

谭凤霞,柴毅. 基于 16S rDNA 序列的 4 株假单胞菌属细菌的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):31-35.

基于 16S rDNA 序列的 4 株假单胞菌属细菌的分子鉴定

谭凤霞,柴毅

(长江大学动物科学院,湖北荆州 434025)

摘要:对分离自养殖水环境的 4 株假单胞菌属细菌的 16S rDNA 序列进行 PCR 扩增并测定其核酸序列,在 Gen-Bank 中通过 BLAST 查找其同源序列,应用 MegAlign 软件中的 Jotun Hein、Clustal V、Clustal W 3 种方法进行序列差异和同源性分析,分别使用 Mega 4.0 软件中的邻接法(N-J)、最小进化法(ME)、最大简约法(MP)、非加权组平均法(UPGMA)构建系统发育树。3 种序列分析方法结果显示,由 Jotun Hein 法可知,菌株 T₃ 与菌株 T₆ 序列相似度最高为 98.5%,菌株 T₄ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 99.1%,菌株 T₅ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 99.6%,菌株 T₆ 与 *Pseudomonas putida* KF703 及菌株 T₅ 序列相似度最高为 99.1%;由 Clustal V 法可知,菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 97.0%,菌株 T₄ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21、*Pseudomonas* sp. N9-1 及菌株 T₅ 序列相似度最高为 97.7%,菌株 T₅ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 序列相似度最高为 98.9%,菌株 T₆ 与菌株 T₅ 序列相似度最高为 97.2%;由 Clustal W 法可知,菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高均为 97.7%,菌株 T₄ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 序列相似度最高为 99.3%,菌株 T₅ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 序列相似度最高为 99.6%,菌株 T₆ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 97.9%。4 种方法构建的系统发育树基本一致,可初步确立 4 株菌株的分类地位:菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. G53 亲缘关系最近,菌株 T₄ 与序列 *Pseudomonas* sp. N9-1 以及 *Pseudomonas* sp. WP6 亲缘关系最近,菌株 T₅ 与 *Pseudomonas* sp. 3-3(2010)亲缘关系最近,菌株 T₆ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 亲缘关系最近。

关键词:假单胞菌(*Pseudomonas*);16S rDNA;分子鉴定

中图分类号:S917.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)06-0031-05

假单胞菌属(*Pseudomonas*)是假单胞菌科(Pseudomonadaceae)细菌的模式属,广泛存在于土壤、淡水、海水中,为专性需氧的革兰氏染色阴性无芽孢杆菌,菌体呈杆状或略弯,(0.5~1) μm × (1.5~4) μm,该属大多数菌的适温为 30℃,具端鞭毛,能运动,有些株产生荧光色素或(和)红、蓝、黄、绿等水溶性色素,不发酵糖类。目前已确认数量有 29 种,其中荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)可引起草鱼赤皮病,也可感染大鲵^[1]和罗非鱼^[2]等其他养殖动物,而另一种假单胞菌属细菌恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)对黑鲷^[3]、大鲵^[4]和鳊^[5]等养殖鱼类具有致病性。

常用的细菌分类鉴定方法包括对细菌形态和生理生化水平、细胞组分水平以及蛋白质水平上进行的表型鉴定法和基于核酸水平上的分子遗传学鉴定法两大类^[6]。其中对细菌染色体或质粒 DNA 进行分析,包括 G+C 含量测定、核酸杂交、PCR 技术、16S rRNA 序列和 16S~23S rRNA 间区序列分析、全基因组测序等核酸水平的鉴定属于分子遗传学鉴定法。其中 16S rRNA/rDNA 序列分析技术是分子生态学领域的一

项重要技术^[7-8],目前已被广泛应用于微生物的分类、鉴定以及微生物的群落研究,由于该技术具有方便、准确、快捷等特点,使其在鉴定土壤样品中的细菌^[9]、动物内脏及肠道中的菌落^[10-11]、野生菌株的归属^[12]、致病菌的快速鉴定^[13]等方面得到了广泛应用。

