16S rDNA 同源性所揭示的双歧杆菌 与有关细菌的亲缘关系*

东秀珠 沈德龙 辛玉华

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

摘 要 本研究测定了低 GC 含量的双歧杆菌(*Bifidobacterium inopinatum*)和新种 *B. thermacidophilum* 的 16S rDNA 全序列,在同另外 19 个双歧杆菌及 8 个相关细菌的 16S rDNA 同源性分析的基础上构建了系统发育树。结果表明,除低 GC 含量的 *B. inopinatum* 外,所有双歧杆菌的种在 16S rDNA 序列相似性 $\geq 92\%$ 的水平上聚类为一个簇群。尽管 *B. inopinatum* 与其它种的双歧杆菌的相似性只有 $87\% \sim 89\%$,但它仍与双歧杆菌的关系最密切,而并未显示出与 GC 含量相近属的特殊亲缘关系。本研究结果未显示出在革兰氏阳性细菌分支中,由低 GC 到高 GC 含量的细菌种群的系统演化模式。此外,研究结果提示在细菌系统发育研究中,由 16S rDNA 序列和基因组 DNA 同源性产生的矛盾需借助于其它保守的生物大分子来澄清。

关键词 双歧杆菌, 16S rDNA 同源性, 系统发育

Phylogenetic relationship between the genus *Bifidobacterium* and related bacteria based on 16S rDNA homology/DONG Xiu_Zhu, SHEN De_Long, XIN Yu_Hua

Abstract In the present study, the 16S rDNA of *Bifidobacterium inopinatum* with low GC content and *B. thermacidophilum* sp. nov. was sequenced. A phylogenetic dendrogram was constructed using the two sequences and other 16S rDNA sequences of 19 *Bifidobacterium* spp. and eight related genera obtained from DNA databases. The results showed that except for *B. inopinatum*, all the bifidobacteria were clustered at similarity levels ($\geq 92\%$) of 16S rDNA sequences. Although *B. inopinatum* showed a relatively lower similarity ($87\% \sim 89\%$) with the other bifidobacteria, it was closely related to the *Bifidobacterium* spp. rather than to other gram-positive bacteria with similar GC content. This study did not reveal the evolutionary pattern from low GC to high GC content in the gram-positive bacterial phylum. In addition, the divergence between 16S rDNA sequence and genomic DNA GC content in the study of bacterial phylogenetics has to be resolved using other conserved microbiological molecules.

Key words *Bifidobacterium*, 16S rDNA homology, bacterial phylogeny

Author's address Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080

双歧杆菌(*Bifidobacterium inopinatum*)是一群革兰氏阳性的严格厌氧细菌,能够发酵葡萄糖产生乙酸和乳酸。它们与其它乳酸细菌的区别在于其利用独特的 6-磷酸-果糖磷酸酮酶途径代谢葡萄糖,而且 DNA 的 GC 含量($55\text{mol}\% \sim 68\text{mol}\%$)也显著高于其它乳酸细菌。自 1899 年 Tissier 首先发现双歧杆菌,至今已有 32 个种被描述。最近, Crociani 等(1996)报道了分离于人牙齿的两个双歧杆菌的新种——*Bifidobacterium inopinatum* 和 *B. denticolans*。这两个种的表现特征符合双歧杆菌属的定义,但发酵的碳水化合物种类却不同于其它的双歧杆菌,如它们可发酵分子量高达 200 000 的葡聚糖。尤其是 *Bifidobacterium inopinatum*,它不发酵多数双歧杆菌可利用的半乳糖,而且其 DNA 的 GC 含量只有 $45\text{mol}\%$,低于其它的双歧杆菌达 10%

以上。

16S rRNA 序列同源性分析(Leblond_Bourget et al. ,1996)表明双歧杆菌是亲缘关系密切的一群菌 ,具备一个独立属的特征。系统发育研究表明双歧杆菌与放线菌的亲缘关系较为密切(Olsen & Woese ,1994) ,应考虑为“ 原始放线菌 ” ,而且与双歧杆菌最近缘的成员是阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*) ,甚至有人认为二者应归为一个属(Embley & Stackebrandt , 1994)。但加德纳氏菌的 GC 含量只有 42mol% , 而且与双歧杆菌的 DNA 同源性也很低。Goodfellow 等(1993)认为当两个分类单位 DNA 的 GC 含量相差 $\geq 10\text{ mol}\%$ ~ $12\text{ mol}\%$ 时应考虑划分为不同属。因而二者的分类关系仍悬而未决 ,在细菌系统发育研究中由 16S rRNA 序列同源性分析与染色体 DNA 同源性分析所得出的结果分歧也未澄清。

