

郭伟强,钱 玮,胡翠英,等. 宏基因组测序分析人参内生细菌组成及多样性[J]. 江苏农业科学,2018,46(6):37-40.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.009

宏基因组测序分析人参内生细菌组成及多样性

郭伟强,钱 玮,胡翠英,陈子欣,仲汇银,鞠 鑫

(苏州科技大学化学生物与材料工程学院,江苏苏州 215009)

摘要:人参具有极高的药用价值,除野生人参外,虽已在河南、湖北等地区均已实现人工栽培,但仍难以满足需求。多数研究显示,人参内生菌可能是解决人参供不应求较为行之有效的方案;但关于野生与栽培人参内生细菌差异的研究较少。采用宏基因组测序技术分析野生及栽培型人参内生细菌种类及多样性。结果显示,2种不同来源的人参内生细菌主要包括3个门:变形菌门(Proteobacteria)、硬壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria),其中变形菌门占据主导地位。在变形菌门中,野生人参内生细菌中 γ -变形菌纲为第一大纲,栽培人参内生细菌中芽孢杆菌纲(Bacilli)为第一大纲。野生人参内生细菌多集中于类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)等;栽培人参内生细菌多集中于类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)、动性球菌科(Planococcaceae)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)等。这些数据显示,不同产地的人参内生细菌多样性略有差异。研究结果为进一步探讨人参内生细菌次生代谢产物、不同产地间人参内生细菌差异性 etc 提供理论基础和技术支撑。

关键词:宏基因组;人参;内生细菌;多样性;野生;栽培

中图分类号: S567.5⁺10.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)06-0037-03

人参,属五加科植物,在我国有数千年的药用历史,是传统名贵药材。人参具有调气血、安精神、止惊悸等功效。近年来,现代药理扩大人参的应用范围和价值,研究发现人参具有抗肿瘤、抗炎症、抑菌等多种作用^[1-2]。人参有效成分主要集中于人参皂苷、多糖等,如人参皂苷 Rg1、Rg3、Rh2、Re 等。人参皂苷 Rg1 通过抑制 AMPK/mTOR/PI3K 通路减少血管紧张素 II 诱导足细胞的自噬现象^[3];人参皂苷 Rg3 下调胰岛素一号增长因子的分泌,抑制骨髓瘤细胞增殖^[4];人参皂苷 Re 在永生表皮细胞 HaCaT 中,能够调控丝蛋白和半胱天冬酶-14 促进皮肤的保护功能^[5];人参皂苷 Rh2 在结肠癌荷鼠抑制瘤模型中能够减轻肿瘤相关抑郁症状^[6]。

野生人参多分布于黑龙江、吉林、辽宁等地区,随着人参种植技术的发展,栽培人参已在湖北、河南、河北等地区落户。虽然人参的种植规模在扩大,但依然处于供不应求的状况。此外,病虫害、天气等因素也严重影响人参的产量和品质^[7]。

内生菌是一类可以在植物体内生存的微生物,且不会对宿主植物造成任何伤害。因其次生代谢产物中可能含有与宿主植物相同或相似的活性成分,而成为研究的热点和重点^[8]。因此,本试验以非主产地栽培人参为研究对象,分析其内生细菌的组成和多样性,以期为更好地开发利用有限的人参资源提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

人参为吉林长白山野生人参(购自安徽省亳州市中药市场)和河南省南阳市栽培人参(由河南省南阳市栽培户馈赠);细菌总 DNA 提取试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;宏基因组测序由上海美吉生物医药科技有限公司完成。

营养琼脂(NA)培养基:10.0 g 蛋白胨,3.0 g 牛肉粉,5.0 g 氯化钠,双蒸水定容至 1 L,pH 值调至 7.3。

1.2 试验方法

1.2.1 人参表面消毒及培养 新鲜人参根茎经自来水冲洗后,用 50% 乙醇处理 15 s,75% 乙醇处理 30 s。随后,将人参于 1% NaClO 溶液中浸泡 3 min,无菌水冲洗 3~5 次,收集冲洗废液。将人参根茎剪成 5 mm 的小段置于 NA 液体培养基中,28℃,100 r/min 培养 14 d 左右。

