16S 与 *gyrB* 基因联合建树快速鉴定一株蜡样芽孢杆菌

傅 奇，甘美裕，王 艳，林俊杰，卢源钦，肖玉娟*

（厦门华厦学院，福建 厦门 361024）

摘要：开发一种可用于保守序列相似度较高的菌群快速鉴定的方法，并用其鉴定一株从土壤采集的芽孢杆菌。从厦门市同安国家农业科技园区施用动物肥的种植区采集土壤，稀释涂布平板，分离纯化菌株后，扩增 16S 与 *gyrB* 基因序列并测序，在 Genbank 选择序列相似的 ATCC 菌株进行比对，将 16S 序列与 *gyrB* 序列线性拼接后，利用 Paup* 4.0 构建进化树，通过生理生化实验对鉴定结果进行验证。在 16S 序列与 *gyrB* 基因序列单独建树均无法鉴定到种的情况下，通过 16S 与 *gyrB* 碱基线性拼接序列联合建树，将土壤中分离得到的芽孢杆菌 HX2016002 鉴定为蜡样芽孢杆菌，该方法所构建的进化树自展值高，鉴定结果与生理生化实验一致。对 Genbank 中已知的蜡样芽孢杆菌序列建树分析表明，该方法在蜡样芽孢杆菌中具有普适性。利用 16S 与 *gyrB* 基因拼接序列联合建树，在保守序列相似度高的属内菌种鉴定中具有进一步研究的价值。

关键词：16S；*gyrB*；进化树；蜡样芽孢杆菌

中图分类号：Q 939　**文章编号**：1673-1689(2021)10-0098-06　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2021.10.013

Rapid Identification of a *Bacillus cereus* Strain with Phylogenetic Tree Based on Combination of 16S and *gyrB* Gene

FU Qi，*GAN Meiyu*，*WANG Yan*，*LIN Junjie*，*LU Yuanqin*，*XIAO Yujuan**

（Xiamen Huaxia University, Xiamen 361024, China）

Abstract: This work was aimed to develop a method for rapid identification of bacteria with high similarity of conserved sequences in DNA, and to identify a *Bacillus* strain collected from soil. The prokaryote strain was isolated and purified from the soil after diluting and coating the plate, which collected from the planting area with animal fertilizer in Tong'an National Agricultural Science and Technology Park, Xiamen. The 16S and *gyrB* gene of the strain were amplified by PCR and sequenced. The ATCC strains with similar sequences selected from Genbank were compared. After the 16S sequence and the *gyrB* sequence were linearly spliced, the phylogenetic tree was constructed with Paup*4.0, and the identification results were verified by physiological and biochemical methods. The 16S sequence and *gyrB* gene sequence were constructed separately, however, the strain was failed to be identified to specie level. After the joint construction, the *Bacillus* HX2016002

收稿日期：2020-03-09

基金项目：福建省中青年教师教育科研项目(科技类)(JAT200878；JAT200866)；生化制药福建省高校工程研究中心开放研究课题资助项目(SHZY202005)。

* **通信作者**：肖玉娟(1986—)，女，硕士，副教授，主要从事食品微生物学方面的研究。E-mail：xyj@hxxy.edu.cn

isolated from soil was identified as *Bacillus cereus*. This method obtained a high self-expanding phylogenetic tree, and the identification results were consistent with the physiological and biochemical experiments. The sequence analysis with the known *Bacillus cereus* in Genbank showed that the method was generally applicable in *Bacillus cereus* identification. The phylogenetic tree based on the combination of 16S and *gyrB* gene has the value of further research in the identification of genus strains with high conserved sequence similarity.

Keywords: 16S, *gyrB*, phylogenetic tree, *Bacillus cereus*

作为细菌鉴定最常用的方法，16S rDNA/RNA 测序具有快速、简便、准确等优点，但在部分类群中 16S 序列存在高度相似性，无法准确定位到种[1]。尤其在芽孢杆菌属中，由于种间序列高度相似，无法单独依靠 16S 序列对菌种进行鉴定，通常需要结合其他数据进行分析，如通过 3′端 16S rDNA 和 5′端 16S–23S ITS 核苷酸序列结合构建进化树进行分类[2]，再结合 DNA 杂交进行分析[3]；或 16S、*gyrA*、*gyrB* 基因序列分别比对、建树[4]。

