细菌聚类新方法: ddT 聚类技术分析香根草联合固氮菌多样性

赵现伟^{①*}, 彭桂香^{②*}, 张志英^①, 邱永雄^①, 张泽民^①, 张桂权^①, 谭志远^{①†}

① 华南农业大学农学院, 广东省植物分子育种重点实验室, 广州 510642;

② 华南农业大学资源环境学院, 广州 510642

* 同等贡献

† 联系人, E-mail: zytan@scau.edu.cn

2009-07-13 收稿, 2009-09-30 接受

国家自然科学基金(批准号: 30470002, 30770001)、教育部新世纪优秀人才支持项目(批准号: NCET-07-0315)和广东省番禺区科技攻关项目基金资助

摘要 利用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 采用新型遗传分析仪 Li-COR 4300L, 结合测序的双脱氧链终止法原理, 建立了基于 16S rDNA 序列 T 碱基分布特征的一种新的细菌多样性聚类技术——ddT 聚类技术. 应用该新的 ddT 聚类技术对分离自香根草的 47 株联合固氮菌多样性进行了聚类分析, 获得了 6 个不同的主要类群, 表明香根草联合固氮菌具有较大的遗传资源多样性. 应用 SDS-PAGE 全细胞蛋白质电泳和 DNA 指纹图谱方法对该聚类结果进行验证, 结果表明, 该新聚类技术可以应用于细菌的多样性聚类分析. 16S rDNA 序列测定和系统发育分析表明, 供试的联合固氮菌分别与 γ -变形杆菌纲(γ -proteobacteria)的阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*), *Enterobacter ludwigii*, *Pantoea ananatis*, 恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*), 荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和 β -变形杆菌(β -proteobacteria)的中型假食酸菌(*Pseudacidovorax intermedius*), *Mitsuaria chitosanitabida*, 越南伯克氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*), 佛莱辛草螺菌(*Herbaspirillum frisingense*)亲缘关系相近, 其中肠杆菌属、伯克氏菌属和泛菌属是香根草联合固氮菌的优势类群, 分别占分离菌株总数的 45%, 19%和 13%, 它们一起构成了分离菌株总数的 77%.

关键词

ddT 聚类
SDS-PAGE
DNA 指纹图谱
香根草
联合固氮菌

人类对微生物世界的认识和应用非常有限, 已认识的种类不到自然界总微生物种类的 1%, 即使对于容易培养的细菌, 认识也不到总细菌种类的 5%^[1]. 造成这种状况的主要原因是微生物研究方法的局限性. 为更好地开发利用环境微生物资源, 国内外的微生物学家一直在探索着新的微生物物种和类群.

细菌是微生物资源的重要组成部分, 具有个体微小、物种繁多、繁殖快、分布广等特点, 因此细菌分类在研究细菌的过程中就显得十分重要. 按照传统分类方法, 王春霞等人^[2]及赵秀云等人^[3]根据形

态、培养特征以及生理生化特性等分别对不同的几株细菌进行了鉴定. 1986 年, 陈文新等人^[4]探讨了数值分类在根瘤菌中的应用, 之后数值分类也广泛用于对细菌的分类研究中^[5,6]. 细菌的蛋白质具有高度的保守性, 对蛋白质的组成成份进行分析, 可以反映生物间的相互关系. 通过全细胞蛋白电泳, 可将细菌细胞中的各种蛋白组分进行分离并对电泳图谱进行聚类分析^[7].

随着现代分子生物学理论和技术的迅速发展, 细菌的分类和鉴定有了很大的发展, 产生了许多新的分类方法. 这些方法主要是对细菌染色体进行直

英文引用格式: Zhao X W, Peng G X, Zhang Z Y, et al. A novel grouping method: ddT clustering assessment of the diversity of associated nitrogen-fixing bacteria isolated from *Vetiveria zizanioides* (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 562~571, doi: 10.1360/972009-1546

接的 DNA 分析或对染色体外的 DNA 片段进行分析, 从分子水平进行分类与鉴定. 利用插入序列指纹图谱多样性, 采用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 可以清晰区分 IS-PCR 指纹图谱类型^[8]. 16S rDNA 片段在生物进化过程中变化率较低, 可以提供足够的遗传信息, 而且其序列变化速度与进化距离相适应. 目前, 16S rDNA 序列的相似性分析已成为现代微生物学分子鉴定手段之一^[9-11], 广泛地应用于细菌多样性分析^[12-14].