1.2.2 人参内生细菌总 DNA 提取 取 5 mL 上述培养液,1 000 r/min 离心 1 min 后,在菌体沉淀中加入 200 μ L 缓冲液 GA 和 20 μ L 蛋白酶 K,振荡;加入 220 μ L 缓冲液 GB,振荡 15 s 后 70℃ 水浴 10 min;加入 220 μ L 无水乙醇,振荡 15 s,转至吸附柱中,随后按说明书进行操作。使用紫外微量分光光度计检测所提 DNA 的浓度和质量。

1.2.3 宏基因组测序及数据分析 利用细菌 16S rDNA 引物 338F(5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 806R(5'-GGACTACHVGGG TWTCTAAT-3'),进行 PCR 扩增。产物经胶回收后,使用 Illumina PE250/PE300 进行宏基因组测序。

测序所得有效数据进行 OTUs (operational taxonomic units,简称 OTUs) 聚类分析,使用 Greengene 数据库进行物种注释,对 OTUs 进行丰度和 Alpha 多样性分析。

收稿日期:2016-10-09

基金项目:国家自然科学基金(编号:81502958);江苏省自然科学基金(编号:BK20150286)。

作者简介:郭伟强(1980—),男,湖北襄阳人,博士,讲师,主要从事天然产物抗肿瘤和炎症机制及肿瘤机理等研究。Tel:(0512) 68418938;E-mail:wq_guo0824@sina.com。

通信作者:鞠 鑫,博士,讲师,主要从事微生物和酶催化等研究。Tel:(0512)68418938;E-mail:westernline@163.com。

2 结果与分析

2.1 测序结果及分析

由图 1 可知,随着测序数量的增加,稀释度曲线趋向平坦。香农指数(图 2)说明测序数据丰富,能够反映人参内生细菌中的物种信息。

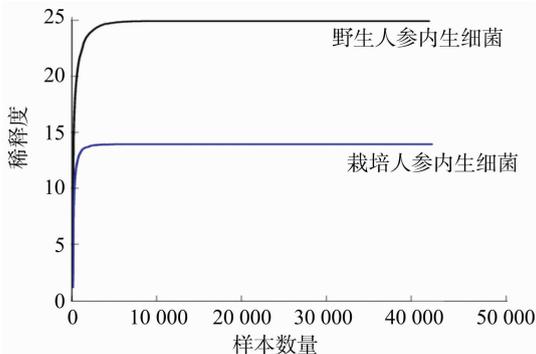


图1 人参内生细菌的稀释度曲线

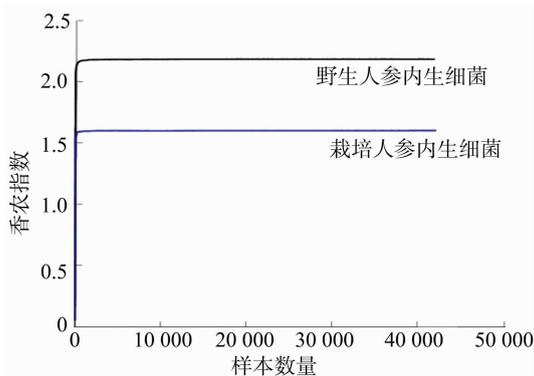


图2 人参内生细菌的香农指数曲线

2.2 人参内生细菌的多样性分析

由图 3、图 4、图 5 可知,在门的分类水平上,人参内生细菌多分布在变形菌门(Proteobacteria)、硬壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)等门中,其中,野生人参内生细菌在上述门中的含量分别约为 64%、29%、7%,栽培人参内生细菌在上述门中的含量分别约为 56%、40%、4%。在纲的分类水平上,人参内生细菌多分布于放线菌纲(Actinobacteria)、 α -变形菌纲(Alpha-proteobacteria)、芽孢杆菌纲(Bacilli)、 β -变形菌纲(Beta-proteobacteria)、 γ -变形菌纲(Gamma-proteobacteria)等纲中,其中,野生人参内生细菌在上述纲中的含量分别为 7%、14%、29%、7%、43%,栽培人参内生细菌在上述纲中的含量分别约为 4%、16%、40%、8%、32%。在目的分类水平上,人参内生细菌主要分布在芽孢杆菌目(Bacillales)、伯克氏菌目(Burkholderiales)、肠杆菌目(Enterobacteriales)、微球菌目(Micrococcales)、假单胞菌目(Pseudomonadales)、根瘤菌目(Rhizobiales)、黄单胞杆菌目(Xanthomonadales)等目中,其中,野生人参内生细菌在上述目中的含量分别为 29%、7%、14%、7%、14%、14%、14%,栽培人参内生细菌在上述目中的含量分别为 40%、8%、12%、4%、12%、16%、8%。在科的分类水平上,野生人参内生细菌主要分布在产碱杆菌科(Alcaligenaceae)(7%)、布鲁氏菌科(Brucellaceae)(7%)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)