蜡样芽孢杆菌作为一种条件致病菌，可产生多种毒素，导致腹泻或呕吐[5]，是食品中的一类重要致病菌，施用动物肥的果蔬容易受污染。目前蜡样芽孢杆菌主要通过生化实验进行鉴定，耗时较长，开发快速准确的分子鉴定方法有助于缩短检测周期。*gyrB* 基因作为一种细菌中的常见保守序列，可编码 DNA 促旋酶的 B 亚单位，进化速度快于 16S，可用于细菌的鉴定[6]。张慧娟等人采用 *gyrB* 与多个毒力基因结合进行多重 PCR 进行快速检测，但其中特异性 *gyrB* 基因在部分苏云金芽孢杆菌也呈扩增阳性[7]。本研究利用 16S 序列与 *gyrB* 基因拼接序列联合建树，以较少的序列数和进化树数实现对筛选菌株的快速鉴定，提高数据的利用率，减少数据冲突，为芽孢杆菌种群的分子生物学鉴定方法开发提供参考。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　土壤样本　厦门同安国家农业科技园区竹坝农场采集，该种植区施用动物肥。

1.1.2　培养基　营养琼脂培养基：购自广东环凯生物科技有限公司；甘露醇卵黄多粘菌素（MYP）琼脂培养基、胰酪胨大豆羊血琼脂培养基、动力–硝酸盐培养基：购自青岛海博生物科技有限公司。

1.1.3　PCR 反应　细菌基因组 DNA 提取试剂盒：购自生工生物工程（上海）股份有限公司；16S 扩增引物 5′–AGAGTTTGATCCTGGCTCAG–3′（F），5′–GGTTACCTT GTTACGACTT–3′（R）；*gyrB* 扩增引物：5′–ATTTGG CGCTGGCGGTTAT–3′（F），5′–GGTTTCGGCTGGGC TGGTA–3′（R）：购自生工生物工程（上海）股份有限公司。

1.2　方法

1.2.1　样本采集　于农场施用动物肥的蔬菜种植区采集土壤，取土壤 25 g 加入 225 mL 蛋白胨生理盐水稀释均质后涂布营养琼脂平板，30 ℃培养 24 h，取疑似芽孢杆菌的单菌落进行划线纯化。

1.2.2　16S 与 *gyrB* 序列提取　用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取分离纯化菌株的总 DNA；分别用 16S 与 *gyrB* 引物扩增，所得 PCR 产物电泳纯化后，送生工生物工程（上海）股份有限公司测序。

1.2.3　16S 与 *gyrB* 序列比对与进化分析　将 16S 与 *gyrB* 基因测序所得结果在 Genbank 进行比对。为保障数据的准确性和有效性，避免错误信息干扰，选择 Genbank 中 *gyrB* 相似度前 1 000 个序列中的 ATCC 菌株进行比对，且选择 16S 与 *gyrB* 序列同时可得的菌株进行比对。16S 与 *gyrB* 基因序列用 BioEdit[8] 进行比对，去除两端不整齐序列，用 ClustalX[9] 进行格式转换后，取有效区间拼接[10]，用 Paup* 4.0 基于最大简约算法，构建拼接序列进化树[11–12]，选择大肠杆菌 ATCC 25922[13] 作为外群。

1.2.4　生理生化验证　参考国标《饲料中蜡样芽孢杆菌的检测》[14] 和《伯杰细菌鉴定手册》[15] 进行验证。

1.2.5　联合建树方法适用性分析　为分析 16S 与 *gyrB* 基因联合建树的方法是否适用于其他蜡样芽孢杆菌的鉴定，于 Genbank 下载16S 与 *gyrB* 基因均可得的蜡样芽孢杆菌序列，按照上述方法进行序列拼接。选择《伯杰细菌鉴定手册》[14] 中芽孢杆菌属模

式菌株,于 Genbak 和和 EZBiocloud 下载 16S 和*gyrB* 序列,选择大肠杆菌 ATCC 25922 作为外群,构建进化树。

2 结果与分析

2.1 菌株分离纯化

从土壤中筛选得到一株革兰氏阳性杆菌,菌落呈灰白色,细胞成链状排列,编号为HX2016002。

2.2 16S 与 *gyrB* 基因测序

PCR 扩增所得 16S 序列有效区共 1 439 bp,*gyrB* 序列有效区共 1 386 bp。

2.3 序列比对与进化树构建

16S 序列比对结果中,高相似度菌株过多,且多数菌株无 *gyrB* 序列;而 *gyrB* 序列比对结果中,高相似菌株远少于 16S 比对结果,且多数菌株同时可获取 16S 序列,因此,以 *gyrB* 相似菌株作为建树群,其中 ATCC 菌株均为全基因组测序,因此 16S 与 *gyrB* 基因序列号相同,见表 1。