本文在高分辨率聚丙烯酰胺测序技术基础上, 采用新型遗传分析仪 Li-COR 4300L, 描述了基于 16S rDNA 序列 T 碱基分布特征, 建立了一种新的细菌多样性聚类技术, 并首次应用该技术对香根草联合固氮菌的多样性进行聚类分析. 通过全细胞蛋白质电泳技术、DNA 指纹图谱和数值分类方法对该新方法的聚类结果进行对比验证, 并选取一部分代表菌株进行 16S rDNA 全序列测定, 以检测该技术在细菌多样性上的应用.

1 材料与方法

(i) 材料. 供试的 47 株菌株为本实验室从香根

草中分离出的植物联合固氮菌, 菌株的名称、在 DN 培养基中是否产酸、固氮酶活性及分离部位见表 1.

(ii) 主要仪器及试剂. PCR 仪和离心机购自 Eppendorf 公司(德国); 遗传分析仪 Li-COR4300L 为 Li-COR 公司生产; 电泳仪购自 Bio-Rad 公司; 紫外成像仪为天能公司生产; 电泳槽为北京六一厂生产. Tris (Amresco)、EDTA- Na_2 (Genview)、Yeast Extract (酵母粉, Oxoid)、Peptone (蛋白胨, Oxoid)、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺(Genebase)为进口试剂, 其余试剂均为广州化学试剂厂生产.

(iii) 培养基及测序胶成分. VM-Ethanol 培养基 (1 L): Döbereiner-basic, 10 mL; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_3$ -EDTA (0.66%), 1 mL; 酵母膏, 1.0 g; 蛋白胨, 3.0 g; 氯化铵, 0.5 g; 氯化钠, 1.0 g; 磷酸钾缓冲液, 3.0 mL (分开灭菌); 无水乙醇, 6.0 mL (分开过滤灭菌). 其中 Döbereiner-basic (1 L): 硫酸镁, 20 g; 氯化钠, 10 g; 钼酸钠, 0.2 g; 硫酸锰, 10 g; 氯化钙, 2.64 g (分开灭菌).

测序胶成分: 尿素(Urea), 16.8 g; 30%丙烯酰胺母液, 5 mL; 10×TBE (Tris 107.8 g, 硼酸 55.0 g, EDTA- Na_2 7.44 g, pH 8.3), 4 mL; TEMED, 26.5 μL ; 10% APS, 265 μL ; 加蒸馏水至重量 45 g (抽真空).

表 1 供试菌株名称、固氮酶活性及分离部位

菌株名称	是否产酸	固氮酶活性(24 h) ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_2/\text{mL}$)	分离部位	菌株名称	是否产酸	固氮酶活性(24 h) ($\mu\text{mol C}_2\text{H}_2/\text{mL}$)	分离部位
xs1	否	0.42	茎	xr12	是	19.98	根
xs21	是	2.06	茎	xr21	是	19.64	根
xs22	是	1.45	茎	xr22	是	30.78	根
xs31	是	0.56	茎	xr31	是	29.99	根
xs41	否	6.23	茎	xr32	是	13.04	根
xs42	否	1.53	茎	xr41	是	19.60	根
xs5	否	9.09	茎	xr42	是	13.82	根
xs71	否	1.73	茎	xs100	是	2.42	茎
xs72	是	2.39	茎	xs2	是	1.11	茎
xs73	是	1.14	茎	xs311	是	5.32	茎
xs11	否	3.34	茎	xs312	是	2.61	茎
xs210	否	3.44	茎	xs321	是	4.51	茎
xs310	否	0.76	茎	xs322	是	1.60	茎
xs43	否	3.51	茎	xs33	是	3.68	茎
xs441	否	2.08	茎	xs411	是	27.78	茎
xs442	否	1.39	茎	xs421	是	12.90	茎
xs521	是	2.35	茎	xs422	是	27.57	茎
xs110	是	11.67	茎	xs423	是	21.93	茎
xs12	是	7.66	茎	xs51	是	30.92	茎
xs313	是	12.79	茎	xs52	是	21.36	茎
xs32	是	16.37	茎	xs61	是	0.48	茎
xs410	是	2.61	茎	xs62	是	0.65	茎
xs420	是	1.01	茎	xs424	是	25.73	茎
xr11	是	33.84	根				

