

短状杆菌的 DNA 分子杂交与分类学研究

方呈祥

(武汉大学生命科学学院, 武汉 430072)

横田明¹⁾ 武内真理子

(日本大阪发酵研究所)

摘要 利用非放射性光敏生物素标记 DNA 分子与固定在微稀释板上的热变性单链 DNA 杂交的方法, 对短状杆菌 (*Brachybacterium*) 15 个菌株的染色体 DNA 进行分子杂交. 通过测定荧光强度, 确定 DNA 间的同源值. 根据其遗传相关性, 对难以从形态特征、生理生化特性等进一步分类的细菌在种的水平上定论, 确定其应有的分类位置. 光敏生物素标记 DNA, 在微稀释板上进行分子杂交是一种准确、快速的杂交技术, 在短状杆菌的分类学研究中起着决定性的作用.

关键词 光敏生物素、微稀释板、短状杆菌、DNA 同源值、分类学

自 60 年代初 Bolton 等^[1]分别创建在溶液中和琼脂上进行核酸杂交方法以来, DNA 分子杂交技术相继建立^[2,3]. 这些方法需用放射性物质, 经过缺口翻译或随机引物等标记 DNA 分子, 实验条件要求严格. 80 年代陆续发展了非放射性同位素标记 DNA 技术^[4,5]. 用光敏生物素 (photobiotin) 标记 DNA 在滤膜上进行分子杂交, 成功地应用于分子生物学等领域^[6]. 最近, Ezaki 等^[7]对该技术作了进一步地改进, 用微稀释板 (microdilution plate) 取代滤膜, 避免了后者需过多洗涤的弊病, 定量地测定不同 DNA 间的同源值, 确定其遗传的相关性, 成为微生物分类学研究中一种有效的方法.

短状杆菌属 *Brachybacterium* 是一类革兰氏阳性菌. 1988 年由 Collins 等^[8]建立. 不久, Gvozdyak 等^[9]鉴定 *B. nesterenkovi* 为该属的一个新种. Schleifer 等^[10]曾建议几株细菌划归该属. 迄今, 短状杆菌共有 15 个菌株. 形态学的研究和生理生化试验结果表明这些菌株相似, 同时细胞壁、枝菌酸和甲基萘醌等化学分类指征相同, 难以对这些菌株进一步分类.

本文报道用非放射性光敏生物素标记 15 株短状杆菌的染色体 DNA, 在微稀释板上进

行分子杂交, 测其 DNA 间的同源程度, 确定这些菌株应有的分类地位.

1 材料和方法

1.1 微生物菌株

所有的实验菌株均由日本大阪发酵研究所提供. 菌株名称及其编号见表 1.

15 个菌株在 PY-BHI 培养液 (蛋白胨 10 g, 酵母浸出汁 2 g, NaCl 2 g, 脑心浸出汁 2 g, 葡萄糖 2 g, 蒸馏水 1000 ml, pH7.0) 中 28℃ 振荡培养.

1.2 DNA 的制备

参考 Saito^[11]的方法. 培养 48 h 的菌液经 4000 r/min 离心 15 min, 收集菌体, 用无色肽酶、溶菌酶和 SDS 处理裂解细胞, 经紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度.

1.3 DNA/DNA 分子杂交

按 Ezaki^[7]的方法进行.

1.3.1 单链 DNA 的固定: 一定浓度的 DNA 样品经 100℃ 5 min 处理使 DNA 变性, 迅速冷却后, 用 PBSM (100 mmol/L MgCl₂, 8 mmol/L Na₂PO₄, 1.5 mmol/L KH₂PO₄,

¹⁾Institute of Molecular and Cellular Biosciences, the University of Tokyo, Japan.

收稿日期: 1995-07-11, 修回日期: 1995-10-09

137 mmol/L NaCl, 2.7 mmol/L KCl, pH7.2) 液稀释至 10 mg/L, 直接加入微稀释板的反应孔内 (每孔的 DNA 含量为 1 μ g),

室温放置 3~4 h 后, 去掉溶液, 将微稀释板置 55~60℃ 过夜, 用鲑鱼 DNA 作对照.