本研究对分离自养殖水环境的 4 株气单胞菌属细菌 *Pseudomonas* sp. T₃、*Pseudomonas* sp. T₄、*Pseudomonas* sp. T₅ 和 *Pseudomonas* sp. T₆ 的 16S rDNA 基因序列进行序列同源性分析和系统发育分析,鉴定了其分类地位,为其进一步应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 4 株假单胞菌菌株 T₃、T₄、T₅、T₆ 分离自养殖水环境。

1.1.2 主要试剂 DNA Marker、DNA 提取试剂盒(TOYOBO),Taq 酶(Fermentas),溴化乙锭(EB)、dNTP(10 mmol/L)、溴酚蓝、Tris 碱、EDTA 等(Amresco),琼脂糖(Biowest),牛肉膏、胰蛋白胨、琼脂粉(北京奥博星生物技术有限责任公司提供),冰醋酸、NaCl 等为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 细菌的培养 取 4℃斜面保存的菌株涂布于营养琼脂平板,28℃培养 24 h,用生理盐水洗下菌苔制成菌悬液。

1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取 按照 DNA 提取试剂盒的说明书提取细菌基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测

收稿日期:2012-12-10

基金项目:长江大学博士启动基金(编号:8012000101110)。

作者简介:谭凤霞(1979—),女,山东潍坊人,博士,副教授,从事微生物学研究。Tel:(0716)8066290;E-mail:tanfengxia2008@163.com。

通信作者:柴毅,博士,副教授,从事鱼类生理学研究。E-mail:chaiyi123456@126.com。

DNA 的质量。

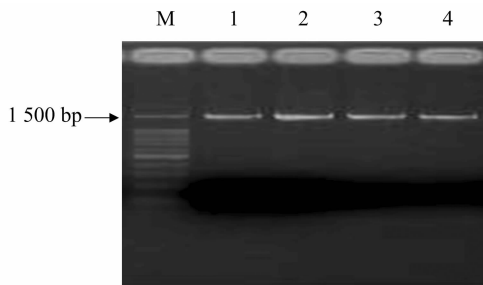
1.2.3 16S rDNA 基因片段的扩增 采用 16S rDNA 细菌通用引物, 8 f; 5′ - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3′; 1492 r; 5′ - GGTTACCTTGTACGACTT - 3′。PCR 反应条件如下: PCR Buffer (10 ×, 2.5 μL)、MgCl₂ (25 mmol/L, 1.5 μL)、dNTPs (2 mmol/L, 2.0 μL)、上游和下游引物 (10 μmol/L, 各 0.5 μL)、模板 DNA (0.3 ~ 0.4 μg)、Taq 酶 (1 U/μL, 0.5 μL), 最后补加灭菌 ddH₂O 至 25 μL。短暂离心 (8 000 r/min, 10 s) 混匀, 每管加入 30 μL 液体石蜡油覆盖于反应混合液上, 将样品置于 PCR 合成仪中按以下条件进行 PCR 扩增反应: 94 ℃ 预变性 2 min; 94 ℃ 变性 30 s, 50 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 保温 8 min, 扩增产物置于 -20 ℃ 备用。扩增得到的产物用 1.5% 琼脂糖凝胶 (含溴化乙锭 1 mg/L) 在 5 V/cm 的电压下电泳。电泳结束后, 用凝胶成像系统照相, 观察到所需产物的扩增带后, 送上海生工武汉测序部进行产物纯化和正反测序。

1.2.4 数据分析 运用 ContigExpress 软件进行序列拼接得到其 16S rDNA 基因全序列, 用 BLAST 软件在 GenBank 中搜索相似序列, 以 MegAlign 软件中的 Jotun Hein、Clustal V 以及 Clustal W 3 种方法分别比较这些序列的差异和相似度。用 Clustal X 软件进行序列比对后, 分别使用 Mega4.0 软件中的邻接法 (N-J)、最小进化法 (ME)、最大简约法 (MP)、非加权组平均法 (UPGMA) 构建系统发育树, 进行 1 000 次自展 (Bootstrap) 检验。