(iv) ddT 碱基聚类技术

(1) 细菌总 DNA 的提取. 采取小量法提取细菌总 DNA: 将供试菌株培养至对数生长期时收集菌体, 37℃溶菌酶破壁 30 min, 再加入 1.5 倍体积的十二烷基肌氨酸钠(TE 溶解, 5%浓度) 60℃保温 0.5 h, 酚/氯仿/异戊醇抽提, 异丙醇沉淀, 70%乙醇洗涤, 最后溶解在 50 μL TE (pH 8.0)中, 储存于-20℃冰箱中备用.

(2) 热裂解法提取 DNA 及 16S rDNA 扩增. 供试菌株经 VM 平板活化后, 用无菌牙签挑取适当菌体加入低盐 PCR 缓冲液中, 混匀, 100℃加热 15~30 min, 8000 r/min, 离心 3 min 取上清液 5 μL 直接做 16S rDNA 扩增. 16S rDNA 采用通用引物 25f (5'-AACTKAAGAGTTTGATCCTGGCTC-3')和 1492r (5'-TACGG(C/T)TACCTTGTACGACTT-3') 进行扩增^[15]. PCR 反应体系为 50.0 μL: 10×PCR 缓冲液 5.0 μL (热裂解上清液, 含有细菌 DNA), 10 mmol/L dNTPs 1.0 μL, 引物 25f (50.0 μmol/L)和 1492r (50.0 μmol/L)各 0.5 μL, ddH₂O 41.0 μL, *Taq* 聚合酶(3 U/μL) 1.0 μL. PCR 反应条件为 97℃预变性 3 min, 97℃变性 50 s, 56℃退火 45 s, 72℃延伸 90 s, 共进行 35 个循环, 最后 72℃延伸 5 min, 反应完成后用 1%的琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 4℃保存待用.

(3) 热裂解无法获得 DNA 菌株的 16S rDNA 扩增方法. 对于无法通过热裂解法提取 DNA 的菌株可以采用上述小量法提取 DNA, 然后再做 16S rDNA 扩增, 方法同上, 但 PCR 反应体系为 25.0 μL: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL (不含菌株 DNA), 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, 引物 25f (50.0 μmol/L)和 1492r (50.0 μmol/L)各 0.25 μL, ddH₂O 20.5 μL, 模板 DNA 0.5 μL, *Taq* 聚合酶(3 U/μL) 0.5 μL. 反应完成后用 1%的琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 4℃保存待用.

(4) 16S rDNA 产物纯化. 在 16S rDNA PCR 产物中加入 0.2 μL 的核酸外切酶(*Exo* I, 20 U/μL)和 0.5 μL 的碱性磷酸酶(CIAP, 1 U/μL), 混匀后放入 PCR 仪进行 PCR 产物纯化反应: 37℃, 20 min; 80℃, 20 min; 4℃保存. 将该酶切产物加入 0.025 μm 的 MF 混合纤维素酯滤膜(Millipore)透析 15~20 min, 后转入一新的 PCR 试管中, 4℃保存待用.

(5) ddT 碱基聚类反应. ddT 碱基聚类 PCR 反应体系为 10×PCR 缓冲液 0.25 μL, ddT/dTTP Mix 0.5 μL (4 mmol/L dATP 6.5 μL, 4 mmol/L dCTP 8 μL, 4

mmol/L dGTP 4.0 μL, 4 mmol/L dTTP 2.5 μL, 5 mmol/L ddTTP 4 μL, 超纯水 7 μL, 合计 32.0 μL), 引物 342f₈ (5'-CTCCTACGGGAGGCAGCAG-3', IRDye 800 荧光标记, 1.0 pmol) 0.2 μL, ddH₂O 1.55 μL, 纯化后的模板 DNA 1.0 μL; PCR 反应条件为 97℃预变性 3 min, 97℃变性 30 s, 60℃复性 30 s, 25 个循环, 最后 72℃延伸 5 min, 反应结束后加入 1.5 μL 的 Stopping solution (甲酰胺, 95%; 10 mmol/L EDTA-Na₂; 碱性品红, 0.1%; 加入蔗糖至饱和), 即可点样.