本项研究测定了低 GC mol% 的双歧杆菌 *B. inopinatum* 和本实验室分离的新种 *B. thermacidophilum* 的 16S rDNA 全序列 ,在此基础上分析了它们与双歧杆菌其它成员及 *Gardnerella*、*Corynebacterium* 和 *Propionibacterium* 等有关菌群的系统发育关系 ,并试图阐明低 GC mol% 的双歧杆菌——*B. inopinatum* 在低 GC mol% 和高 GC mol% 的革兰氏阳性细菌系统发育分支中的位置。

1 材料和方法

1.1 细菌菌株

菌株 *Bifidobacterium inopinatum* DSM10107^T 由德国微生物和细胞培养物保藏中心(DSMZ)惠赠 ;双歧杆菌的新种 *B. thermacidophilum* AS. 1.2282^T(Dong et al. ,2000)是本实验室分离于处理豆腐废水厌氧反应器中的菌株。

双歧杆菌菌株培养于预还原的 TPYG 培养基上 ,培养基分装于带丁基橡胶塞的厌氧试管中 ,N₂ 作为气相 ,培养温度为 37℃。

1.2 DNA 的提取和纯化

染色体 DNA 的提取和纯化采用改良的 Marmu(1961)方法。由于双歧杆菌的细胞壁很难用溶菌酶和 SDS 裂解 ,因而在生长的对数期加入青霉素 G (终浓度为 0.5 mg/ml)后再继续培养 16 ~ 20 h。为了获得高产量的 DNA 丝 ,用蛋白酶 K(终浓度 100 $\mu\text{g/ml}$)在 37℃ 作用 1.5 ~ 2 h ,以替代苯酚去除蛋白质。

1.3 16S rDNA 的 PCR 扩增和克隆

用上述制备的染色体 DNA 作为 PCR 扩增的模板。PCR 的 2 个扩增引物 27(5'AGAGTTT-GATCTGGCTCAG3')和 1541r (5'AAGGAGGTGATCCAG_CC3')分别位于 16S rDNA 的 8 ~ 27 和 1525 ~ 1541 位的碱基片段(以 *E. coli* 的 16S rDNA 碱基位置为准)。PCR 反应体系(50 μl)含如下成分 :DNA 模板 ,约 300 ng ;dATP ,dCTP ,dGTP 及 dTTP 各 100 μmol ;Mg²⁺ ,2.5mmol/L ;2 个引物各 40 pmol 和 2.5 U *Taq* DNA 聚合酶。PCR 扩增条件是 94℃ 变性 5 min。之后的 30 个循环包括 94℃ 变性 1 min ,52℃“ 退火 ”1 min ,72℃ 延伸 3 min。30 个循环完成后在 72℃ 保温 2 ~ 3 h。PCR 扩增反应在 Thermolyn DNA 扩增仪(Barnstead Thermolyn ,Dubuque 美国)上完成。*Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 购于华美生物工程公司。PCR 扩增引物在微生物所技术中心合成。

PCR 产物按经典方法通过电泳分离和电洗脱纯化后 ,按 Harrison 的方法连接到质粒 pSK_T 载体上。带有 16S rDNA 片段的重组质粒被转化到 *E. coli* DH5 α 中。质粒 pSK_T 由中科院微生物所陈晓英惠赠。

1.4 16S rDNA 序列分析

含 16S rDNA 的 pSK_T 重组质粒用 PEG_8000 沉淀法提取和纯化。序列分析在中科院微

生物所技术中心完成。序列测定反应采用 Sanger 双脱氧链终止法 ,用 PE 公司的 Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction 试剂盒进行 ,并在 ABI 373A_18 DNA 测序仪上完成序列分析。

1.5 数据分析和系统发育树的构建

将测定的 2 个 16S rDNA 序列和从 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中得到的 27 个 16S rDNA 序列(表 1)通过软件 Clustalw (版本 1.5)进行校准排齐 ,用 PHYLIP 3.5 软件包(Felsenstein ,1993)中的 DNADIST 软件计算相似性 ,并转化为 Jukes_Cantor 系数的距离矩阵。用同一软件包中的 Fitch 方法产生树状图 ,树状图的构型用 Sequenceboots 软件进行 Bootstrap 值的分析和评价。

表 1 用于构建系统发育树的双歧杆菌和有关细菌的 16S rDNA 序列

Table 1 16S rDNA sequences of the genus *Bifidobacterium* and related bacteria used for constructing a phylogenetic tree