表 1 实验菌种名称及其编号

菌种名称	IFO ¹⁾ 编号	其他编号
<i>Brachybacterium faecium</i>	15223	NCIB 9895
<i>Brachybacterium faecium</i>	14762 ^T	NCIB 9860 ^T
<i>Brachybacterium faecium</i>	15224	NCIB 9861 ^T
<i>B. nesterenkovi</i>	15384 ^T	IMV Ac-752 ^T
<i>Brachybacterium sp.</i>	15203	H-6S ^T
<i>Brachybacterium sp.</i>	15464	CCM 4385
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15262	CCM 2135 IAM 1470, Komagata 5-7, ATCC 19012
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15263	CCM 2134 IAM 1452, Komagata 5-3, ATCC 19101
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15266	CCM 2136 IAM 1448
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15267	CCM 2137 IAM 1480
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15471	CCM 2511
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15472	CCM 2589 ^T AJ 1015 ^T , Komagata 5-2 ^T
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15473	CCM 2590 AJ 1018, Komagata 6-3
" <i>Micrococcus roseus</i> "	15264	NCTC 7281
" <i>Micrococcus conglomeratus</i> "	15265	CCM 2432 NTCT 7567

¹⁾ Insitute for Fermentation, Osaka 大阪发酵研究所, T: 模式菌株.

1.3.2 光敏生物素标记 DNA: 另取 10 μ l DNA 样品 (浓度为 0.5 mg/L) 加入 5 μ l 的光敏生物素溶液 (1 mg/L) 混合, 在太阳灯下照射 15 min, 再加入 1 mmol/L Tris-HCl (pH9.0) 使其体积增加到 100 μ l, 用 2-丁醇除去多余的生物素. 标记的 DNA 热变性后, 迅速冷却, 待用.

1.3.3 DNA 分子杂交: 在微稀释板的孔内各加入 200 μ l 的预杂交液, 30 min 后去掉该液, 加入 100 μ l 的杂交液. 将微稀释板置 50~60℃ 保温 3 h. 去掉杂交液, 每孔加入 100 μ l 的 β -D-半乳糖苷酶-抗生蛋白链霉素液. 37℃ 保温 30 min. 用 PBS 液洗 3 次, 每孔再加 100 μ l 4 mol/L UF- β -D 半乳吡喃糖苷液, 最后测定各个孔的荧光强度, 计算出相应 DNA 的同源值.

2 结果与讨论

15 个菌株染色体 DNA 间的分子杂交结果详见表 2. 虽然这些菌株具有相同的形态特征, 为短杆状, 在新鲜的培养基上生长 6 h 后细胞则出现卵形、短杆状等形态, 它们的生理生化特征相似, 细胞壁类型为 4A γ , 均含有甲基萘醌 MK-7, DNA G + C mol% 为 70.2% ~ 71.6%, 但是根据 DNA 的同源值, 15 个菌株分为 5 个类型. 其中 IFO 14762^T、IFO 15224 和 IFO 15203 3 个菌株的 DNA 分别与其他 14 个菌株 DNA 间不表现出高度的同源性, 其同源值均在 50% 以下, 因此, 它们各自为单独的类型. 菌株 IFO 15265 和 IFO 15384^T 两者 DNA 具有高水平的同源值, 在 95% 以上, 而与其他 13 个菌株表现低水平的同源性, 同

源值均低于 40%，这两个菌株应为同一类型。*Brachybacterium faecium* IFO 15223 和 9 个 *Micrococcus* 菌株 (IFO 15464、IFO 15262、IFO 15263、IFO 15266、IFO 15267、IFO

15471、IFO 15472、IFO 15473 和 IFO 15264) DNA 间的同源性较高, 在 65% 以上, 而与前面所述的 4 个类型 DNA 的同源值均低于 40%, 因此这 10 个菌株应属于另一相同的类型。

表 2 DNA/DNA 的同源性

菌种编号	%								
	IFO 15223	IFO 14762 ^T	IFO 15224	IFO 15384 ^T	IFO 15203	IFO 15464	IFO 15262	IFO 15266	IFO 15265
15223	100	49	31	19	32	125	103	104	23
14762 ^T	17	100	19	5	28	26	27	28	18
15224	13	19	100	12	11	14	14	14	19
15384 ^T	5	5	21	100	7	5	3	20	98
15203	9	11	5	3	100	9	8	31	13
15464	78	12	17	7	11	100	73	66	31
15262	71	14	10	10	9	61	100	71	36
15263	61	9	16	8	7	57	76	69	2
15266	76	30	20	26	34	59	83	100	5
15267	87	32	26	20	23	95	105	98	8
15471	66	12	17	15	38	95	83	70	30
15472	70	12	19	10	17	87	76	82	14
15473	93	22	17	14	12	81	99	79	18
15264	83	25	26	16	17	96	94	80	34
15265	24	27	32	92	6	31	35	38	100

Schleifer 等^[10]在研究 *Brachybacterium* 菌株 DNA 分子杂交后, 曾建议 DNA-DNA 的同源值在 65% 是不同亚种的代表值. 我们的研究表明短状杆菌属的 15 个菌株所分的 5 个不同的类型之间 DNA 同源值均低于 65%, 而同一类型的同源值高于 65%. 因此 5 个不同的类型实际上就是 5 个不同的种. “*Micrococcus conglomeratus*” IFO 15265 与短状杆菌 *B. nesterenkovi* IFO 15384^T 的亲缘关系很近, 划归为同一个种. *Brachybacterium* sp. IFO 15203 与其他 14 个菌株 DNA 的同源值最高只有 32%, 亦归为该属中单独的种. *B. faecium* IFO 15223、IFO 14762^T 和 IFO 15224 3 个菌株 DNA 间的同源值远低于 50%, 因此它们为

短状杆菌属中不同的 3 个种, 后两个种分别与其他 14 个菌株 DNA 的同源值很低, 为 2 个独立的种, 而前者则与剩下的 9 个菌株有较近的亲缘关系, 为相同的种.