(6) 电泳分析. 遗传分析仪 Li-COR 4300L 预电泳条件为 3000 V, 30 mA, 75 W, 45℃, 30 min. 预电泳完成后, 开始点样, 进行 16S rDNA 产物 ddT 碱基的多态性分析, 电泳条件为 3000 V, 30 mA, 75 W, 45℃, 10 h. 电泳结束后, 通过软件 GIS3.74 凝胶图像处理系统对结果进行处理, 根据对应条带的有无, 转换为 1 和 0, 用 TREECONW 软件进行 UPGMA 聚类分析.

(v) DNA 指纹图谱分析. 采用 Insertion Sequence-based PCR (IS-PCR) DNA 指纹图谱方法^[16], 根据王春连等人^[17]的研究成果, 选用单引物 J3 (5'-GCTCAGGTCAGGTGGCCTGG-3')为引物, PCR 反应体系为 25 μL: 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, J3 (50.0 μmol/L) 0.25 μL, ddH₂O 20.75 μL, 模板 DNA (30 ng/μL) 0.5 μL, *Taq* 聚合酶(3 U/μL) 0.5 μL. PCR 反应条件参照文献[18]. 反应完成后用 1%的琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 进一步用高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 紫外成像仪观察照相, 得到指纹图谱, 进行类群分析.

(vi) SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳. 用预称重的 1.5 mL Eppendorf 离心管离心收集菌体(对数生长期), 称其重量, 并用样品缓冲液裂解细胞, 使其浓度达到 150 mg/mL, 将样品在 95℃下加热 10 min 后, 8000 r/min 离心 2 min, 放入-20℃冰箱中待用. 采用 DY CZ-24D 双垂直电泳槽, 12%的分离胶, 5%的浓缩胶. 电泳时, 先用 60 V 电压走样, 待溴酚兰指示剂到达分离胶前沿, 改用 28 mA(稳流), 视其指示剂到达胶的底端 0.5 cm 处时停止电泳. 电泳结束后染色、脱色, 紫外成像仪上照相观察(Tanon GIS-2008), 用 Tanon 软件进行聚类分析. 溶液的配方及具体操作见参考文献[19,20].

(vii) 16S rDNA 全序列测定. 16S rDNA 扩增、检测以及 PCR 产物纯化同上述方法. 16S rDNA 序列采用 Sanger 双脱氧终止法^[21], 遗传分析仪 Li-COR-

4300L 进行电泳测定, 所用引物为 35f (5'-TGATCMT GGCTCAGATTGAACG-3', IRDye 700 荧光标记)和 1492r (IRDye 800 荧光标记). 测序电泳完成后, 用 Li-COR 4300L 的序列分析软件 e-Seq 进行序列分析, 将所测菌株的 DNA 序列在 GenBank 数据库中进行比对, 找到最大相似性且已经公开发表的菌株, 再用软件 GeneDoc 进行格式转换和人工比对, 最后用 TREECONW 软件采用邻近法聚类分析构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 ddT 碱基聚类分析

ddT 碱基聚类的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 1. 按照 ddT 碱基序列分布相同的菌株聚为一个类群的标准, 对 ddT 碱基聚类的电泳图进行条带配对得到同源性分析表, 再通过 TREECON 软件进行 UPGMA 聚类分析, 结果见图 2. 由图 2 可知, 在 80%以上的水平上共得到 6 个不同的类群和 4 个单菌株.

结合图 1 和图 2 的结果可知, xs11, xs210, xs41 和 xs71 为单个菌株; 菌株 xr11, xr12, xr21, xr22, xr31, xr32, xr41, xr42, xs411, xs421, xs422, xs423, xs51, xs52 和 xs424 聚为类群 I; 菌株 xs410, xs420, xs100, xs2, xs61 和 xs62 聚为类群 II; 菌株 xs43, xs441, xs442 聚为类群 III; 菌株 xs21, xs22, xs31, xs72, xs73 和 xs521 聚为类群 IV; 菌株 xs110, xs12, xs313, xs32, xs311, xs312, xs321, xs322 和 xs33 聚为类群 V. 图 1 中菌株 xs42 的 T 碱基序列分布和 xs1, xs5, xs310 有点不同, 但图 2 中, 在 80%的水平上聚为一类, 因此菌株 xs1, xs5, xs42 和 xs310 聚为类群 VI.