(14%)、微杆菌科(Microbacteriaceae)(7%)、类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)(21%)、动性球菌科(Planococcaceae)(7%)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)(14%)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)(7%)、黄单胞杆菌科(Xanthomonadaceae)(14%)等科中;栽培人参内生细菌则多集中在产碱杆菌科(Alcaligenaceae)(8%)、芽孢杆菌科(Bacillaceae)(4%)、慢生根瘤菌科(Bradyrhizobiaceae)(4%)、布鲁氏菌科(Brucellaceae)(4%)、肠杆菌科(Enterobacteriaceae)(12%)、微杆菌科(Microbacteriaceae)(4%)、莫拉菌科(Moraxellaceae)(4%)、类芽孢杆菌科(Paenibacillaceae)(28%)、动性球菌科(Planococcaceae)(8%)、假单胞菌科(Pseudomonadaceae)(8%)、根瘤菌科(Rhizobiaceae)(4%)、未分类根瘤菌科(Rhizobiaceae - unclassified)(4%)、黄单胞杆菌科(Xanthomonadaceae)(8%)等科中。从属的分类水平来看,野生人参内生细菌在无色杆菌属(*Achromobacter*)(7%)、肠杆菌属(*Enterobacter*)(7%)、赖氨酸芽孢杆菌属(*Lysinibacillus*)(7%)、微杆菌属(*Microbacterium*)(7%)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)(7%)、类芽孢杆菌属(*Paenibacillus*)(21%)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)(14%)、根瘤菌属(*Rhizobium*)(7%)、沙雷菌属(*Serratia*)(7%)、寡养单胞菌属(*Stenotrophomonas*)(14.%)等属中均有分布;栽培人参内生细菌多集中于无色杆菌属(4%)、不动菌属(*Acinetobacter*)(4%)、颇陌菌属(*Advenella*)(4%)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)(4%)、包西氏菌属(*Bosea*)(4%)、肠杆菌属(4%)、赖氨酸芽孢杆菌属(4%)、微杆菌属(4%)、苍白杆菌属(*Ochrobactrum*)(4%)、类芽孢杆菌属(28%)、泛菌属(4%)、假单胞菌属(8%)、未分类根瘤菌属(*Rhizobium - unclassified*)(4%)、根瘤菌属(4%)、沙雷菌属(4%)、寡养单胞菌属(8%)、绿芽孢杆菌属(*Viridibacillus*)(4%)等属中。上述数据显示,类芽孢杆菌属、假单胞菌属、寡养单胞菌属在野生人参内生细菌和栽培人参内生细菌中均为优势种群。

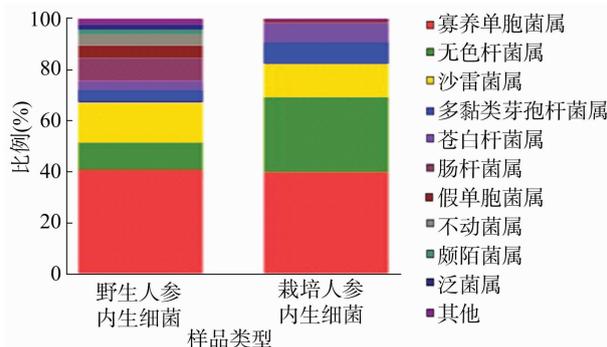


图3 野生、栽培人参内生细菌类群丰度

3 结论与讨论

本研究以河南省栽培人参为代表,利用高通量测序技术进行 16S rRNA 分析野生、栽培人参内生细菌的多样性。结果显示,在野生、栽培人参中内生细菌均具有丰富的遗传多样性,野生人参内生细菌含有类芽孢杆菌属、假单胞菌属、寡养单胞菌属等 10 个细菌属;栽培人参内生细菌含有类芽孢杆菌属、寡养单胞菌属等 17 个细菌属。