表 1 Genbank 中拥有相似 16S 与 *gyrB* 序列的菌株

Table 1 Strains in Genbank with similar 16S and *gyrB* sequences

序号	菌株	序列号
1	*Bacillus cereus* ATCC 14579[16]	AE016877.1
2	*Bacillus cereus* ATCC 10987[17]	AE017194.1
3	*Bacillus thuringiensis* ATCC 10792[18]	CP021061.1
4	*Bacillus mycoides* ATCC 6462[19]	CP009692.1
5	*Bacillus megaterium* ATCC 14581[19]	CP009920.1
6	*Bacillus subtilis* ATCC 11774	CP026010.1
7	*Bacillus subtilis* ATCC 6633	CP034943.1
8	*Bacillus subtilis* ATCC 21228	CP020023.1
9	*Bacillus subtilis* ATCC 19217	CP009749.1
10	*Bacillus coagulans* ATCC 7050[19]	CP009709.1
11	*Bacillus licheniformis* ATCC 14580[20]	CP000002.3
12	*Bacillus licheniformis* ATCC 9789	CP023729.1
13	*Planococcuskocurii* ATCC 43650	CP013661.2
14	*Bacillus paralicheniformis* ATCC 9945a[21]	CP005965.1

注:表中菌株按照 Blast 结果排序。

16S 和 *gyrB* 序列比对后去除头尾不整齐片段,均保留中心区域 1 335 bp,将同一菌株的 16S 与*gyrB* 拼接后建树,见图 1。计算次数为 1 000,树长为 5 680,一致性指数(CI)为 0.685,保留指数(RI)为 0.754,同型指数(HI)为 0.315。

全树各分支自展值均高于 96,表明该树结构可靠,其中 HX2016002 与蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)聚为一支,自展值为 100,表明其很可能为蜡样芽孢杆菌菌株。

2.4 生理生化验证

HX2016002 菌株接种至 MYP 琼脂平板,30 ℃培养 24 h 后菌落呈粉红色,周围有晕圈;接种至胰酪胨大豆羊血琼脂,30 ℃培养 24 h 后,菌落周围出现溶血环;穿刺接种至动力-硝酸盐培养基,30 ℃培养 24 h 后沿穿刺线呈扩散生长;蛋白质结晶毒素染色试验呈阴性。确认该菌株为蜡样芽孢杆菌,与进化分析结果一致,命名为 *Bacillus cereus* HX2016002。

2.5 联合建树方法适用性

在 Genbank 中选择符合以下条件的蜡样芽孢杆菌下载 16S 与 *gyrB* 序列:一是 16S 与 *gyrB* 序列均已上传 Genbank;二是鉴定结果较为可靠。共有满足条件的菌株 52 株,另选择亲缘关系较近的芽孢杆菌属其他菌种模式菌株 15 株,拼接 16S 与 *gyrB* 基因序列后构建进化树,见图 2。其中所有的蜡样芽孢杆菌均聚合在一簇,表明如这 52 株菌中的任意一株菌种在还未鉴定的情况下,利用该方法建树时与其他 51 株蜡样芽孢杆菌均聚合在一支,可准确