2.2 DNA 指纹图谱聚类

以 J3 为引物扩增 IS-PCR DNA 指纹图谱, 对 ddT 聚类的结果进行验证, 结果见图 3. 由图 3 可知, 供试的 47 个菌株也被分为 6 个类群, 各类群内的菌株指纹条带具有很好的一致性, 它们分别构成相应的类群, 与 ddT 聚类结果一致, 在 DNA 指纹图谱水平上证明了 ddT 聚类技术的准确性和可靠性.

2.3 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类

根据蛋白条带的有无, 采用天能软件 GIS3.74 凝胶图像处理系统将条带转化为 0 和 1, 进行条带配对

得到同源分析表, 再通过 TREECON 软件, 以类平均连锁法(UPGMA)对全细胞蛋白电泳结果进行聚类分析, 结果见图 4. 以相似性 79%为界, 将 47 株供试菌株分为 6 个类群和 4 个单菌株. 全细胞蛋白电泳的聚类结果和 ddT 聚类结果一致, 从全细胞蛋白质水平也证明了 ddT 聚类技术的准确性和可靠性.

2.4 16S rDNA 序列分析

根据 ddT 聚类技术、DNA 指纹图谱、全细胞蛋白电泳的聚类结果, 选取部分代表菌株进行 16S rDNA 全序列测定, 类群 I~IV 代表菌株 xr41, xs100, xs43, xs72, xs322, xs1 与 xs42 的 16S rDNA 序列在 GenBank 的索取号分别为 GQ984162, GQ984168, GQ984166, GQ984171, GQ984169, GQ984164, GQ984170; 单菌株 xs11, xs210, xs71 的 16S rDNA 序列在 GenBank 的索取号分别为 GQ984163, GQ984165, GQ984167. 将所测序列在 GenBank 数据库中搜索同源性序列, 找到最大相似性且已经公开发表的菌株, 类群 I (xr41)与阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*) 97%的相似性、类群 II (xs100)与 *Enterobacter ludwigii* 99%的相似性、类群 III (xs43)与荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) 99%的相似性、类群 IV (xs72)与 *Pantoea ananatis* 99%的相似性、类群 V (xs322)与越南伯克氏菌(*Burkholderia vietnamiensis*) 99%的相似性、类群 VI (xs1 与 xs42)与佛莱辛草螺菌(*Herbaspirillum frisingense*) 99%的相似性. 单菌株 xs11, xs210, xs71 的 16S rDNA 序列分别与 *Mitsuaria chitosanitabida*, 中型假食酸菌(*Pseudacid-ovorax intermedius*)以及恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的亲缘关系很近, 其相似性均为 99%以上. 以上结果可见, 香根草联合固氮菌具有较大的多样性, 其中肠杆菌属(占 45%)、伯克氏菌属(占 19%)、泛菌属(占 13%)是香根草联合固氮菌的优势类群, 它们一起构成了分离菌株总数的 77%.

采用邻近法聚类分析构建系统发育关系图, 结果见图 5. 由图 5 可知, 各代表菌株和各相似菌株均能归到相应的分支中. 其中代表菌株 xr41 的 16S rDNA 序列在 GenBank 数据库中和阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae* ATCC13047^T)的相似性为 97%, 在系统发育树中与其他已知种的距离较远, 有可能是一个新种, 但还需要进一步的实验验证. 类群 VI 的两个分支代表菌株 xs42 和 xs1 的序列结果高度相似,