2 结果与分析

2.1 PCR 产物扩增结果

利用 DNA 提取试剂盒提取各菌株总 DNA, 电泳检测其质量较高, 无拖尾现象, 可直接用于 PCR 反应。以 16S rDNA 的通用引物 (8 f, 1492 r), 扩增得到的片段大小为 1 500 bp 左右, 与预期产物大小相符, 且扩增特异性较高 (图 1)。



M—100 bp DNA Marker; 1—*Pseudomonas* sp. T₃; 2—*Pseudomonas* sp. T₄; 3—*Pseudomonas* sp. T₅; 4—*Pseudomonas* sp. T₆

图1 PCR扩增产物电泳图

2.2 目的基因测序结果

以通用引物作为测序引物, 对 PCR 产物进行双向测序, 所得测序峰图中大多数碱基峰清晰, 杂峰较少, 测序起始后的前 50 个左右碱基峰型相对杂乱, 通过 ContigExpress 软件进行杂峰修正和正反序列的拼接, 得到 4 株分离的假单胞菌属细菌 (T₃、T₄、T₅、T₆) 的 16S rDNA 序列, 均为 1 500 bp 左右, 见表 1。

2.3 序列比对结果

以拼接后的各菌株 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行

BLAST 比对, 搜索同源较近的序列, 从中挑选出了 10 个序列: *Pseudomonas putida* KF703 (AB109777.1), *Pseudomonas putida* (AY456706.1), *Pseudomonas plecoglossicida* S21 (DQ095908.1), *Pseudomonas* sp. N9-1 (EU107173.1), *Pseudomonas* sp. G53 (FN547409.1), *Pseudomonas* sp. 210_17 (GQ199719.1), *Pseudomonas putida* strain W30 (GQ303714.1), *Pseudomonas* sp. WP6 (GU979230.1), *Pseudomonas* sp. 3-3 (2010) (HM489946.1), *Pseudomonas* sp. YT3 (HQ143572.1)。用 Megalign 软件比较序列得到的同源性结果如图 3 ~ 图 5。由图 2 (Jotun Hein 法) 可见, 菌株 T₃ 与菌株 T₆ 序列相似度最高均为 98.5%, 与其他菌株序列的相似度均在 96.4% 以上; 菌株 T₄ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 99.1%, 与其他菌株相似度均在 96.7% 以上; 菌株 T₅ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 99.6%, 与其他菌株的序列相似度均在 97.4% 以上; 菌株 T₆ 与 *Pseudomonas putida* KF703 及菌株 T₅ 序列相似度最高为 99.1%, 与其他菌株序列相似度均在 97.9% 以上。由图 3 (Clustal V 法) 可见, 菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 97.0%, 菌株 T₄ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21、*Pseudomonas* sp. N9-1 及菌株 T₅ 序列相似度最高为 97.7%, 菌株 T₅ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 序列相似度最高为 98.9%, 菌株 T₆ 与菌株 T₅ 序列相似度最高为 97.2%。由图 4 (Clustal W 法) 可见, 菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高均为 97.7%, 菌株 T₄ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 序列相似度最高为 99.3%, 菌株 T₅ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 序列相似度最高为 99.6%, 菌株 T₆ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 97.9%。