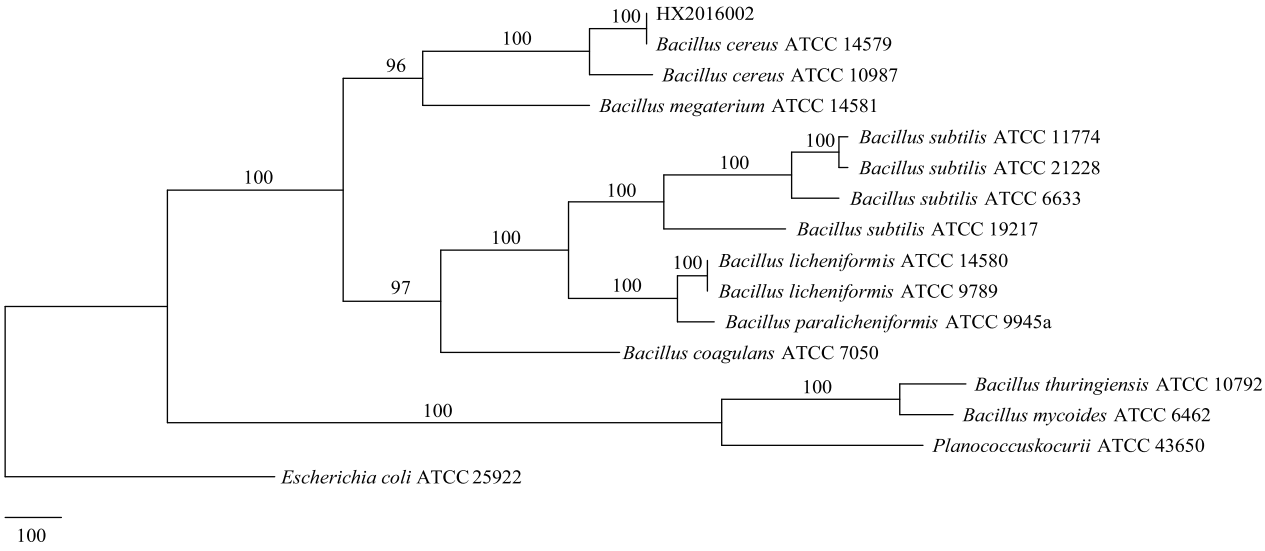


图 1　基于 16S 与 *gyrB* 合并序列的进化树

Fig. 1　Phylogenetic tree based on merged sequences of 16S and *gyrB*

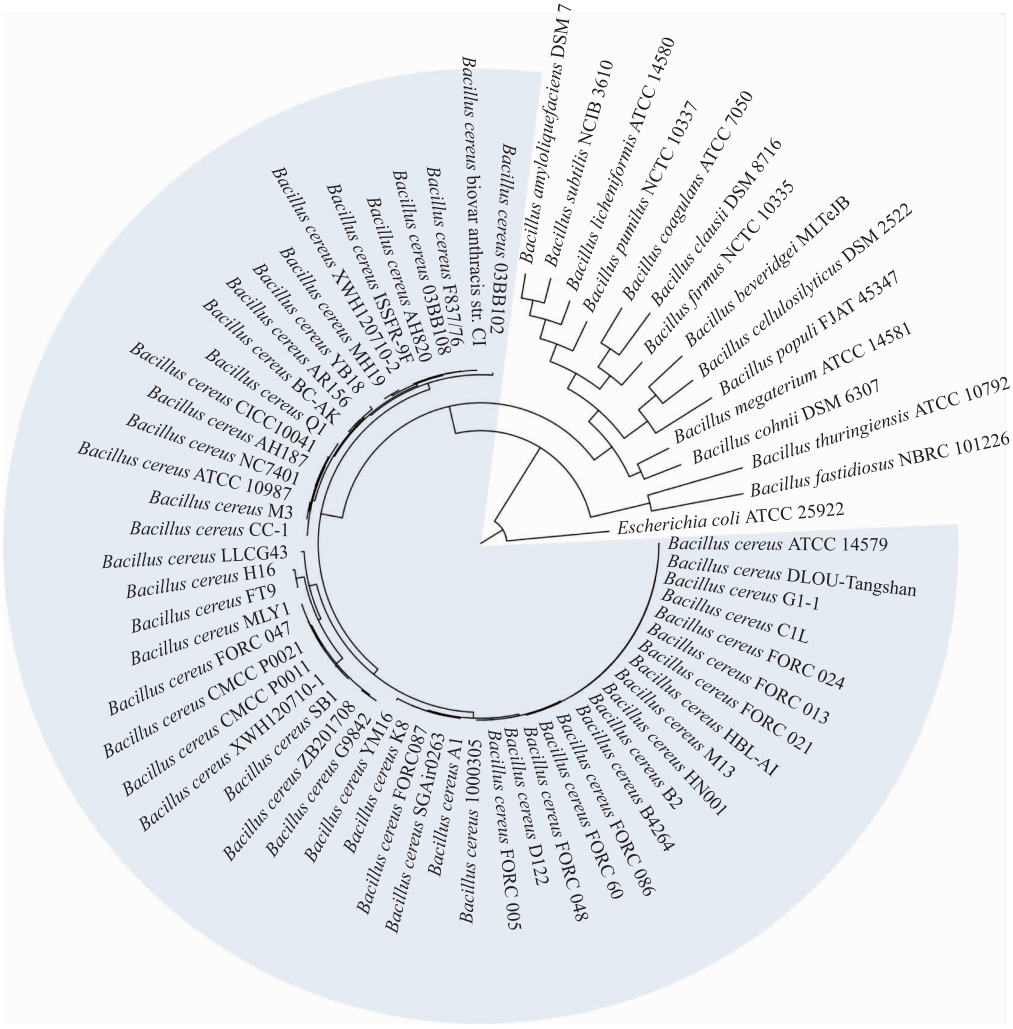


图 2　Genbank 已知菌株基于 16S 与 *gyrB* 序列的进化树

Fig. 2　Phylogenetic tree based on sequences of 16S and *gyrB* in Genbank

鉴定为蜡样芽孢杆菌。16S 与 *gyrB* 基因联合建树的方法适用于已知的 52 株蜡样芽孢杆菌鉴定，可以预测该方法在蜡样芽孢杆菌鉴定中具有普适性。

3 结 语

芽孢杆菌是生活中常见也是非常重要的一类微生物，研究人员经常需要对其中的某一个或多个菌株进行鉴定，而分子生物学鉴定具有快速、简便且准确的优点，是目前常用的菌种鉴定手段，但芽孢杆菌之间保守序列的高度相似性为分子生物学鉴定带来了困扰，往往需要对多个基因甚至全基因组进行测序来定位到种。在研究过程中，本课题组先通过 16S 序列将菌株定位至芽孢杆菌分类簇，设计 *gyrB* 引物扩增、测序后缩小比对范围。同时，为了保障数据的准确性，避免无效甚至错误数据，选择 ATCC 保藏的菌株进行分析。本课题组认为，在单基因测序的基础上，单纯的增加测序基因数量并对多个基因分别比对和建树的方法有时并不能提高鉴定的准确性，甚至可能造成分析结果的紊乱和冲突，因此，选择了 16S 与 *gyrB* 基因联合建树的方式进行分析，将 HX2016002 准确鉴定为蜡样芽孢杆菌。经验证，该方法在蜡样芽孢杆菌的鉴定中具有较普遍的适用性，下一步将继续研究该方法在其他保守序列相似度高的菌群鉴别中应用的有效性。

参考文献：

[1] CHRISTENSEN H,NORDENTOFT S,Olsen J E. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on rRNA sequence [J]. **International Journal of Systematic Bacteriology**,1998,48(2):605-610.

[2] XU D,COTE J C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3′ end 16S rDNA and 5′ end 16S-23S ITS nucleotide sequences[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,2003,53(3):695-704.

[3] WANG L T,LEE F L,TAI C J,et al. Comparison of *gyrB* gene sequences,16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the *Bacillus subtilis* group[J]. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,2007,57:1846-1850.