菌种名称 Species	菌株号 Strains	GenBank/EMBL/DDBJ 序列注册号 Accession no.
<i>Atopobium minutum</i>	NCFB 2751 ^T	X67148
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	ATCC 43734	U87823
<i>C. pseudogenitalium</i>	ATCC 33035	U87822
<i>C. genitalium</i>	ATCC 33031	U87818
<i>Nocardia asteroides</i>	ATCC 19247 ^T	Z36934
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	DSM 20271	X53217
<i>P. acnes</i>	1747	M61903
<i>Gardnerella vaginalis</i>	ATCC 14018	M58744
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703 ^T	M58744
<i>B. bifidum</i>	ATCC 29521 ^T	S83624
<i>B. asteroides</i>	ATCC 29510 ^T	M58730
<i>B. breve</i>	ATCC 15700 ^T	M58731
<i>B. catenulatum</i>	ATCC 27539 ^T	M58732
<i>B. coryneforme</i>	ATCC 25911 ^T	M58733
<i>B. dentium</i>	ATCC 27534 ^T	M58735
<i>B. indicum</i>	ATCC 25912 ^T	M58737
<i>B. infantis</i>	ATCC 15697 ^T	X70974
<i>B. longum</i>	ATCC 15707 ^T	M58739
<i>B. magnum</i>	ATCC 27540 ^T	M58740
<i>B. minimum</i>	ATCC 27538 ^T	M58741
<i>B. pseudolongum</i>	ATCC 25526 ^T	M58742
<i>B. suis</i>	ATCC 27533 ^T	M58743
<i>B. cuniculi</i>	ATCC 27916 ^T	M58734
<i>B. globosum</i>	ATCC 25865 ^T	M58736
<i>B. thermophilus</i>	ATCC 25525 ^T	U10151
<i>B. animalis</i>	ATCC 25527 ^T	X70971
<i>B. lactis</i>	DSM 10140 ^T	X89513
<i>B. thermacidophilum</i>	AS 1.2282 ^T	ABO16246 [*]
<i>B. inopinatum</i>	DSM 10107 ^T	ABO29087 [*]

* 本研究完成的 16S rDNA 序列测定 * 16S rDNA sequences determined in this study

1.6 16S rDNA 序列的注册号

本研究中测定的 *B. inopinatum* 和 *B. thermacidophilum* sp. nov. 的 16S rDNA 序列已送 GenBank/EMBL/DDBJ 数据库中 ,注册号分别是 ABO29087 和 ABO16246。

2 结果和讨论

本研究测定了 *B. inopinatum* 和 *B. thermacidophilum* 的 16S rDNA 全序列 ,在长度为 1462 bp 的序列同源性分析基础上 ,以位于高 GC 革兰氏阳性细菌进化分支最根部的 *Atopobium minutum* 作为外群 ,构建了包括 *Bifidobacterium* , *Gardnerella* , *Corynebacterium* 及 *Propionibacterium* 等 29 个模式菌的系统发育树(图 1) ,并分析了它们间的亲缘关系。结果如下 :

图 1 以 16S rDNA 序列为基础的系统发育树状图
Fig. 1 Phylogenetic dendrogram based on 16S rDNA sequences

图中显示了双歧杆菌种间的亲缘关系及同其它有关菌群的亲缘关系。树状图通过 PHYLIP 软件包中的 Fitch 方法构建 ,并以 *Atopobium minutum* 作为外群。分支节点上的数字表示每 100 次 bootstrap 分析所支持的次数。线段(1%)表示 1% 序列差异的分支长度。
The figure shows the relationship of *Bifidobacterium* species as well as of related bacterial genera. The tree was rooted with *Atopobium minutum* and constructed using Fitch method in PHYLIP software package. Each number on a branch indicates the bootstrap value (100 replicates). Bar = 1% sequence divergence.