2.4 构建系统发育树

采用 Mega4.0 软件以 4 种方法构建的系统发育树基本相似 (图 5 至图 8)。其中, 从以 N-J 法 (图 5)、ME 法 (图 6) 和 UPGMA 法 (图 8) 构建的系统发育树可见, 菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. G53、*Pseudomonas putida* strain W30 以及 *Pseudomonas* sp. YT3 聚为一支, 菌株 T₄ 与 *Pseudomonas putida*、*Pseudomonas* sp. N9-1 以及 *Pseudomonas* sp. WP6 聚为一分支, 菌株 T₅ 与 *Pseudomonas* sp. 3-3 (2010) 以及 *Pseudomonas* sp. 210_17 聚为一分支, 菌株 T₆ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 以及 *Pseudomonas putida* KF703 聚为一分支; 由 MP 法构建系统发育树可见 (图 7), 菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. G53 亲缘关系最近, 菌株 T₄ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 以及 *Pseudomonas* sp. WP6 亲缘关系最近, 菌株 T₅ 与 *Pseudomonas* sp. 3-3 (2010) 亲缘关系最近, 菌株 T₆ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 以及 *Pseudomonas putida* KF703 亲缘关系最近。4 种方法构建的系统发育树基本一致, 可初步确立 4 株菌株的分类地位: T₃ 与 *Pseudomonas* sp. G53 亲缘关系最近, T₄ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 以及 *Pseudomonas* sp. WP6 亲缘关系最近, T₅ 与 *Pseudomonas* sp. 3-3 (2010) 亲缘关系最近, T₆ 与 *Pseudomonas plecoglossicida* S21 亲缘关系最近。

3 讨论

现已有较多的研究发现应用 16S rDNA 基因作为细菌分类的分子标记时对细菌的分类等级的划分是采用相似性程度

菌株

T₃

GGGGAGGGCGGCAGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGAGAAAAGCTTGCTCTTCGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGG
AATCTGCCTGCTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCC
TTGCGCTATCAGATGAGCCTAGGTCGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGCTCGAGAGGA
TGATCACTGACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCTTACCGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGAT
CCAGCCATGCGCGCTGTGTGAAGAAGCTTCGGATTGTAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTCAATACGTTAGTGT
TTGACGTTACCGACAGAATAAGCACYGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTG
GGCGTAAAGCGCGCTAGCTGCTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAG
AGTACGGTAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGGCTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTG
GACTGATACTGACACTGAGCTGCGGAGCTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCGCTTAAACGATGTCAACTA
GCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAAAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGCGCGAAGGTTAAAACTCAAAT
GAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATGCAGAGA
ACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTGCTGCTGAGATGTTGGGTTAA
GTCCCGTAAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTACCAGCAGCTAATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GGTGGGATGACGTCAGTCAATCATATGCCCTTACGGCCTGGGTACACACGCTGCTACAATGCTCGGTACAGAGGTTGCCAAGCGCGG
AGGTGGAGCTAATCTACAAAACCGGATGCTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATGCTAGTAATCGCGA
ATCAGAATGTCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCTAAGG
ATGCTATACACCTCTGGGACGAGCTGTACGCAGGCGCCGATTAGCTGGTC

T₄

TACCGTAATAAGGTGACTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGAGAGCTTGCTCCTTGATTACAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTA
GGAATCTGCCTGCTAGTGGGGGACAACCTTTGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGG
CCTTGGCTCATCAGATGAGCTAGTCCGATTAGCTAGTTGTTGGGTAATGGCTCACAAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAG
GATGATCACTGACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTG
ATCCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGTTAATACCTTGCTG
TTTTGACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTAC
TGGCGCTAAAGCGCGCTAGTGTGTTTCTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCT
AGAGTCCGAGTACGGGTGCTGGGAAATTTCTGTGTAGCGGTGAAATCGGTAGATTAAGGAAGAACACCAGTGGCGCAAGGCGACCACC
TGGACTGATACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCGCTTAAACGATGTCAAC
TAGCCGTTGGAATCCTTGAGATTTTAAAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGCGCGAAGGTTAAAACTCAA
ATGAATTGACGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATGCAG
AGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGATGGCTGCTGCTGAGCTGCTGAGATGTTGGG
TTAAGTCCCGTAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGA
GGAAGGTGGGATGACGTCAGTCAATCATATGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGCTCGGTACAGAGGTTGCCAAGC
CGCGAGGTGGAGCTAATCTCACAAAACCGGATGCTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC
CGGAATCAGAATCTCGCGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGCT
TAGTCTAACCTTCGGGAGGACGCTACAGAGCTGAGAAGGAGGGA

