

崔国艳,程红兵,何鑫,等. 基于 16S rDNA 序列的 1 株灭螺微生物的分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2017,45(1):16-19.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.005

# 基于 16S rDNA 序列的 1 株灭螺微生物的分子鉴定

崔国艳<sup>1</sup>, 程红兵<sup>1</sup>, 何鑫<sup>2</sup>, 彭交凤<sup>3</sup>, 闫丘思嘉<sup>2</sup>, 黄成铭<sup>2</sup>

(1. 长治医学院微生物教研室,山西长治 046000; 2. 中南大学湘雅医学院病原生物教研室,湖南长沙 410078;  
3. 长沙金城医学检验所有限公司,湖南长沙 410078)

**摘要:**从湖南省汨罗市血吸虫防治基地土壤中分离得到 1 株灭螺活性较强的微生物菌株 B59,以 B59 菌株的总 DNA 为模板,采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增并测其核酸序列,得到 1 条约 1 500 bp 的片段。通过 Blast 软件在 GenBank 中进行同源性检索,将其与同源性较高的菌株的 ITS 序列进行 ClustalX 序列差异和同源性分析,分别使用 MEGA 6.0 软件中的邻接法、Phylip 软件中的最大简约法及最大似然法构建系统发育树。结果显示,3 种方法构建的系统发育树基本一致,B59 菌株与 *Bacillus cereus* 的亲缘关系最近,聚为一支,相似度达 100%。

**关键词:**钉螺;微生物;16S rDNA;系统发育树

**中图分类号:** R383.2<sup>+</sup>4;S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0016-03

血吸虫病是一种严重危害人类公共健康和社会经济发展的人兽共患寄生虫病,主要流行于非洲、东南亚等国家,每年有 690 万~750 万人被感染<sup>[1]</sup>,虽然目前在我国得到了很好的控制,但是日本血吸虫病仍然被政府认定为 4 种高度传染病之一<sup>[2-3]</sup>,甚至在许多地区,服用大剂量吡喹酮后的人群再感染率仍大于 20%<sup>[4]</sup>。湖北钉螺是日本血吸虫唯一的中间宿主,是造成日本血吸虫病流行的重要根源。据统计,截至 2013 年底血吸虫病流行县(市、区)比 2012 年新增 2 个,达到 454 个,总人口为 2.49 亿人,血吸虫病的流行村有 30 352 个<sup>[5]</sup>。因此,控制钉螺以打破寄生虫的生活史是目前全国控制血吸虫病的比较重要和有效的措施<sup>[6]</sup>。但是由于复杂的经济、社会、环境和生物等因素的影响,目前仍不确定控制钉螺最经济有效的方法。目前控制钉螺的方法主要有 3 种,即物理灭螺、化学药物灭螺和生物生态灭螺。微生物灭螺由于其稳定、高效、对非靶生物无毒性,具有更多的生物多样性、丰富的代谢途径或产物,同时生长周期短,可诱导产物产生等优势<sup>[7-9]</sup>,是目前较有前景的灭螺方法,因此寻找理想的灭螺微生物的工作一直在进行。B59 菌株是笔者实验室从土壤中筛选到的 1 株灭螺活性较高的微生物<sup>[10]</sup>,准确地对其进行分类鉴定是后续工作的必要前提。细菌 16S rDNA 序列分析技术具有高效、方便、准确、快捷等特点,广泛应用于各种细菌的遗传特征和分子差异的研究。本研究对 B59 菌株的 16S rDNA PCR 扩增产物的序列进行测定,对所测序列进行同源性分析和系统发育树构建,以鉴定其分类地位,为进一步应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

收稿日期:2015-11-23

基金项目:国家自然科学基金(编号:81271862);国家科技支撑计划(编号:2009BAI78B05)。

作者简介:崔国艳(1980—),女,山西长治人,硕士,副教授,主要从事病原微生物活性物质研究。E-mail:cuigu2212@163.com。

1.1.1 供试菌株 B59 菌株是从湖南省汨罗市血吸虫病防治研究试验基地的螺池土壤中分离纯化得到,由笔者实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器 2 × Taq Master Mix、DNA marker (DL2000),均购自宝生物工程(大连)有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;引物由北京鼎国昌盛生物技术有限公司合成;My Cyclor™ thermal cyclor PCR 仪,购自美国 Bio-Rad 公司;UVP-GDS8000 凝胶成像分析系统,购自美国 UVP 公司;PowerPac Univarsal 电泳仪,购自美国 Bio-Rad 公司;H1850R 台式高速低温离心机,购自湖南湘仪动力测试仪器有限公司。