[4] 喻国辉，牛春艳，陈远凤，等. 利用 16S rDNA 结合 *gyrA* 和 *gyrB* 基因对生防芽孢杆菌 R31 的快速鉴定[J]. 中国生物防治学报，2010,26(2):160-166.

[5] STENFORS ARNESEN L P,FAGERLUND A,GRANUM P E. From soil to gut:*Bacillus cereus* and its food poisoning toxins [J]. **FEMS Microbiology Reviews**,2008,32(4):579-606.

[6] WATANABE K,NELSON J,HARAYAMA S,et al. ICB database:the *gyrB* database for identification and classification of bacteria[J]. **Nucleic Acids Research**,2001,29(1):344-345.

[7] 张慧娟，张恩民，贺金荣，等. 快速检测蜡样芽孢杆菌及其毒力基因筛选[J]. 疾病监测，2019,34(7):1-4.

[8] HALL T A. Bioedit:a user—friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. **Nucleic Acids Symposium Series**,1999,41:95-98.

[9] THOMSON J D,GIBSON T J,PLEWNIAK F,et al. The Clustal_X windows interface:flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. **Nucleic Acids Research**,1997,25:4876-4882.

[10] ZHAO C L,CUI,B K,DAI Y C. New species and phylogeny of *Perenniporia* based on morphological and molecular characters [J]. **Fungal Diversity**,2013,58(1):47-60.

[11] JIANG X Z,YU H Y,XIANG M C,et al. *Echinochlamydosporium* variabile,a new genus and species of *Zygomycota* from soil nematodes[J]. **Fungal Divers**,2011,46:43-51.

[12] 肖玉娟，傅奇，沈金海，等. 一株引起厦门地区不同作物感染的 *Poitrasiacircinans* 分离与鉴定[J]. 科学技术与工程，2018,18(14):20-23.