T₅

GTGGGGGGCGGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACAGCGGCGGACGGGTGACTAATGCCTAGGAA
TCTGCCTGCTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCCTTG
CGCTATCAGATGAGCCTAGGTGCGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTACCAAGGCGACGATCCGTAACCTGGTCTGAGAGGATGA
TCAGTCACTACCTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGCGGAAAGGCTGATCCA
GCCATGCCGCTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCAGTAAGCTAATACCTTGCTGTTTTG
ACGTTACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGCGGTAATACAGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGG
CGTAAAGCGCGCTAGGTGCTTTGTTAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGAG
TACGGTAGAGGCTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGA
CTGATAGTACACTGAGCTGCGAAGCTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCGCTTAAACGATGTCAACTAGC
CGTTGGAATCCTTGAGATTTTAAAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGCGCGAAGGTTAAAACTCAAATGA
ATTACGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATGCAGAGAA
CTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGCATGGCTGCTGCTGAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAG
TCCCGTAAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAA
GTGGGATGACTGACCTCAATCATATGCCCTTACGGCCTGGGCTACACAGTCTACAATGCTGCGGTACAGAGGTTGCCAAGCGCGGA
GTTGGAGCTAATCTCACAAAACCGGATGCTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATGCTAGTAATCGCGAA
TCAGAATGTCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTAGTACTCT
AACCTTCGGGAGGACGTACCAGCGGTGATCAGG

T₆

CTAGGGCGCTACACATGCAGTCGAGCGGATGACGGGAGCTTGCTCCTTGATTACGGCGGCGGACGGGTGACTAATGCCTAGGAACTGCT
CTGGTAGTGGGGGACAACGTTTCGAAAGGAACGCTAATACCGCATACGTCCTACGGGAGAAAGCAGGGGACCTTCGGGCTTTCGCT
ATCAGATGAGCCTAGTCCGATTAGCTAGTTGGTGGGTAATGGCTCACAAAGGCGACGATCCGTAACCTGGCTCGAGAGGATGATCAG
TCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCCGCTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGGAGGAAGGGCATTAACTCAATACGTTAGTGTGTTGACGTT
ACCGACAGAATAAGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCGCGGTAATACAGAGGTTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA
AGCGCGCTAGGTGTTGTTTAAAGTTGGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGAGGAACTGCATCCAAAAGTGGCAAGCTAGACTACGG
TAGAGGGTGGTGAATTTCCCTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATAGGAAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACCACCTGGACTGAT
ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCGCTAAACGATGTCAACTAGCCGTTG
GAATCCTTGAGATTTTAAAGTGGCGCAGCTAACGCATTAAGTTGACCGCTGGGAGTACGGCGCGAAGGTTAAAACTCAAATGAATTGA
CGGGGGCGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCCTTGACATGCAGAGAAGTTCC
AGAGATGATATGGTGCCTTCGGGAAGTCTGACACAGGTGCTGATGGCTGCTGCTGAGTCTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
TAACGAGCGCAACCCCTTGCTCTTAGTTACCAGCACGTTATGGTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGG
GATGACGTCAGTCAATCATATGCCCTTACGGCCTGGGCTACACACGCTGCTACAATGGTGGTACAGAGGTTGCCAAGCGCGGAGGTGG
AGCTAATCTCACAAAACCGGATGCTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATGCTAGTAATCGCGAATCAGA
ATGTCCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCACCAGAAGTTAGTAGGTGCTAAC
CCTGTGGCAGAGATT