### 1.2 试验方法

1.2.1 菌体培养 供试菌株在 LB 斜面培养基上活化培养后接种于 LB 液体培养基中,28 ℃、160 r/min 振荡培养过夜,4 ℃ 保存备用。

1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取 参照 DNA 提取试剂盒的说明书提取 B59 菌株基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA。

1.2.3 16S rDNA 的 PCR 扩增 采用细菌 16S rDNA 的通用引物,F:5'-AGAGTTTGATCCGCTCAG-3',R:5'-ACGGC-TACCTGTACGACTT-3'。反应体系(25 μL)为:2 × PCR Master Mix 12.5 μL,模板 DNA 1 μL,上下游引物(50 μmol/L)各 1 μL,ddH<sub>2</sub>O 9.5 μL。PCR 扩增反应条件:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 1 min,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,共 30 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进行验证后,扩增产物送北京华大基因科技有限公司进行序列测定。

1.2.4 数据分析 运用 ContigExpress 软件进行序列拼接以得到 B59 菌株的 16S rDNA 基因全序列,将其提交至 GenBank 核酸序列数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>),在 NCBI 上进行 Blast 在线检索,搜索其相近序列,采用 ClustalX 进行多序列比对后,通过 MEGA 6.0 中的邻接法(NJ)、Phylip 3.695 中的最大简约法(MP)及最大似然法(ML)<sup>[11]</sup>构建系

统发育树,并进行 Bootstrap 稳定性检验(1 000次)。

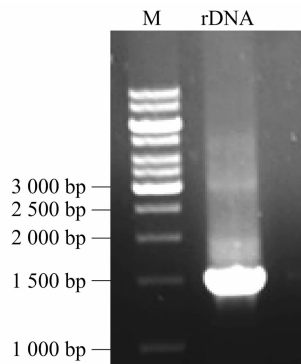
## 2 结果与分析

### 2.1 16S rDNA 的 PCR 扩增结果

以“1.2.2”节中的方法提取得到 B59 菌株的基因组 DNA,电泳检测到其条带清晰,无拖尾现象,可直接用于 PCR。菌株 B59 的 16S rDNA 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到 1 条约 1 500 bp 的特征性条带(图 1),与预期的大小一致,扩增特异性较高。