[13] MINOGUE T D,DALIGAULT H A,DAVENPORT K W,et al. Complete genome assembly of *Escherichia coli* ATCC 25922,a serotype O6 reference strain[J]. **Genome Announcements**,2014,2(5):e00969.

[14] 全国饲料工业标准化技术委员会. GB/T 26427-2010 饲料中蜡样芽孢杆菌的检测[S]. 北京：中国标准出版社，2011.

[15] CLAUS D. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[M]. New York: Springer-Verlag, 1986.

[16] IVANOVA N，SOROKIN A，ANDERSON I，et al. Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*[J]. **Nature**，2003，423(6935)：87.

[17] RASKO D A，RAVEL J，OKSTAD O A，et al. The genome sequence of *Bacillus cereus* ATCC 10987 reveals metabolic adaptations and a large plasmid related to *Bacillus anthracis* pXO1[J]. **Nucleic Acids Research**，2004，32(3)：977-988.

[18] PARK Y S，PARK B J，PARK J H，et al. Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* type strain ATCC 10792 and its comparative analysis with *B. cereus* type strain ATCC 14579 and *B. thuringiensis* serovarkonkukian 97-27[J]. **Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition**，2015，8：325-326.

[19] JOHNSON S L，DALIGAULT H E，DAVENPORT K W，et al. Complete genome sequences for 35 biothreat assay-relevant *Bacillus* species[J]. **Genome Announcements**，2015，3(2)：e00151.

[20] REY M W，RAMAIYA P，NELSON B A，et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species[J]. **Genome Biology**，2004，5(10)：77.

[21] RACHINGER M，VOLLAND S，MEINHARDT F，et al. First insights into the completely annotated genome sequence of *Bacillus licheniformis* strain 9945A[J]. **Genome Announcements**，2013，1(4)：e00525.

科　技　信　息

天津工业生物所在木糖电化学生物传感器方面取得新进展

目前木糖的检测只能依赖于液相色谱，分析时间较长，而且对操作人员技能和设备要求均较高。不同于已经实现生物电化学传感的葡萄糖检测方法，木糖由于没有相应的氧化酶，只能使用辅酶依赖型的木糖脱氢酶作为识别元件。此前，中国科学院天津工业生物技术研究所体外合成生物学中心朱之光研究员带领的团队构建了一个基于木糖脱氢酶的生物传感器，通过高效的酶固定化技术和辅酶再生纳米酶的协同催化，使其对纯糖样品具有良好的检测性能。然而对于真实发酵样品，由于辅酶干扰的存在，其检测值会出现较大偏差。因此，如何去除发酵样品中辅酶的干扰，是实现发酵样品精确检测的关键。

为了解决这一难题，近日，该团队从辅酶电化学再生时容易失活这一现象获得启发，基于相关分子机制，开发出一种可高效去除发酵样品等复杂环境下的辅酶的便捷方法，并成功设计了一种用于检测发酵样品的集成型木糖生物传感装置。该装置由发酵样品预处理室和样品分析室两部分构成，在样品预处理室中采用廉价的泡沫镍作为工作电极，偶联循环伏安法实现对 NAD(H)和 NADP(H)的去除；在样品分析室，将作为识别元件的木糖脱氢酶和用于再生生物活性 NAD 的黄递酶共固定在磁性纳米粒子的表面，并进一步涂覆在修饰了电子中介体的磁性玻碳电极表面，构成生物电极用于木糖的检测。该装置对木糖的检测范围为 0.5~10 g/L，检测限为 0.01 g/L，重复使用 10 次后，仍保持原活力的 77%，放置 35 d 后可保持原活力的 85%，满足真实发酵样品的检测条件，并实现了检测的高选择性和高重现性。相关装置原型也已开发出，其制备过程简单、价格低廉、有望实现实际应用。该研究也为其他可用于真实复杂样品检测的基于脱氢酶的生物传感器构建提供了思路。

该研究获得了国家自然科学基金、天津市自然科学基金等项目的资助，相关研究成果已申请 2 项发明专利，论文发表在 SCI 期刊 Biosensors and Bioelectronics 上。天津工业生物所助理研究员宋海燕为论文第一作者，朱之光为论文通讯作者。

［信息来源］中国科学院天津工业生物所. 天津工业生物所在木糖电化学生物传感器方面取得新进展[EB/OL]. (2021-9-14). http://www.tib.cas.cn/xwzx_104015/kyjz/202109/t20210914_6202539.html