2.1 双歧杆菌种间的系统发育关系

以 16S rDNA 序列同源性为基础的系统发育关系表明双歧杆菌(除 *B. inopinatum*)在 16S rDNA 序列相似性 $\geq 92\%$ 的水平上构成一个独立的进化分支,而与所比较的其它细菌的相似性 $\leq 82\%$ (表 2),说明双歧杆菌是一个界限定义明确的属。

低 GC 含量的 *B. inopinatum* 与其它双歧杆菌的 16S rDNA 序列相似性只有 87%~89%,形成了一个独立的分支,与低 GC 含量的 *Gardnerella* 及 *Atopobium* 的相似性分别为 88% 和 76%(表 2),因而它仍与双歧杆菌的亲缘关系最近。综合 *B. inopinatum* 与其它双歧杆菌的 GC 含量的差异(10 mol%~22 mol%),低的染色体 DNA 同源性(4%~21%) (Crociani et al., 1996) 及独特的糖发酵特征,应考虑将 *B. inopinatum* 另立为一个独立的属。在本研究中以 16S rDNA 同源性为基础的系统发育分析表明除 *B. inopinatum* 外的其它双歧杆菌分为 4 个亚簇(1)嗜热双歧杆菌亚簇,由 *B. thermophilus* 和新种 *B. thermacidophilum* 在 95% 相似性水平上聚类(2)动物和乳制品来源的双歧杆菌亚簇,在 93%~97% 相似性水平上聚类,包括 *B. magnum*, *B. globosum*, *B. lactis*, *B. animalis* 和 *B. cuniculi*(3)蜜蜂和污水来源的亚簇,包括 *B. coryneforme*, *B. asteroides* 和 *B. minimum*,其相似性为 95%~97%(4)以人来源为主的亚簇,包括 *B. adolescentis*, *B. dentium*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. suis*, *B. catenulatum* 和 *B. breve*,其相似性 $\geq 94\%$ 。*B. bifidum* 位于一个较为独立的分支,它与其它双歧杆菌的 16S rDNA 序列相似性最高只有 95%,这与它独特的表观特征是吻合的,而且染色体 DNA 同源性分析也证实了这点(Lauer & Kandler, 1983)。

亚簇 4 中的 *B. infantis* 与 *B. longum* 及 *B. suis* 与 *B. longum* 间的相似性水平高达 99%,而两组间的染色体 DNA 同源性分别为 70% 左右,因此可将 16S rDNA 同源性为 99% 作为双歧杆菌种的划分界限(见表 2)。应当指出的是数据库中注册的 *B. pseudolongum* 和 *B. indicum* 的序列有误(Miyake et al., 1998),虽然它们与 *B. longum* 和 *B. infantis* 的 16S rDNA 序列相似性水平都高达 99%,但染色体 DNA 同源性只有 22% 和 18%(Lauer & Kandler, 1983)。

2.2 双歧杆菌与有关菌群的系统发育关系

由图 1 可知, *Gardnerella vaginalis* 与双歧杆菌在 16S rDNA 序列相似性 91%~94% 的水平上聚类为一个进化分支,然而由于二者的 GC 含量相差 13mol%~25mol%, van Esbroeck 等(1996)认为二者不能并为一个属。Stackebrandt 等(1997)提议根据 16S rDNA 同源性将两个属置于新科——双歧杆菌科中,但二者的分类地位和亲缘关系需经进一步的研究才能确定。

Gupta 等(1998, 1999)曾通过某些蛋白质中是否存在保守的信号序列,去推测原核生物各种群间的进化关系。他们选择测定了在不同进化分支的光合细菌中是否存在 Hsp70 和 Hsp60 的信号序列,并根据它们的同源性认为原核生物的各个进化分支起源于同一祖先,并按如下路线进化:低 GC 革兰氏阳性细菌→高 GC 革兰氏阳性细菌→异型球菌→栖热菌→绿色非硫细菌→蓝细菌→螺旋体→衣原体→噬纤维菌→产液菌→黄杆菌→绿色硫细菌→革兰氏阴性细菌。然而本研究中的 16S rDNA 系统发育分析结果并未显示出这种进化模式,而且在构建的系统发育树(图 1)中,几个低 GC 含量的种——*B. inopinatum*, *Gardnerella vaginalis* 和 *Atopobium minutum* 之间的 16S rDNA 序列相似性只有 76%~88%,并未显示出较其它高 GC 含量分类单位更近的系统发育关系。这可能是尽管它们的染色体 DNA 碱基含量相近,但携带的遗传信息尤其是反映进化关系的信息分子并不相关。因而要想阐明在细菌系统发育研究中,由 16S rDNA 同源性 and 染色体 DNA 同源性分析所产生的矛盾仍需对更多的物种进行研究,并且需借助于更多的能反映物种亲缘关系的生物大分子的同源性研究。