### 2.2 目的基因 16S rDNA 序列分析

运用 ContigExpress 软件对序列进行杂峰修正和正反序列拼接,结果表明 B59 菌株的 16S rDNA 长度为 1 490 bp(图 2)。



M—DNA 标志物; rDNA—B59 菌株 16S rDNA 扩增产物

图1 B59 菌株 16S rDNA 扩增产物电泳图谱

```

1 GTGCAGTGGC GGCTGCTATA CATGCAAGTC GAGCGAACAG AGAAGGAGCT TGCTCCTTTG
61 ACGTTAGCGG CGGACGGGTG AGTAACACGT GGGCAACCTA CCCTATAGTT TGGGATAACT
121 CCGGGAAACC GGGGCTAATA CCGAATAATT TATTTCATCT CATGGTGAAA TACTGAAAGA
181 CGGTTTCGGC TGTGCTATA GGATGGGCC GCGGCGCATT AGCTAGTTGG TGAGGTAACG
241 GCTCACCARG GCGACGATGC GTAGCCGACC TGAGARGGTG ATCGKCCACA CTGRGACTCG
301 AGACMCGGYC CAGACTCCTA CGGAGGCAG GCAGTASGGA ATCTTCACAC AATGRGCGAA
361 AGCCTGATGK AGCAACGGCC GCGTGAGTGA AGAARGATTT CGRATCGTAA AACTCTGTGT
421 TAAGGGAAGA ACAAGTACAG TAGTAAGTGG CTGTACCTTG ACCGTACCT TATTAGAAAG
481 CCACGGCTAA CTACGTGCCA GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAA
541 TTATTGGGCG TAAAGCGCGC GCAGGTGGTT TCTTAAGTCT GATGTGAAAG CCCACGGCTC
601 AACCCTGGGA GGGTCATTGG AAAGTGGGAG ACTTGAGTGC AGAAGAGGAT AGTGAATTS
661 CAAGTGTAGC GGTGAAATGC GTAGAGATTT GGAGGAACAC CAGTGGCGAA GGCAGCTATC
721 TGGTCTGTAA CTGACACTGA RCGCGGAAAG CGTGGGGAGC AAACAGGATT AGATACCCTG
781 GTAGTCCACG CCGTAAACGA TGAGTGCTAA GTGTTAGGGG GTTCCGCCCT CCTAGTGCT
841 GCAGCTAACG CATTAAACAC TCCGCCTGGG GGAGGTACGG TCGCAGACT GAAACCTCAA
901 WGRAATTGAC KGGGGCCCCG CMCAGCGGT GKAGCATGCT GRTTTAWTTC GAAKCAACGC
961 GAAGAACCTT ACCAGGTCTK GACWTCSCGT TGACCACTGT ACGAGATATA GTTTCGCCCT
1021 CSAGGGCMAC GKGACAGGT GGATGCATGG TTGTCGCTAK CTCSTGCACT CCGMAGWGT
1081 GGGWTAAAGT CCCSTCAWCT GAKCGCAACC CCTTGAWCTT TACGTTGCCA TYATTTASTT
1141 GGGCATCTYT AAGGTGACCT GCCGGTKACA AACCGTGARG AAGGTGGGGA TGGACSTGCA
1201 AATCAYCATC GYACSTTAT AGAMCTGCGG CTACACACGT GCTACAATGG ACGATACAAA
1261 CGGTTGCCAA CCGCGAGAG GGAGCTAATC CGATAAAGT GTTCTCAGTT CGGATTGTAG
1321 GCTGCAACTC GCCTACATGA AGCCGGAATC GCTAGTAATC GCGGATCAGC ATGCCGCGGT
1381 GAATACGTTT CCGGGCCTTG TACACACCGC CCGTCACACC ACGAGAGTTT GTAACACCCG
1441 AAGTCGGTGA GGTAACTTTT GGAGCCAGCC GCCGAAGTGA AAAGAAATGG
  
```

图2 B59 菌株的 16S rDNA 全序列

### 2.3 系统发育树构建

将 B59 菌株的 16S rDNA 序列在 GenBank 中进行在线 Blast 比对,以大肠埃希菌(*Escherichia coli*)为外群,选取同源性最近的 9 个序列与 B59 菌株建立比对模型,分别运用 NJ、

MP、ML 法一起构建基于 16S rDNA 序列的系统发育树,利用 Bootstrap 生成 1 000 个自展数据集对进化树进行可靠性分析(图 3、图 4、图 5)。

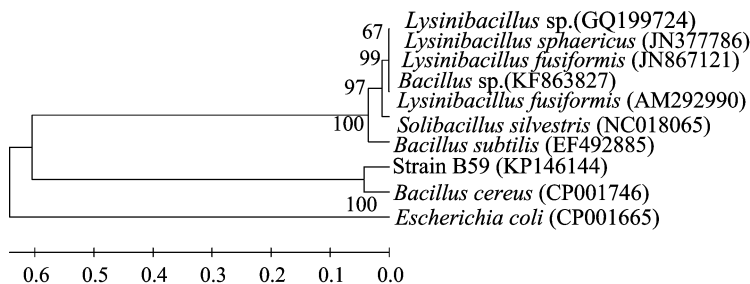


图3 NJ 法构建的系统发育树

由图 3、图 4 可知,NJ 法和 MP 法构建的分子系统树得到基本一致的拓扑结构,在系统树上,*E. coli* 作为外群单独分为一支,其余分为 2 支,但两序列经 Bootstrap 验证都有很高的支持率,说明其系统关系的可信度较高。NJ 法构建的系统发育树中,B59 菌株(KP146144)与蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)聚为同一分支,亲缘关系最近,序列的相似性高达 100%;MP 法构建的系统发育树中,B59 菌株与 *Bacillus cereus* 位于枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)和土壤芽胞杆菌(*Solibacillus*

