 程序, 设定一系列降温的退火温度, 退火温度跨度范围为 10℃ 左右, 从高于估计 T_m 值几个摄氏度到低于 T_m 值 5℃ 左右, 这样既能一步自动找到最佳退火温度, 又

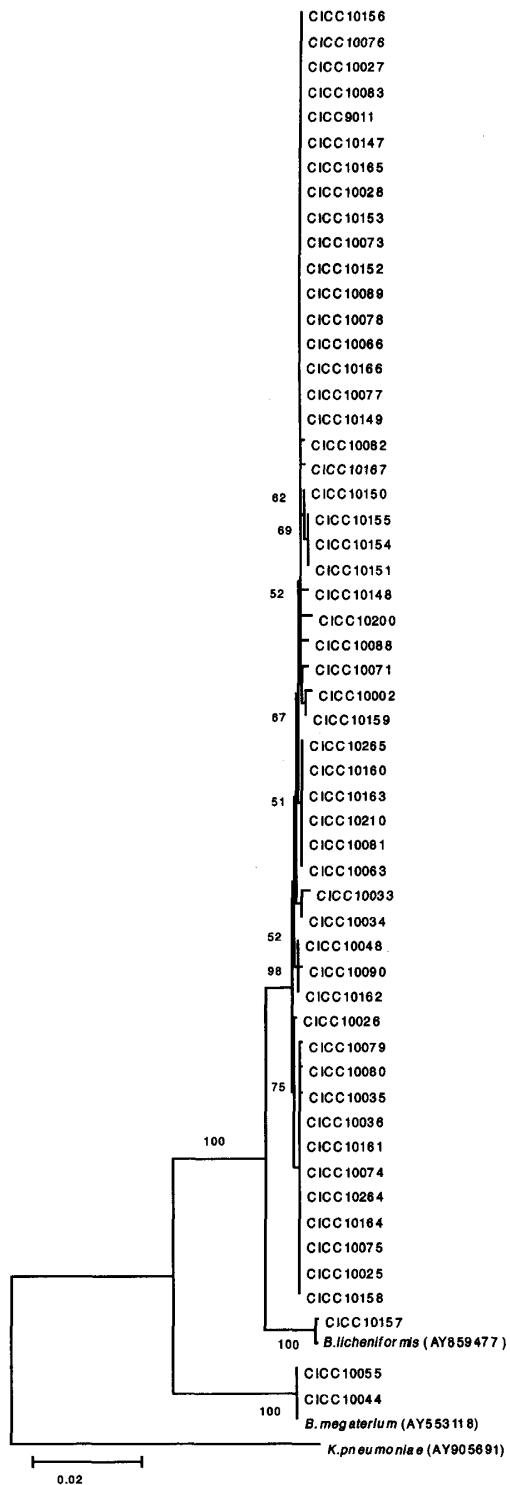


图 3 55 株芽孢杆菌与相关菌株的
16S rRNA 基因序列系统发育树
(标尺表示 2% 的序列差异; 分支上的数据表示 Bootstrap 值。)

能提高目的产物的特异性,当目的扩增产物和非目的扩增的产物的 T_m 值相差无几时,也可以避免出现假阳性,可以大大提高菌种鉴定的工作效率^[7]。

通过与原始鉴定资料进行核对,发现 CICC 10044、CICC 10055、CICC 10157 三个菌株生理生化特征与枯草芽孢杆菌很接近,但系统发育分析表明,菌株 CICC 10044、CICC 10055 与巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*) 聚为一群,序列同源性为 99.9%;CICC 10157 与地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) 聚为一群,序列同源性为 99.7%;另 52 株芽孢杆菌与 *B. subtilis* 聚为一群,同源性大于 99.7%。通常认为菌株间 16S rRNA 基因序列同源性大于 97% 很可能属于同一个种^[9],由于 *B. subtilis* 与 *B. licheniformis* 的模式种同源性在 97.6%,所以建议在鉴定区分 *B. subtilis* 与 *B. licheniformis* 的种间差异时,其序列同源性应大于 99.7% 以上。我们进一步采用 BIOLOG 微生物自动鉴定系统(4.2)对与原鉴定结果不符的 3 个菌株进行鉴定分析,结果与 16S rRNA 基因序列分析结果完全一致(资料未发表)。

通过本次复核鉴定表明,传统鉴定方法对于芽孢杆菌属的鉴定存在一些缺陷,特别是对于培养形态和生理生化特征极为相似的菌株难以区分。利用 16S rRNA 基因序列测定与系统发育分析可以快捷、准确的鉴定区分枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)、地衣芽孢杆

菌 (*B. licheniformis*) 和巨大芽孢杆菌 (*B. megaterium*)。

参 考 文 献

- 1 李 鼎. 纳豆神奇食品[J]. 上海调味品, 2004(4):28
- 2 Bolotin A, Borchert S. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* [J]. Nature, 1997, 390(6 657):249~256
- 3 Marcus Schallmeyer, Ajay Singh, Owen P Ward. Developments in the Use of *Bacillus Species* for Industrial Production[J]. Canadian Journal of Microbiology, 2004, 50(1):1~17
- 4 中国工业微生物菌种保藏中心. 中国工业微生物菌种目录[J]. 食品与发酵工业(增刊), 2001, 27:4~5
- 5 周 煜. 16S rRNA 序列分析法在医学微生物鉴定中的应用[J]. 生物技术通讯, 1999 (10):297~305
- 6 Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria. Preparation of genomic from bacteria[A]. In Ausubel FM, Bent R(eds). Current protocols in molecular biology[C]. New York, (NY.): J Wiley & Sons, 1987
- 7 C.W. 迪芬巴赫, G.S. 德维克斯勒. PCR 技术试验指南[M]. 北京:科学出版社, 2003.34~36
- 8 蒋 彦, 王小行. 基础生物信息学及应用[M]. 北京:清华大学出版社, 2003.64~74
- 9 Stackebrandt E, Goebel B M. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology[J]. Int J Syst Bacteriol, 1994, 44: 842~849

Identification of 55 *Bacillus* Strains by Phylogenetic Analysis of 16S rRNA Gene Sequence

Cheng Chi Liu Guangquan Li Jinxia Yao Su

(CICC, China National Research Institute of Food and Fermentation Industries, Beijing 100027, China)

ABSTRACT We identified 55 *Bacillus* strains from China Center of Industrial Culture Collection (CICC) by 16S rRNA gene sequence analysis. The genomic DNA was isolated and purified with the improved CTAB methods. The sequences of 16S rRNA gene were amplified by TD-PCR with the bacterium universal primers and the purified PCR products were directly sequenced. The corrected sequences were aligned with Clustal X and the phylogenetic tree was constructed by MEGA3.1. 52 strains support the original identification results, 2 strains belong to *Bacillus megaterium*, and the other one belongs to *Bacillus lecheniformis* using the phylogenetic analysis.

Key words *Bacillus subtilis*, 16S rRNA gene, TD-PCR, Gene sequence analysis, Phylogenetic tree