Strain	<i>B. adonis</i>	<i>B. asteroides</i>	<i>B. brevis</i>	<i>B. catenulatum</i>	<i>B. coryneforme</i>	<i>B. dentatum</i>	<i>B. indicus</i>	<i>B. infanticum</i>	<i>B. longum</i>	<i>B. minimum</i>	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. subcutis</i>	<i>B. globosum</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>B. animalis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Gardnerella vaginalis</i>	<i>B. thermophilophilum</i>	<i>B. inopinatum</i>	<i>Corynebacterium jeikeium</i>	<i>C. pseudogenitale</i>	<i>C. genitali</i>	<i>Propionibacterium acnes</i>	<i>P. pseudoterricola</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<i>B. adonis</i>	100																									
<i>B. asteroides</i>	94	100																								
<i>B. brevis</i>	95	94	100																							
<i>B. catenulatum</i>	94	94	93	100																						
<i>B. coryneforme</i>	94	94	92	94	100																					
<i>B. dentatum</i>	94	94	95	94	94	100																				
<i>B. indicus</i>	94	94	93	97	92	94	100																			
<i>B. infanticum</i>	94	94	93	94	93	93	93	100																		
<i>B. longum</i>	93	92	93	94	93	93	93	93	100																	
<i>B. minimum</i>	92	92	94	93	93	94	93	93	93	100																
<i>B. pseudolongum</i>	92	92	94	93	93	94	93	93	93	93	100															
<i>B. suis</i>	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	100														
<i>B. subcutis</i>	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	100													
<i>B. thermophilum</i>	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	93	100												
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	82	82	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	100											
<i>C. pseudogenitale</i>	82	82	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	100										
<i>C. genitali</i>	82	82	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	100									
<i>Propionibacterium acnes</i>	82	82	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	100								
<i>P. pseudoterricola</i>	82	82	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	100							
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	82	82	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	83	100						

参 考 文 献

- Crociani F , Biavati B , Alessandrini A , Chiarini C , Scardovi V , 1996. *Bifidobacterium inopinatum* sp. nov. and *Bifidobacterium denticolens* sp. nov. , two new species isolated from human dental caries. *International Journal of Systematic Bacteriology* , **46** :564 ~ 571
- Dong X , Xin Y , Jian W , Liu X , Ling D , 2000. *Bifidobacterium thermacidophilum* sp. nov. , isolated from an anaerobic digester. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* , **50** :119 ~ 125
- Embley T M , Stackebrandt E , 1994. The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology* , **48** :257 ~ 289
- Felsenstein J , 1993. PHYLIP_ (Phylogeny Inference Package) Version 3.5 , Department of Genetics. University of Washington : Seattle
- Goodfellow H , O'Donnell A G (eds.) , 1993. Handbook of New Bacterial Systematics. London : Academic Press 3 ~ 54
- Gupta R S , 1998. Protein phylogenies and signature sequences : a reappraisal of evolutionary relationships among *Archaeobacteria* , *Eubacteria* and *Eukaryotes*. *Microbiology and Molecular Biology Review* , **62** :1435 ~ 1491
- Gupta R S , Mukhtar T , Singh B , 1999. Evolutionary relationship among photosynthetic prokaryotes (*Helioobacterium chlorum* , *Chloroflexus aurantiacus* , cyanobacteria , *Chlorobium tepidum* and *proteobacteria*) : implications regarding the origin photosynthesis. *Molecular Microbiology* , **32** :893 ~ 906
- Lauer E , Kandler O , 1983. DNA-DNA homology , murine types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology* , **4** :42 ~ 64
- Leblond_Bourget N , Philippe H , Mangin I , Decaris B , 1996. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter_ and intra_specific *Bifidobacterium* phylogeny. *International Journal of Systematic Bacteriology* , **46** :102 ~ 111
- Marmur J , 1961. A procedure for the isolation of deoxy_ribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology* , **3** :208 ~ 218
- Miyake T , Watanabe K , Watanabe T , Oyaizu H , 1998. Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiology and Immunology* , **42** :661 ~ 667
- Olsen G J , Woese C R , 1994. The winds of evolutionary change : breathing new life into microbiology. *Journal of Bacteriology* , **176** :1 ~ 6
- Stackebrandt E , Rainey F A , Ward_Rainey N L , 1997. Proposal for a new hierarchic classification system , *Actinobacteria classis nov.* *International Journal of Systematic Bacteriology* , **47** :479 ~ 491
- Van Esbroeck M , Vandamme P , Falsen E , 1996. Polyphasic approach to the classification and identification of *Gardnerella vaginalis* and unidentified *Gardnerella vaginalis*_like coryneforms present in bacterial vaginosis. *International Journal of Systematic Bacteriology* , **46** :675 ~ 682

(本文责任编辑 :王美林)