*silvestris*)分支上,其序列相似性达 100%;而图 5 中,由 ML 法构建的系统发育树中,B59 菌株与 *Bacillus cereus* 也聚为同一分支,序列相似性达 100%,但其位于大肠埃希菌分支上,序列的相似性同为 100%。

## 3 讨论

16S rDNA 是原核生物在漫长的进化过程中十分保守的序列,在现代微生物的分类鉴定中扮演着重要的角色<sup>[12]</sup>,具

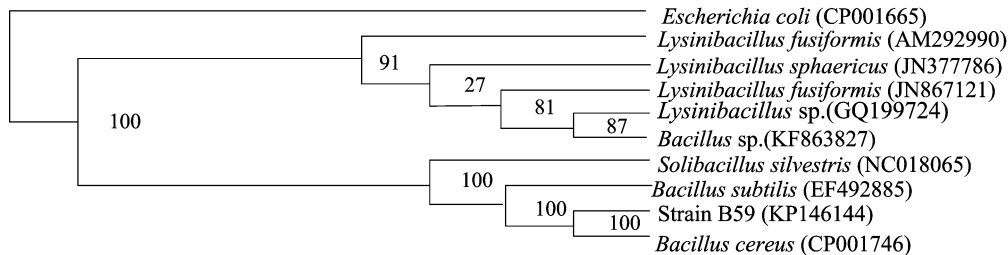


图4 MP 法构建的系统发育树

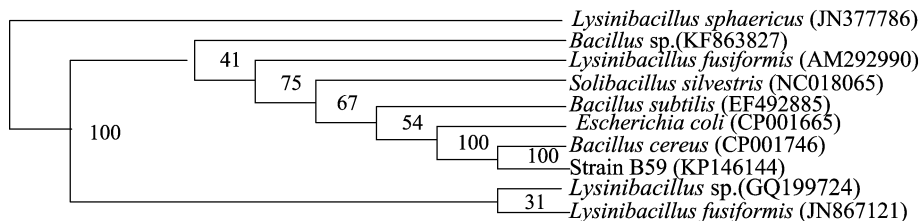


图5 ML 法构建的系统发育树

有分子量大小适中、信息量大、易于分析、突变率小等优点,是细菌分类学研究中最常用的分子钟,素有细菌化石之称<sup>[13]</sup>,是种属鉴定的分子基础,得到多个国际权威机构 FDA、NASA、TIGR 等的认可<sup>[14]</sup>。基于 16S rDNA 序列可对物种之间的同源性进行分析,如果同源性小于 98%,认为属于不同种;同源性小于 93%~95%,认为属于不同属<sup>[15]</sup>。

基于分子水平的系统发育推断方法可分为 2 类,即基于字符序列的方法和基于距离的方法。基于字符序列的方法利用统计技术定义一个最优化标准,对树的优劣进行评价,包括最大简约法、最大似然法。最大简约法希望用最小的改变来解释所要研究的分类群体之间的差异,但这种方法在物种数量较大时,变得不实用,且没有考虑树中分支的长度,这样无法反映出不同物种间进化距离的长短<sup>[16]</sup>;最大似然法具有良好的统计性质,能够更加有效地刻画不同物种间的进化距离,但其计算量非常大,也是一个 NP-难题<sup>[17]</sup>,在物种数量较大时是不适用的,且这种方法对模型的依赖性较高,导致其在很多情况下应用存在困难;基于距离的 NJ 法通常无法找到精确的最小进化树,只能找到近似的,但其计算速度非常快,且准确率较高,因此常被用于系统发育分析<sup>[18]</sup>。

这 3 类建树方法由于各自的局限性均有可能导致系统产生误差,为了避免误差的影响,本研究同时采用 3 种方法构建系统进化树以综合分析系统发育关系。结果表明,3 种方法构建的系统发育树中,虽然由 ML 法构建的发育树中,*Lysinibacillus sphaericus* 单独作为外群与其他 2 种方法不同,但是 B59 菌株与 *Bacillus cereus* 都聚为一支,且置信度较高,均为 100%,说明本研究构建的系统发育树是可信的,与郭青云等的研究结果<sup>[19]</sup>一致。因此,将 B59 菌株归为 *B. cereus*,*B. cereus* 能产生多种化合物如溶血素、脂肽类抗菌物质、多烯类物质及氨基糖苷等物质,这些物质对多数细菌、病毒、真菌及虫体有毒性作用,这可能是钉螺致死的主要原因<sup>[20-22]</sup>。然而,目前有极少研究报道 *B. cereus* 具有灭螺活性,其具体的灭螺活性物质的成分、结构、纯化等有待进一步研究。