由此可见, DNA-DNA 分子杂交的同源值可以将形态特征相同、生理生化特性相似、难以进一步在种的水平上定论的短状杆菌确定其应有的分类地位. 同时, 光敏生物素标记 DNA 在微稀释板上进行分子杂交不仅较其他核酸杂交方法操作简单、节省时间, 在 24 h 内可完成几个甚至几十个 DNA 样品间的分子杂交, 而且能准确地测定其 DNA 的同源值. 这正是细菌分类学研究所需的重要指征, 在细菌种间和种内水平上的划分起着决定性的作

用. 这种方法适合于短状杆菌乃至其他细菌的分类与鉴定的研究.

致谢 日本松前国际友好基金会慷慨提供方呈祥先生的留日资助; 本项研究得到了日本大阪发酵研究所所长 Toru Hasegawa 博士的支持与指导; Tomohiko Tamura 先生在技术上予以一定的协助.

参 考 文 献

- 1 Bolton E T, Mc Carthy B J. *Pro Natl Acad Sci USA*. 1962; 48: 1390
- 2 Gillespie D, Spiegelman S. *J Mol Biol*, 1965; 12: 829
- 3 de Ley J, Cattoir H, Reynaerts A. *Eur J Biochem*, 1970; 12: 133
- 4 Renz M, Kurz C. *Nucleic Acids Res*, 1984; 12: 3435
- 5 Gebeyehu G, Rao P Y, SooChan P *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 4513
- 6 Forster A C, McInnes J L, Skingle D C *et al*. *Nucleic Acids Res*, 1985; 3: 745
- 7 Ezaki T, Hashimoto Y, Yabuuchi E *et al*. *Int J Syst Bacteriol*, 1989; 39: 224
- 8 Collins M, Brown J, Jones D. *Int J Syst Bacteriol*, 1988; 38: 45
- 9 Gvozdyak O R, Nogina T M, Schumann P. *Int J Syst Bacteriol*, 1992; 42: 74
- 10 Schleifer K-H, Lang K. *FEMS Microbiol Lett*, 1980; 9: 223
- 11 Saito H, Miura K. *Biochim Biophys Acta*, 1963; 72: 619

The Study of DNA Molecular Hybridization and Taxonomy of *Brachybacterium*. Fang Chengxiang (*School of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China*); Akira Yokota, Mariko Takeuchi (*Institute for Fermentation, Osaka, Japan*).

Abstract DNA molecular hybridization of chromosomal DNA among 15 strains of *Brachybacterium* were carried out by the method in which DNA labeled with nonradioactive photobiotin was binded to heat denatured single-stranded DNA in microdilution plates. Homology values among bacteria were obtained by measuring fluorescence intensity in the microdilution wells. The strains which is difficult to further classify at the species level with morphological, physiological and biochemical characteristics were determined their appropriate taxonomic positions on the basis of the genetic relatedness among microorganisms. This method is a rapid and accurate hybridization technique and plays diagnostic role on the taxonomic study of *Brachybacterium*.

Key words photobiotin, microdilution plate, *Brachybacterium*, DNA homology values, taxonomy

克隆化反向杂交探针的制备*

李卫国 栾旭东 黄涛 朱宁宁 秦学斌 黄尚志 龙桂芳¹⁾ 沈岩²⁾ 吴冠芸²⁾

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京 100005)

摘要 反向斑点杂交是将寡核苷酸探针固定在膜上, 用标记的靶序列与固定在膜上的探针进行杂交. 与正向杂交相比, 它通过一次杂交即可确定多种基因型, 是一种快速筛查 DNA 点突变的诊断方法. 我们选择 β -地中海贫血基因 - 28 (A $\rightarrow$ G)、CD17 (A $\rightarrow$ T)、CD 41~42 (-TTCT) 三种点突变为模型. 采用 PCR 扩增产生串联多拷贝序列探针并将其克隆化. 将克隆化探针固定于尼龙膜上, 与同位

* 863 计划和美国中华医学基金 (CMB) 资助. ¹⁾ 广西医学院, 南宁 530027; ²⁾ 通讯联系人.

收稿日期: 1995-07-26, 修回日期: 1995-10-26