该研究结果可以为深入研究,开发人参内生细菌提供理

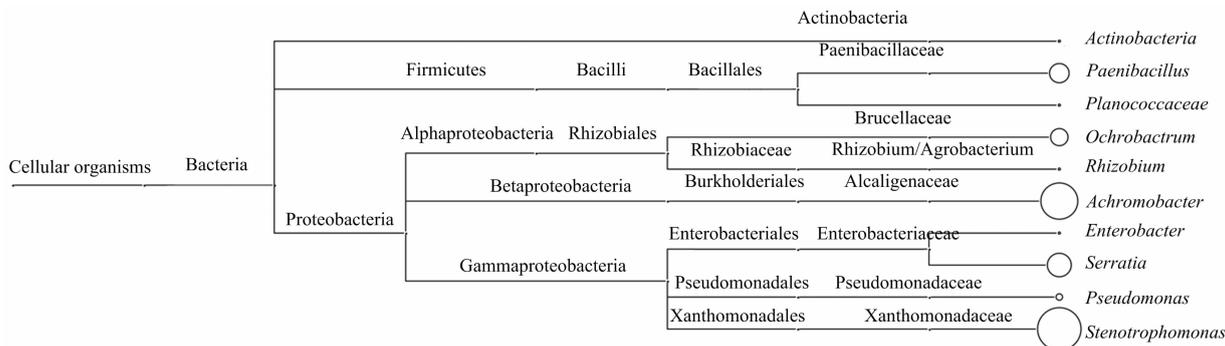


图4 野生人参内生细菌进化树

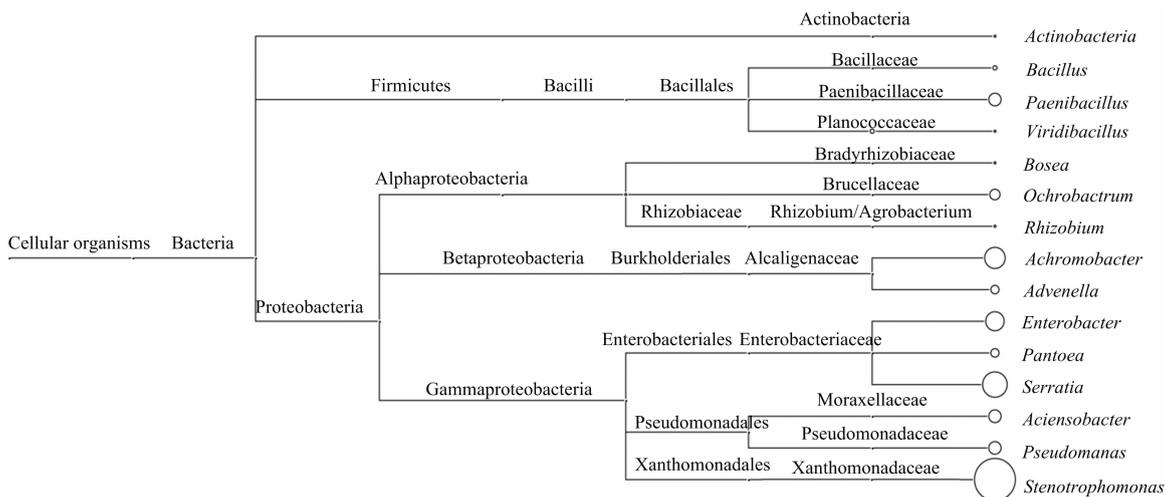


图5 栽培人参内生细菌进化树

论基础和参考依据。

16S rRNA 具有 10 个保守区域和 9 个高变区域,其高变区域随种属的差异而有固定的差异序列,因此,16S rRNA 在研究细菌分类和系统发育等方面被认为是金标准。