图 1 基于 16S rDNA 序列 T 碱基分布特征而建立的一种新的 ddT 聚类技术凝胶电泳图

泳道 1~47 分别为菌株 xs1, xs21, xs22, xs31, xs41, xs42, xs5, xs71, xs72, xs73, xs11, xs210, xs310, xs43, xs441, xs442, xs521, xs110, xs12, xs313, xs32, xs410, xs420, xr11, xr12, xr21, xr22, xr31, xr32, xr41, xr42, xs100, xs2, xs311, xs312, xs321, xs322, xs33, xs411, xs421, xs422, xs423, xs51, xs52, xs61, xs62, xs424 的 16S rDNA 片段 T 碱基多态性图谱

图 2 供试菌株的 ddT 碱基聚类图(UPGMA)

属于草螺菌属的不同菌株, 前面聚类结果中 xs42 和 xs1, xs5, xs310 条带存在差别, 但仍聚为一类的结果可以在这里得到说明. 在图 5 中, 菌株 xs100 (类群 II, *Enterobacter ludwigii*)和 xr41(类群 I, 阴沟肠杆菌)聚在同一个分支中, 这和 ddT 聚类结果(图 2)中在 80%的水平上将类群 II 和类群 I 聚为一个类群的结果是一致的. 可见, T 碱基聚类方法不仅能用于对细菌进行聚类分析也能应用于细菌多样性分析.

3 结论与讨论

细菌分类的目的是为了更好地认识细菌的生理生化特性, 了解它们之间的亲缘关系, 为细菌资源的开发、利用、控制和改造提供理论根据. 蛋白质是基因表达的产物, 通过 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳, 可将细菌中各种蛋白质进行分离, 很多学者利用 SDS-

PAGE 对不同的菌株进行聚类, 谭志远等人^[20]利用 SDS-PAGE 对根瘤菌 3 个新类群进行了聚类分析, 王华荣等人^[22]采用全细胞蛋白电泳对从糖蜜草中分离到的内生固氮菌进行了聚类. 本文利用全细胞蛋白电泳将供试菌株进行了聚类分析, 结果和 ddT 聚类结果有较好的一致性, 从而在全细胞蛋白质水平上对 ddT 聚类技术进行了验证. 同时, 本实验还采用了 IS-PCR 指纹图谱和 16S rDNA 全序列对供试菌株进行了进一步的聚类分析, 从分子水平上对 ddT 聚类技术进行验证, 结果显示, DNA 指纹图谱聚类结果和 ddT 聚类结果一样, 16S rDNA 全序列测定的结果证明 ddT 聚类技术不仅适合用于对细菌进行聚类分析, 还可以用于多样性分析.

ddT 聚类技术是以双脱氧链终止法为理论基础, 在聚丙烯酰胺凝胶测序技术上建立起来的一种新的

图 3 供试菌株的 DNA 指纹图谱

细菌聚类技术, 该技术通过对细菌 16S rDNA 片段上 T 碱基序列分布特征进行分析, 在凝胶图像处理系统的辅助下进行条带配对得到同源性分析表, 再通过 TREECON 软件进行 UPGMA 聚类分析. 从图 1~5 可以看出, ddT 聚类技术和 DNA 指纹图谱、SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类分析、代表菌株的 16S rDNA 全序列测定的结果具有较好的一致性, 聚类结果可相互验证, 从而证明了 ddT 聚类技术的准确性和可靠性, 以及在细菌多样性上的应用价值.

ddT 聚类技术中所用的模板 DNA 是通过热裂解法直接裂解菌株取得, 有一些菌株无法通过高温的方法进行破壁, 我们发现, 通过适当延长加热裂解的时间能够提高菌株的裂解率, 从而提高实验效率. 一般加热裂解时间提高到 30 min, 菌株的裂解率可达

到 85% 左右, 对剩下的一些不能通过裂解法获得 DNA 的菌株可进行小量提取菌株 DNA. 对经过热裂解法和经过溶菌酶法小量提取的细菌总 DNA 进行 16S rDNA 扩增, 47 个供试菌株的 DNA 均扩增出了约 1.5 kb 的目的条带, 16S rDNA 扩增的成功率达到 100%. 然后用 16S rDNA 扩增的产物为模板进行 ddT 碱基聚类 PCR 反应, 通过遗传分析仪 Li-COR 4300L 的电泳分析可知 ddT 碱基聚类 PCR 反应的成功率也为 100%, 电泳较为稳定, 重复性较好. 而且 ddT 聚类技术还具有聚类速度快、检测数量大等特点, 因此更适合对数量多的样品进行聚类 and 多样性分析.

