

## 16S rRNA 在肉毒梭菌分型鉴定中的应用

卢卫嘉,毛晓燕\*,熊颖,张超,王建锋

兰州生物制品研究所,兰州 730046

**[摘要]** **目的** 建立一种快速、可靠的对肉毒梭菌进行分型鉴定的手段。**方法** 以从 LCL063、830110、LC175、LCL155、66418、N153、61082、ALASKA、IWANAI 共 9 株梭菌中提取的基因组 DNA 为模板,利用 16S rRNA 特异性引物分别进行 PCR 扩增并进行 T-A 克隆转化、测序。通过 Clustal 和 Mega 软件分析 16S rDNA 序列,以 NJ 法和 MP 法构建进化树,分析其种属特异性。**结果** 16S rRNA 分型结果可判断出 LCL063、830110、LCL175 为产 E 型毒素的酪酸梭菌。IWANAI 与 ALASKA 株为 E 型肉毒梭菌。与传统分型鉴定得到的结果一致。**结论** 16S rRNA 在肉毒梭菌分型鉴定中具有快速、准确的优势,随着核糖体库的不断完善,有望成为细菌分型鉴定的标准依据。

**[关键词]** 16S rRNA; 肉毒梭菌; 进化树; 细菌分型技术

**[中图分类号]** R 372 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)11-1186-03

### 16S rRNA in identification and typing of *Clostridium botulinum*

LU Wei-jia, MAO Xiao-yan\*, XIONG Ying, ZHANG Chao, WANG Jian-feng

Lanzhou Institute of Biological Products, Lanzhou 730046, Gansu, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a rapid, reliable method for identifying and typing of *Clostridium botulinum* using 16S rDNA sequencing and phylogenetic tree construction. **Methods** *Clostridium* genome templates were extracted from 9 strains, including LCL063, 830110, LC175, LCL155, 66418, N153, 61082, ALASKA, and IWANAI; 16S rRNA genes were amplified by PCR with the 16S rRNA specific primers, and then the PCR products were cloned to pGEM-T Easy vector and sequenced. Finally, the sequence of 16S rDNA was analyzed by Clustal and Mega program; the phylogenetic trees were constructed by Neighbor joining and Maximum parsimony. **Results** It was found that LCL063, 830110, and LCL175 were BONT/E producing *Clostridium butyricum*s; IWANAI and ALASKA were *Clostridium botulinum* type E. The results of the present method were consistent with those of the conventional method. **Conclusion** 16S rRNA sequencing combined with phylogenetic tree analysis is a rapid and accurate method in *Clostridium botulinum* identification, and the method may serve as a criterion for bacterial typing with the completion of ribosomal RNA data bank.

**[Key words]** 16S rRNA; *Clostridium butyricum*; phylogenetic tree; bacterial typing techniques

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(11):1186-1188]

核糖体 RNA(rRNA)是生物体蛋白质翻译的重要组成部分,原核生物含有 3 种 rRNA:5S、16S、23S,大小分别为 120、1 500、3 000 bp 左右。20 世纪,研究者们在对生物进行编目的工作中发现:16S rRNA 及其类似的 rRNA 作为生物系统发育指标最为合适<sup>[1]</sup>。其主要具有以下几点优势:(1)所有细胞共有;(2)功能同源;(3)既有可变序列又有保守序列;(4)分子大小适宜操作;(5)序列的变化与进化距离相适宜。随着近年来网络资源的不断丰富,核糖体数据库也日益完善,将未知菌株的 16S rRNA 通过生物信息学的方法进行比对并分型鉴定的技术也越来越受到人们的重视<sup>[2-4]</sup>。

本研究对梭菌保藏中心(国家级菌种保藏中心)的 9 株梭菌提取了基因组 DNA,设计合成了梭菌特异性的 16S rRNA 引物对,通过 PCR 扩增出 9 株菌株的 16S rDNA 并测序,将测序结果使用 Clustal 和 Mega 软件构建系统进化树分析其种属特异性并与传统分型鉴定方法做对比。

### 1 材料和方法

1.1 菌株与试剂 LCL063、830110、LC175、LCL155、66418、N153、61082、ALASKA、IWANAI 等 9 株梭菌由兰州生物制品研究所梭菌专业实验室提供,梭菌专用培养液由实验室自行配制;DH5 $\alpha$  菌

**[收稿日期]** 2011-08-15

**[接受日期]** 2011-10-09

**[作者简介]** 卢卫嘉,硕士,助理研究员。E-mail: sky41629595@163.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0931-8316230, E-mail: maoxiaoyan2002@163.com

株购于 Invitrogen 公司。

LA *Taq* 酶购自 TaKaRa 公司, pGEM-T Easy 购自 Novagen 公司; SDS、蛋白酶 K 购自 Sigma 公司。CTAB/NaCl 溶液、氯仿:异戊醇(24:1)、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)、异丙醇、70%乙醇、Tris-EDTA(TE)、NaCl 等均为国产试剂。