#### 4 结论

采用细菌 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增得到 B59 菌

株的 16S rDNA 序列,运用 ContigExpress 软件进行序列拼接,该序列长度为 1 490 bp,运用 NJ、MP 及 ML 法构建系统发育树,结果表明,B59 菌株与 *Bacillus cereus* 的亲缘关系最近,聚为一支,相似度达 100%。

#### 参考文献:

- [1] Cui G Y, Wang S P, Cheng H B, et al. Screening of microorganisms against *Oncomelania hupensis* and assessing the molluscicidal efficacy [J]. *Microbiology China*, 2015, 42 (6): 1060 - 1066.
- [2] Dai J R, Li Y Z, Wang F, et al. Sensitivity of *Oncomelania hupensis* to niclosamide nationwide survey in China [J]. *International Journal of Environmental Research*, 2014, 11 (3): 3086 - 3096.
- [3] Manus D P, Gray D J, Li Y S, et al. Schistosomiasis in the People's Republic of China: the era of the three gorges dam [J]. *Clinical Microbiology Review*, 2010, 23 (2): 442 - 466.
- [4] McManus D P, Gray D J, Ross A G, et al. Schistosomiasis research in the dongting lake region and its impact on local and national treatment and control in China [J]. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2011, 5 (8): e1053.
- [5] 李石柱, 郑浩, 高婧, 等. 2012 年全国血吸虫病疫情通报 [J]. *中国血吸虫病防治杂志*, 2013, 25 (6): 557 - 563.
- [6] Zhou X N, Bergquist R, Leonardo L, et al. *Schistosomiasis japonica*: control and research need [J]. *Advance in Parasitology*, 2010, 72: 145 - 178.
- [7] Yang F, Long E, Wen J H, et al. Linalool, derived from *Cinnamomum camphora* (L.) Presl leaf extracts, possesses molluscicidal activity against *Oncomelania hupensis* and inhibits infection of *Schistosoma japonicum* [J]. *Parasites & Vectors*, 2014, 7 (1): 1 - 13.
- [8] Guo D Z, Chen J, Liu Y D, et al. A high-performance molluscicidal ingredient against *Oncomelania hupensis* produced by a rhizospheric strain from *Phytolacca acinosa* Roxb [J]. *Pharmacognosy Magazine*, 2011, 7 (28): 277 - 283.
- [9] Rottava I, Toniazio G, Cortina P F, et al. Screening of microorganisms for bioconversion of (-)- $\beta$ -pinene and R-(+)-limonene to  $\alpha$ -terpineol [J]. *Lebensmittel - Wissenschaft und - Technologie*, 2010, 43 (7): 1128 - 1131.

尚秋萍, 黄林, 胡雨薇, 等. 牦牛和犏牛睾丸中泛素结合酶基因 *Ube2n*、泛素连接酶基因 *Trim36* 表达水平的比较[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(1): 19–21.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.01.006

# 牦牛和犏牛睾丸中泛素结合酶基因 *Ube2n*、泛素连接酶基因 *Trim36* 表达水平的比较

尚秋萍, 黄林, 胡雨薇, 雷杰雯, 金素钰, 郑玉才

(西南民族大学生命科学与技术学院, 四川成都 610041)

**摘要:**为探讨蛋白质泛素化与牦牛杂交后代睾丸精子发生异常的相关性, 比较了参与泛素化的 2 种酶基因(泛素结合酶基因 *Ube2n*、泛素连接酶基因 *Trim36*) 在成年牦牛和雄性不育犏牛睾丸中的 mRNA 水平。定量 PCR 分析显示, 牦牛( $n=9$ ) 睾丸中 *Ube2n*、*Trim36* 基因的 mRNA 水平分别显著、极显著高于犏牛( $n=7$ ), 其中 *Trim36* mRNA 水平相差 10 倍以上。研究结果提示, 犏牛睾丸蛋白质泛素化水平明显下降, 可能会影响精子发生过程中正常的蛋白质更新。