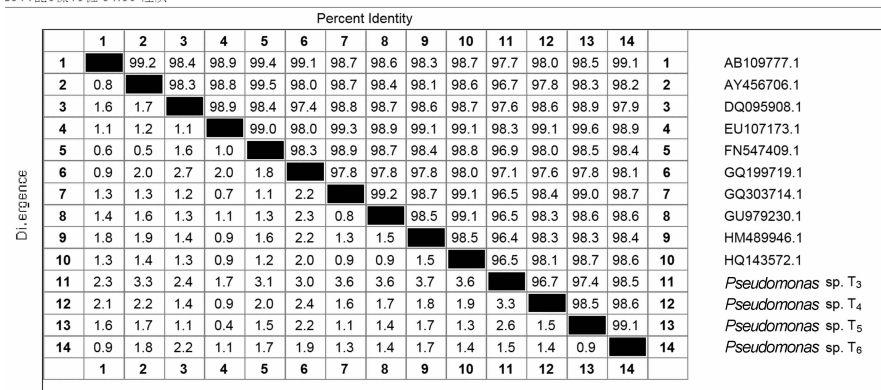


图2 Jotun Hein法基因序列比较结果

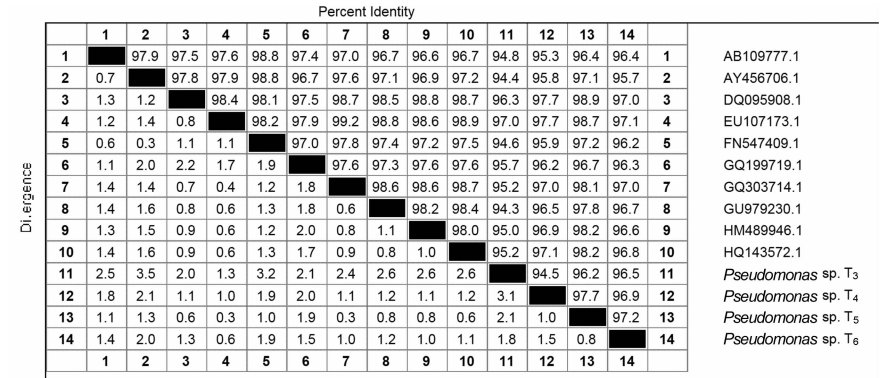


图3 Clustal V法基因序列比较结果

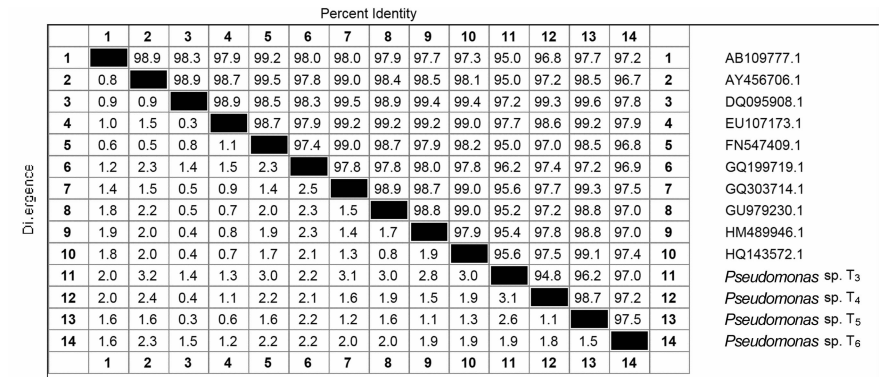


图4 Clustal W法基因序列比较结果

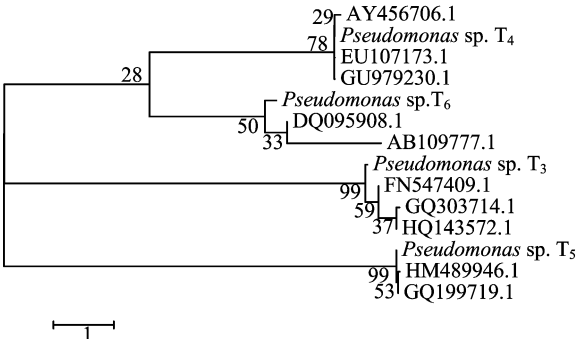


图5 N-J法构建的系统发育树

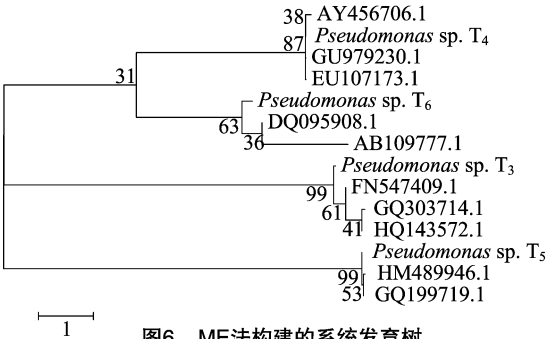


图6 ME法构建的系统发育树

作为标准的,在细菌鉴定中针对不同的对象选择合适的区域作为分子标记,可用于区分不同的分类等级。本研究中菌株16S rDNA 的扩增、测序采用的是8s和1492r细菌通用引