本实验选取了 16S rDNA 片段上的可变区域(对应 *E. coli* 16S rDNA 的第 350~1150 碱基区域)的 800 个碱基的 T 碱基指纹分布的多态性进行分析聚类,

图 4 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳聚类图(UPGMA)

这样可以尽可能多地显示菌株之间多样性。由于 16S rDNA 片段是细菌的保守序列，基于 16S rDNA 序列分析的方法如核糖体 DNA 扩增片段限制性内切酶分析(amplified ribosomal DNA restriction analysis, ARD-RA)等可在 16S rRNA 基因序列水平上区分细菌种的差异，并可用来估计分离物中最低限度的种数^[23]，因此以 T 碱基分布特征而建立的 16S rDNA ddT 聚类技术也可能只是在种以上的水平进行区分和聚类，如在本实验 ddT 聚类结果中，在 80%的水平上将类群 II (xs100, *Enterobacter ludwigii*)和类群 I (xr41, *Enterobacter cloacae*)聚为一个类群，而在系统发育关系图中菌株 xs100 和 xr41 仍然聚在同一个分支中。在相同 DNA 区域上的 A 碱基、C 碱基以及 G 碱基分布

特征也可以像 T 碱基一样能够对菌株进行聚类分析及多样性分析，菌株不一样，A/C/G/T 4 个碱基的分辨率可能有差异。如 2 个菌株的 16S rDNA 序列几乎一致，而只在 A 碱基上有少量差异，这时 C/G/T 碱基就不能区别开这 2 个菌株。就目前来说，还没有一种方法能够完美地区分开所有不同种类的菌株，这也就是在细菌分类中要采用多相分类的原因，但我们的描述提供了一种大量和较快速的细菌聚类方法，结合高分辨率的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术，可以区分单个碱基的差异。如果采用进化速率较快的基因间隔序列、*rpoB* 基因^[24]或其他相关基因片段例如 HSP60^[25]作为 ddT 聚类技术的分析对象，ddT 聚类结果可以在菌株间、亚种或种的水平上对细菌进行聚类。

图5 香根草联合固氮菌的系统发育关系图
括号中编号为16S rDNA在GenBank中的登录号

参考文献

- 王曙光. 环境微生物研究方法与应用. 北京: 化学工业出版社, 2008. 277
- 王春霞, 王道本, 周启. 棉花根际促生菌筛选菌株的分类鉴定. 华中农业大学学报, 1997, 16: 29—32
- 赵秀云, 韩素芬. 杨树根际固氮菌的分离、筛选和鉴定. 南京林业大学学报, 2000, 24: 17—20
- 陈文新, 骆传好. 根瘤菌数值分类方法探讨. 微生物学通报, 1986, 13: 133—141
- 谭志远, 朱铭莪, 程丽娟, 等. 黄土高原根瘤菌数值分类及 DNA-DNA 杂交. 微生物学报, 1995, 35: 223—228
- 龚明福, 韦革宏, 曹鹏. 新疆乌恰县豆科植物根瘤菌数值分类研究. 西北植物学报, 2007, 27: 121—125
- 许晓东, 陈文新. 天山根瘤菌(*Rhizobium tianshanense*)全细胞蛋白电泳和多位点酶电泳分析. 微生物学通报, 1996, 23: 131—134
- Weiner M, Dacko J, Osek J. Insertion element IS₃ PCR-based method for molecular analysis of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from suckling piglets with diarrhoea. Bull Vet Inst Pulawy, 2004, 48: 241—246
- 焦振泉, 刘秀梅. 16S rRNA 序列同源性分析与细菌系统分类鉴定. 国外医学: 卫生学分册, 1998, 25: 12—16
- 东秀珠, 沈德龙. 16S rDNA 同源性所揭示的双歧杆菌与有关细菌的关缘关系. 生物多样性, 2000, 8: 146—152
- Majhenic A C, Venema K, Allison G E, et al. DNA analysis of the genes encoding acidocin LF221 A and acidocin LF221 B, two bacte-