引物合成、序列测定由上海生工生物工程服务技术有限公司完成。

1.2 细菌培养 使用梭菌专用培养液对 9 株梭菌 30℃ 厌氧培养 48 h。

1.3 细菌基因组 DNA 的提取 100 ml 细菌过夜培养液, 5 000×g 离心 10 min, 去上清液。加 9.5 ml TE 悬浮沉淀, 并加 0.5 ml 10% SDS、50 μl 20 mg/ml 蛋白酶 K, 混匀, 37℃ 保温 1 h。加 1.5 ml 5 mol/L NaCl, 混匀。加 1.5 ml CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 65℃ 保温 20 min。用等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提, 5 000×g 离心 10 min, 将上清液移至干净离心管。用等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提, 取上清液移至干净管中。加 1 倍体积异丙醇, 颠倒混合, 室温下静置 10 min, 沉淀 DNA。5 000×g 离心 10 min, 小心弃去上清, 超净台风干管内残余液体, 70%乙醇漂洗后, 吸干, 溶解于 1 ml TE, -20℃ 保存。

1.4 PCR 扩增 16S rDNA 序列 分别以得到的细菌基因组 DNA 为模板, 采用针对绝大部分细菌的上游引物 F1(序列为 5'-AGA GTT TGA TCC TGG

CTC AG-3'; 8-27) 和梭菌特异性的下游引物 R4(序列为 5'-ACG GAT ACC TTG TTA CGA CTT-3'; 1512-1492)<sup>[5-6]</sup>, 以 TaKaRa 公司的 LA *Taq* 酶 PCR 扩增得到 16S rDNA 序列。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 150 s, 共 20 个循环; 72℃ 再延伸 10 min。

1.5 T-A 克隆 将 9 条 16S rDNA 序列克隆入 pGEM-T Easy 载体中, 按《分子克隆实验指南》<sup>[7]</sup> 操作转化入 DH5α 菌株, 培养皿划线培养后挑取单克隆, 测序。

1.6 系统进化树分析 从 GenBank 已公布序列中随机挑选肉毒梭菌 A、B、E、F 型以及酪酸梭菌 16S rDNA 的基因序列各 1 条, 分别命名为 BONT A、BONT B、BONT E、BONT F、NCIMB8082。以耶尔森鼠疫杆菌(BZGL)和大肠杆菌(*E. coli*)的 16S rDNA 作为 2 个对照外群, 与 1.5 项下测序正确的 9 条 16S rDNA 序列一起, 构建系统进化树。首先使用 Clustal 软件将 15 条序列进行完全比对, 然后分别用程序提供的邻接法(NJ)和最大简约法(MP)计算序列的进化距离; 将得到的结果使用 Mega 程序构建系统进化树, 数据自展重抽样次数为 1 000 次。

## 2 结果

2.1 PCR 扩增 16S rDNA 序列 PCR 扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 结果见图 1。

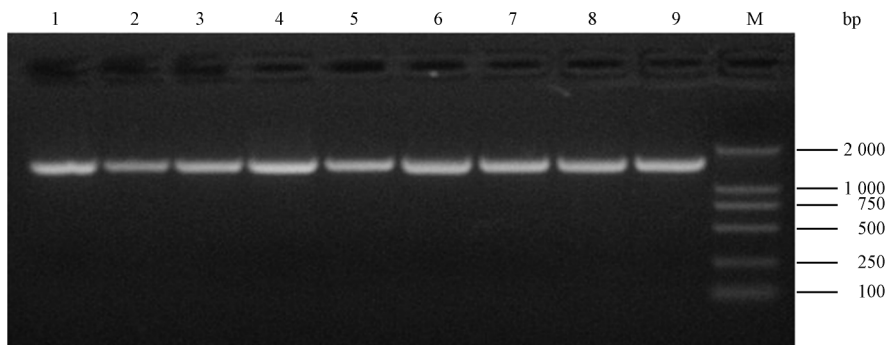


图 1 9 株梭菌 rRNA PCR 产物 1% 凝胶电泳图

Fig 1 1% sepharose electrophoresis of *Clostridium botulinum* rRNA PCR products

1: LCL063; 2: 830110; 3: LCL175; 4: LCL155; 5: 66418; 6: NI53; 7: 61082; 8: ALASKA; 9: IWANAI; M: DL2000 marker

2.2 系统进化树分析 构建的系统进化树如图 2、3 所示, 可以看出, 菌株 LCL063、830110、LCL175、LCL155 的进化距离较近, 且此 4 株菌株与 GenBank 上公布的 1 株酪酸梭菌 NCIMB8082 处于同一个分支下, 故可判断此 5 株细菌在进化谱系上具有较近的亲缘关系。IWANAI、ALASKA 与 GenBank 上公布的 E 型肉毒菌株 E3 株的亲缘关系也

较高。根据本科室的梭菌菌种保藏记录以及对此 9 株菌株所做的生化鉴定以及形态学分析, LCL063、830110、LCL175 为产生 E 型肉毒毒素的酪酸梭菌, LCL155 为我们已经鉴定证实的 1 株酪酸梭菌<sup>[8]</sup>。IWANAI 与 ALASKA 株为 E 型肉毒梭菌, 这与进化树所展示出的结果相一致。