物,而其他菌株在扩增和测序时所采用的引物可能不尽相同,造成相应序列长度的差异,本研究数据分析中采用的是原始序列长度,未进行序列的人工切除,可能影响到序列比对的结

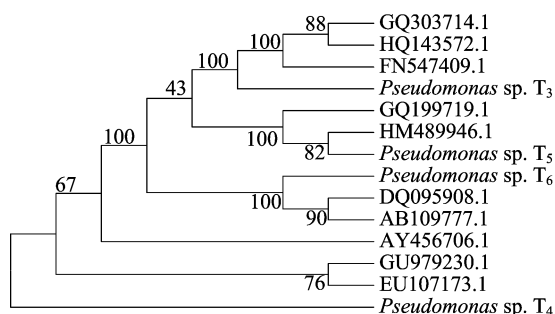


图7 MP法构建的系统发育树

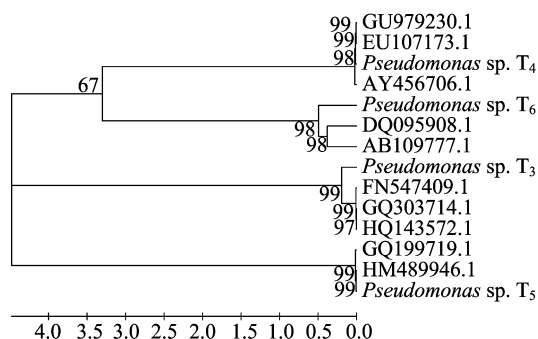


图8 UPGMA法构建的系统发育树

果,在比对的序列中相似度 100% 的两对序列较少。因此,16S rDNA 基因作为细菌分类的分子标记时,针对不同的研究对象应选择不同的相似性程度划分标准^[14]。本研究采用 3 种方法对分离株与 BLAST 查找的同源序列进行了序列相似性的比对,结果表明 3 种方法得到的相似性最高序列及相似度有一定的差异,如采用 Jotun Hein 法进行序列相似度比较,菌株 T₃ 与 T₆ 序列相似度最高为 98.5%,采用 Clustal V 法比较可见菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高为 97.0%,而采用 Clustal W 法的结果为,菌株 T₃ 与 *Pseudomonas* sp. N9-1 序列相似度最高均为 97.7%。另 3 种假单胞菌属细菌与同源序列的相似度按 3 种比对方法的结果也不尽相同。分析为这 3 种序列排列方法有所不同而致,Jotun Hein 法是根据已有的系统调整相关的序列进行比对,而其他 2 种方法不需要这个假设,Clustal W 较 Clustal V 更进步,提供更准确的高度分化序列比对。因此,在本研究中运用 Jotun Hein 法得出的序列相似性较其他 2 种方法稍高,而 Clustal V 和 Clustal W 两种方法的相似度最高序列相同而相似度有差别。

对 DNA 序列进行系统发育分析的 3 个主要步骤是比对、建立取代模型和进化树、进化树评估。目前建树方法常用的有 3 类,分别是距离法、最大简约法(maximum parsimon, MP)和最大似然法(maximum likelihood, ML)。其中距离建树法(包括最小进化法和邻接法等)考察数据组中所有序列的两两比对结果,通过序列两两之间的差异决定进化树的拓扑结构和树枝长度;最大简约法考察数据组中序列的多重比对结果,优化出的进化树能够利用最少的离散步骤去解释多重比对中的碱基差异;最大似然法考察数据组中序列的多重比对结果,优化出拥有一定拓扑结构和树枝长度的进化树,这个进化树能够以最大的概率导致考察的多重比对结果。这 3 种