- riocins produced by *Lactobacillus gasseri* LF221. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 63: 705—714
- 12 Olivera N L, Sequeiros C, Nievas M L. Diversity and enzyme properties of protease-producing bacteria isolated from sub-Antarctic sediments of Isla de Los Estados, Argentina. *Extremophiles*, 2007, 11: 517—526
- 13 Sun L, Qiu F B, Zhang X X, et al. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb Ecol*, 2008, 55: 415—424
- 14 石鹏君, 柏映国, 袁铁铮, 等. 应用 *rpoB* 和 16S rDNA 基因的变性梯度凝胶电泳技术对山羊瘤胃细菌多样性的研究. *微生物学报*, 2007, 47: 285—289
- 15 Tan Z, Hurek T, Vinuesa P, et al. Specific detection of *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* strains colonizing rice (*Oryza sativa*) roots by 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacer-targeted PCR. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3655—3664
- 16 Hurek T, Wagner B, Reinhold-Hurek B. Identification of N₂-fixing plant- and fungus-associated *Azoarcus* species by PCR-based genomic fingerprints. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 4331—4339
- 17 王春连, 章琦, 周永力, 等. 我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌遗传多样性分析. *中国水稻科学*, 2001, 15: 131—136
- 18 彭桂香, 王华荣, 张国霞, 等. 糖蜜草内生固氮菌 IS-PCR 和 16S rRNA 基因全序列分析. *华南农业大学学报*, 2005, 26: 73—76
- 19 Tan Z Y, Kan F L, Peng G X, et al. *Rhizobium yanglingense* sp. nov., isolated from arid and semi-arid regions in China. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2001, 51: 909—914
- 20 谭志远, 陈文新. 根瘤菌新类群的全细胞蛋白电泳及 16S rDNA 全序列分析. *应用与环境生物学报*, 1998, 4: 65—69
- 21 Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, 74: 5463—5467
- 22 王华荣, 彭桂香, 张国霞, 等. 糖蜜草(*Melinis minutiflora* Beauv.)内生固氮菌分离鉴定. *生态学报*, 2006, 26: 2566—2571
- 23 Heyndrickx M, Vauterin L, Vandamme P, et al. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *J Microbiol Methods*, 1996, 26: 247—259
- 24 王瑞, 杨水云. PCR-SSCP 快速检测结核分枝杆菌耐利福平 *rpoB* 基因的研究. *现代检验医学杂志*, 2008, 23: 18—20
- 25 蹇文婴, 东秀珠. 利用反向 PCR 方法扩增细菌热激蛋白 HSP60 基因. *微生物学报*, 2002, 42: 56—61

A novel grouping method: ddT clustering assessment of the diversity of associated nitrogen-fixing bacteria isolated from *Vetiveria zizanioides*

ZHAO XianWei¹, PENG GuiXiang², ZHANG ZhiYing¹, QIU YongXiong¹, ZHANG ZeMin¹, ZHANG GuiQuan¹ & TAN ZhiYuan¹

¹ Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

² College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

A novel grouping method (ddT clustering) based on the T base diversity of 16S rDNA sequence of bacteria is presented by application of the high resolution of polyacrylamide gel electrophoresis and the genetic analysis system Li-COR 4300L. The novel ddT clustering method was used to group the 48 associated nitrogen-fixing bacteria isolated from *Vetiveria zizanioides*. Six different groups (group I to VI), which showed the diversity of associated nitrogen-fixing bacteria isolated from the *Vetiveria zizanioides*, were obtained. The clustering methods of SDS-PAGE whole-cell protein patterns and DNA finger-printing patterns were also applied to verify ddT clustering results. 16S rDNA sequences analysis indicated that the isolates mainly distributed in γ -proteobacteria (including *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter ludwigii*, *Pantoea ananatis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*), and β -proteobacteria members (*Pseudacidovorax intermedius*, *Mitsuaria chitosanitabida*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Herbaspirillum frisingense*). The predominant bacterial community in *Vetiveria zizanioides* are *Enterobacter* sp., *Burkholderia* sp. and *Pantoea* sp., which occupied 45%, 19% and 13% of the total isolates respectively.

ddT clustering method, SDS-PAGE, DNA finger-printing patterns, *Vetiveria zizanioides*, associated nitrogen-fixing bacteria

doi: 10.1360/972009-1546