**关键词:**牦牛; 杂交雄性不育; 睾丸; 蛋白质降解; 泛素化

**中图分类号:** S823.82; Q786 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)01-0019-03

牦牛(*Bos grunniens*) 主要分布在中国, 数量 3 000 万头以上, 是青藏高原特有的牛种和畜牧业主体。牦牛与普通牛(*Bos taurus*) 的杂交后代称为犏牛, 具有明显的杂种优势, 产乳和产肉量显著提高, 但表现为回交三代内雄性不育, 无法产生正常精子<sup>[1]</sup>, 而雌性杂交后代生殖正常, 其分子机制尚未明确。

已有研究表明, 犏牛睾丸中很多生殖相关基因的 mRNA 或蛋白质水平均显著低于其亲本牦牛和黄牛, 如 *SYCP3*、*Boule*、*Dazl*、*Dmrt7*、*Dmcl* 等<sup>[2-5]</sup>。也存在少量蛋白质在犏牛

睾丸中上调的情况<sup>[6]</sup>。也有研究表明, 犏牛睾丸中细胞凋亡增加<sup>[7]</sup>。尽管目前犏牛雄性不育的分子机制尚不明确, 但总体认为, 犏牛雄性不育的机制可能涉及精子发生过程中复杂的基因调控网络, 并与睾丸中多种特异或非特异蛋白质的异常表达有关。然而, 这些变化是否影响睾丸中蛋白质降解尚不明确。鉴于蛋白质泛素化在蛋白质降解中的重要作用, 本研究比较牦牛与犏牛睾丸中与泛素化相关的泛素结合酶(Ubiquitin-conjugating enzyme E2 N, *Ube2n*)、泛素连接酶(E3 ubiquitin-protein ligase *TRIM36*, *Trim36*) 基因的 mRNA 水平, 以探讨泛素化与犏牛雄性不育是否具有相关性。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的采集

麦洼牦牛(*Bos grunniens*) 和犏牛(公黄牛与母麦洼牦牛

收稿日期: 2015-09-26

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31240053)。

作者简介: 尚秋萍(1992—), 女, 湖南吉首人。E-mail: m18782278962@163.com。

通信作者: 郑玉才, 博士, 教授, 主要从事泌乳生物化学、高原家畜生化与分子遗传学研究。E-mail: yucaizheng65@hotmail.com。

[10] 崔国艳, 汪世平, 程红兵, 等. 灭钉螺微生物的筛选及功效研究[J]. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(2): 109–112.

[11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.

[12] 曾静, 窦岳坦, 王磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16S rDNA 全序列及 DNA 同源性分析[J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 133–137.

[13] 李琬, 李璐, 李景鹏, 等. 三株田间分离大豆根瘤菌 16S rDNA 基因鉴定及序列比较[J]. 东北农业大学学报, 2007, 38(6): 725–728.

[14] Hugenholtz P, Huber T. Chimeric 16S rDNA sequences of diverse origin are accumulating in the public databases[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(1): 289–293.

[15] 殷婷婷, 薛梦颖, 丁雨燕, 等. 嗜盐细菌 XJ12 的分子鉴定与生长特性研究[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 368–370.

[16] Sridhar S, Lam F, Blelloch G E, et al. Direct maximum parsimony phylogeny reconstruction from genotype data[J]. BMC Bioinformatics, 2007, 8(1): 472–486.

[17] Foulds L R, Graham R L. The Steiner problem in phylogeny is NP-complete[J]. Advances in Applied Mathematics, 1982, 3(1): 43–49.

[18] 张丽娜, 荣昌鹤, 何远, 等. 常用系统发育树构建算法和软件鸟瞰[J]. 动物学研究, 2013, 34(6): 640–650.

[19] 郭青云, 郭道义, 李永东, 等. 几种杀螺细菌的筛选与功效研究[J]. 生物学杂志, 2009, 26(2): 31–34.

[20] Ramarao N, Sanchis V. The pore-forming haemolysins of *Bacillus cereus*: a review[J]. Toxins, 2013, 5(6): 1119–1139.

[21] Reis A L S, Montanhini M, Bittencourt J V M, et al. Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 2013, 44(4): 1195–1198.

[22] Hamdache A, Lamarti A, Aleu J, et al. Non-peptide metabolites from the genus *Bacillus*[J]. Journal of Natural Products, 2011, 74(4): 893–899.