人参被称为“百草之王”,药用价值广泛,现代药理研究显示,人参具有抗肿瘤、抗炎症、增加免疫力等作用;但因价格、虫害等因素阻碍了人参的应用及推广。近年来,随着对内生菌研究的深入,人参内生菌中含有与人参功效相似的次生代谢产物,使人参内生菌成为热点研究领域之一^[9]。田磊等从人参内生细菌中筛选到 1 株具有 ACC 脱氢酶活性的荧光假单胞杆菌^[10];王卓等发现 2 种人参内生真菌——GS-4 和 GS-22,其乙酸乙酯粗提物对人宫颈癌 HeLa 细胞具有抑制作用,其半抑制浓度为 60~140 μg/mL,这 2 种真菌分别为半裸镰刀菌、半球菌^[11];姜云等研究了来源于吉林省不同区域的人参内生细菌的多样性,发现人参内生细菌分属于 18 个种属^[12]。虽然有关人参内生细菌的研究较多,但关于野生、栽培人参内生细菌的多样性及其之间的差异性等研究较少。作为人参内生细菌的差异性研究,本研究属于首次。

本研究分析栽培人参与野生人参细菌多样性的差异主要为,栽培人参细菌的丰度略高于野生人参细菌的丰度,栽培人参含有 17 个细菌种属,其中类芽孢杆菌属、寡养单胞菌属等为优势属。这为人参内生细菌的开发和应用奠定了理论基础,也为研究不同产地人参内生细菌的多样性提供参考依据和试验技术,对推广人参栽培具有积极意义。

参考文献:

- [1] 徐家翠. 人参化学成分的药理活性及其含量积累的研究性进展[J]. 药物与人, 2015, 28(1): 43.
- [2] 占颖, 刘春生, 刘洋洋, 等. 人参和三七活性成分与药理作用对比研究进展[J]. 中国中医药科技, 2014, 21(6): 711-712.
- [3] Mao N, Tan R Z, Wang S Q, et al. Ginsenoside Rg1 inhibits angiotensin II-induced podocyte autophagy via AMPK/mTOR/PI3K pathway[J]. Cell Biology International, 2016, 40(8): 917-925.
- [4] Li Y, Yang T, Li J, et al. Inhibition of multiple myeloma cell proliferation by ginsenoside Rg3 via reduction in the secretion of IGF-1[J]. Molecular Medicine Reports, 2016, 14(3): 2222-2230.
- [5] Oh Y, Lim H W, Kim K, et al. Ginsenoside Re improves skin barrier function in HaCaT keratinocytes under normal growth conditions[J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2016, 80(11): 2165-2167.
- [6] Wang J, Chen Y, Dai C, et al. Ginsenoside Rh2 alleviates tumor associated depression in a mouse model of colorectal carcinoma[J]. American Journal of Translational Research, 2016, 8(5): 2189-2195.
- [7] 邵天蔚, 李勇. 利用生防微生物防治人参根部病害的研究进展[J]. 中国现代中药, 2016, 18(3): 383-386.
- [8] Waterman C, Calcul L, Beau J, et al. Miniaturized cultivation of microbiota for antimalarial drug discovery[J]. Medicinal Research Reviews, 2016, 36(1): 144-168.
- [9] 潘晓曦, 关一鸣, 张舒娜, 等. 人参内生菌研究现状与展望[J].

李在建,王旭,龙良启,等. 副猪嗜血杆菌神经氨酸酶序列分析及可溶性表达[J]. 江苏农业科学,2018,46(6):40-42.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.06.010

副猪嗜血杆菌神经氨酸酶序列分析及可溶性表达

李在建^{1,2}, 王旭², 龙良启², 操继跃²

(1. 聊城大学农学院, 山东聊城 252000; 2. 华中农业大学动物医学院, 湖北武汉 430070)

摘要:以副猪嗜血杆菌 *nanH* 为研究对象,对副猪嗜血杆菌不同标准株的神经氨酸酶序列和活性进行分析,同时通过原核表达获得了可溶性表达的有活性的神经氨酸酶。结果表明,副猪嗜血杆菌的神经氨酸酶包含 1 个 RIF 功能域和 2 个 Asp-box 区,其活性区域包括由 Arg163、Arg233 构成的精氨酸三联体、Glu148、Tyr267 和 Asp182; *NanH* 的可溶性表达表明,副猪嗜血杆菌神经氨酸酶以可溶性表达的形式存在,同时使用神经氨酸酶检测试剂盒检测有活性,为进一步研究神经氨酸酶的功能提供依据。