建树方法由于各自的局限性均可能导致系统误差的产生,为了尽量避免误差的影响,本研究中同时采用了 3 类方法,通过比较它们所构建的系统进化树,来综合分析系统发生关系。除 MP 法外,其他 3 种方法建立的系统发育树基本一致,而 MP 法分析的分离株与相似序列的最近亲缘关系与其他 3 种方法也基本一致,可见本研究所构建的系统发育树是可信的,各分离菌株的最近亲缘关系菌株也是可信的。

用 16S rDNA 测序技术鉴定细菌与其他细菌鉴定方法比较,具有高效、准确、简便、特异性强的优点。随着基因组学的迅猛发展,细菌 16S rDNA 间隔区序列数据库不断扩大,运用 16S rDNA 序列分析技术对微生物进行分类鉴定,确定微生物在进化中的位置,已成为微生物分类学中最重要方法。本研究运用这种方法对几株假单胞菌进行了鉴定,采用 16S rDNA 序列分析并结合传统的细菌表型特征以及革兰氏染色反应,以确定假单胞菌属细菌的系统发育学地位和基本特性,以便鉴定其分类地位,为进一步应用提供科学依据。

参考文献:

- [1] 杜宗君,黄小丽,邓永强,等. 人工养殖大鲵病原荧光假单胞菌的分离鉴定[J]. 四川农业大学学报,2011,29(1):103-107.
- [2] 邓显文,谢芝勋,刘加波,等. 罗非鱼荧光假单胞菌的分离鉴定[J]. 广西农业科学,2010,41(6):612-615.
- [3] 毛芝娟,王美珍,陈吉刚,等. 黑鲟肠炎病原恶臭假单胞菌的分离和鉴定[J]. 渔业科学进展,2010,31(3):23-28.
- [4] 赵虎,张鹏,陈玖华,等. 大鲵恶臭假单胞菌的分离及鉴定[J]. 河南水产,2008(4):40-41.
- [5] 樊海平. 恶臭假单胞菌引起的欧洲鳗鲡烂鳃病[J]. 水产学报,2001,25(2):147-150.
- [6] 杜昕波,赵耘,李伟杰. 菌种保藏中的细菌鉴定方法[J]. 中国兽药杂志,2009,43(3):50-52.
- [7] 张彤,方汉平. 微生物分子生态技术:16S rDNA/DNA 方法[J]. 微生物学通报,2003,30(2):97-101.
- [8] 杨霞,陈陆,王川庆. 16S rDNA 基因序列分析技术在细菌分类中应用的研究进展[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2008,36(2):55-60.
- [9] 吴文龙,段淑蓉,李文均,等. 3 株抗灰霉病放线菌的分离和鉴定[J]. 云南大学学报:自然科学版,2004,26(3):270-274.
- [10] 蒋燕,鲍宝龙,谢彩霞,等. 16S rDNA 文库法分析草鱼肝胆脏和胆汁细菌群落组成[J]. 上海海洋大学学报,2010,19(4):440-446.
- [11] 於剑,聂奎,密金玲,等. 一株鸭源恶臭假单胞菌 16S rDNA 的序列测定与分析[J]. 西南师范大学学报:自然科学版,2008,33(3):99-104.
- [12] 张会敏,冯友军. 一株野生细菌的 16S rDNA 序列分析与系统发育树的构建[J]. 生物信息学,2005,3(1):1-4,18.
- [13] 郑桂丽,翟俊辉,唐学玺,等. 16S rDNA 寡核苷酸芯片鉴定致病细菌的初步研究[J]. 军事医学科学院院刊,2005,29(1):13-17,29.
- [14] Lee S K Y, Wang H Z, Law S H W, et al. Analysis of the 16S-23S rDNA intergenic spacers (IGSs) of marine vibrios for species-specific signature DNA sequences[J]. Marine Pollution Bulletin,2002,44(5):412-420.