关键词:副猪嗜血杆菌;神经氨酸酶;唾液酸;可溶性表达

中图分类号: S852.61*2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2018)06-0040-03

副猪嗜血杆菌 (*Haemophilus parasuis*, HPS) 是猪呼吸道常在的一种 NAD 依赖的革兰氏阴性菌,属于巴氏杆菌科^[1],显微镜下观察为多种形态的杆状细菌。在某些特殊环境下能入侵机体,从而引发猪的浆液性或纤维素性多发性浆膜炎、关节炎、脑膜炎等,俗称格拉瑟氏病 (Glässer's disease)^[2-3] 或引起猪的急性败血症^[4]。副猪嗜血杆菌病主要影响 2 周~4 月龄的猪,常在仔猪保育阶段发病,发病率一般在 10%~15%,严重时死亡率高达 50%。随着养猪业规模的迅速扩大和养殖模式的改变,近些年流行趋势日趋严重,已成为危害养猪业的主要细菌性病原,造成了大量的经济损失^[5-7]。唾液酸作为细菌代谢中一种重要的分子,一方面可以作为细菌的能量供细菌生存所需,另一方面细菌又可以利用唾液酸作为自己的结构物质与宿主细胞相互作用。

本研究以副猪嗜血杆菌的 *nanH* 基因为研究对象,研究副猪嗜血杆菌不同标准菌株中 *nanH* 序列的差异及神经氨酸酶活性的不同;同时第一次通过大肠杆菌原核表达获得有活性的神经氨酸酶。

1 材料与方法

1.1 载体与质粒

原核表达载体载体 pET-28a(+) 和 pET-32a(+) 购自 Invitrogen 公司。

1.2 工具酶及主要试剂

所有的限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶、DNA Marker、高保

真酶 Pyrobest DNA Polymerase 均购自大连宝生物公司 (TaKaRa)。

PCR 产物纯化试剂盒、DNA 胶回收试剂盒均为 Omega 产品。

BL21 (DE3) pLysS 感受态细胞、质粒小提试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

胰酶大豆琼脂 (TSA)、胰酶大豆琼脂 (TSB) 均购自 Difeo 公司。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD) 购自中国上海化学试剂公司。

琼脂糖、胰蛋白胨以及酵母浸出物等购自 OXOID 公司。

神经氨酸酶检测试剂盒购自碧云天生物制品公司。

1.3 重组质粒的构建

nanH 全长 PCR 纯化回收产物酶切体系 (总体积 50.0 μL) 见表 1。载体 pET-28a(+) 酶切体系 (总体积 50.0 μL) 见表 2。

表 1 *nanH* 全长 PCR 纯化回收产物酶切体系

名称	用量 (μL)
<i>EcoR</i> I	2.2
<i>Xho</i> I	2.3
10 × H Buffer	5.0
纯化回收后 PCR 产物	18.0
双蒸水	22.5

表 2 载体 pET-28a(+) 酶切体系

名称	用量 (μL)
<i>EcoR</i> I	2.2
<i>Xho</i> I	2.3
10 × H Buffer	5.0
pET-28a(+) 质粒	20.0
双蒸水	20.5

收稿日期:2016-10-13

项目来源:聊城大学博士启动基金(编号:318051314)。

作者简介:李在建(1986—),男,山东青州人,博士,讲师,主要从事兽医药理学与微生物学研究, E-mail: lizj8603@163.com; 共同第一作者:王旭(1983—),男,兽医医师,硕士。

人参研究,2014(3):52-55.

[10]田磊,姜云,陈长卿,等. 一株人参内生 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氢酶活性细菌的筛选、鉴定及其对宿主生长的影响[J]. 微生物学报,2014,54(7):760-769.

[11]王卓,于慧美,刘鼎,等. 人参内生真菌的分离及其抗肿瘤活性研究[J]. 中国现代中药,2013,15(9):748-751.

[12]姜云,尹望,陈长卿,等. 人参内生可培养细菌 16S rDNA-RFLP 分析[J]. 东北林业大学学报,2012,40(8):34-39.