

微生物 DNA 条形码技术的研究进展*

Progress in DNA Barcoding of Microorganism

张穗生, 陈英, 陈小玲

ZHANG Sui-sheng, CHEN Ying, CHEN Xiao-ling

(广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要: 微生物 DNA 条形码技术是利用 DNA 条形码作为标记进行微生物物种鉴定的技术, 目前在微生物的研究中应用广泛。本文综述了微生物 DNA 条形码技术在应用中的优势、局限性和发展, 为微生物 DNA 条形码技术的进一步应用提供参考。

关键词: DNA 条形码技术 微生物 发展

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2015)01-0027-04

Abstract: The DNA Barcoding of microorganism investigates how to apply the technique in microbial studies, which currently has been applied widely in many fields. To facilitate the application of this technique to more reserch fields, we review the progress of DNA Barcoding of microorganism focusing on its advantages, limitations and the development trend of the technology.

Key words: DNA Barcoding, microorganism, progress

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20150126.016

0 引言

DNA 条形码是一段可以用来进行生物物种鉴定的 DNA 短小片段, 而 DNA 条形码技术是通过使用 DNA 条形码对物种进行快速、准确识别的技术^[1], 一直为生物学的研究热点。微生物 DNA 条形码技术是对微生物 DNA 条形码及其应用的研究, 目前, 微

生物 DNA 条形码技术不仅被应用于物种鉴定, 还被应用于微生物资源开发、生态学研究和安全监管等多个重要领域^[2]。由于存在微生物 DNA 条形码普适性和技术精确性有待提高等难题, 促使研究人员对微生物 DNA 条形码技术和应用进行了大量的研究。近年来, 生物技术取得了长足的进步, 促进了微生物 DNA 条形码技术发展, 为该技术更好地应用打下了基础^[3]。本文从微生物 DNA 条形码技术在应用中的优势、局限性和发展进行综述。

1 应用优势

微生物 DNA 条形码技术鉴定物种的操作流程简易, 包括: 获取微生物材料→提取获得质量良好的 DNA→设计引物 PCR 扩增目标 DNA 片断→PCR 产物测序→序列分析→确定适合的微生物 DNA 条

收稿日期: 2014-12-21

作者简介: 张穗生(1972-), 副研究员, 博士, 主要从事微生物学、生化与分子生物学研究。

* 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118103)、广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 1348004-1、桂科重 1348004-3、桂科重 14122004-1、桂科重 14122004-3、桂科合 1346011-4、桂科合 14123001-6)资助。

形码→与传统分类方法结合,验证微生物 DNA 条形码分类的精确性^[4,5]。传统的微生物物种鉴定方法包括形态学、生物化学、生理学等分类方法,与传统的分类方法相比,科研人员掌握微生物 DNA 条形码技术相对容易,无需积累很多的经验和知识即可进行。另外,微生物 DNA 条形码技术鉴定物种不仅最快在 1 天内可以完成,而且可以同时多个样品的测定,达到了快速、高通量水平^[6]。

1.1 微生物分类

在病毒分类研究方面,采用病毒的结构蛋白基因 *g20*、*g23* 基因、DNA 聚合酶基因、光合作用基因 *psbA*、*psbD* 与焦磷酸核苷酸水解酶基因 *MazG* 基因等,成功的应用浮游病毒分类和多样性研究^[7,8]。

在细菌和古生菌分类研究方面,采用小亚基核糖体 RNA 基因(SSU rRNA)可以对大多数微生物种类进行分类^[9,10],此外,配合其它 DNA 条形码使用,分类结果更佳,Naser 等^[11]使用苯丙氨酰 tRNA 合成酶 α 亚基基因 *pheS* 和 RNA 聚合酶 α 亚基基因 *rpoA* 部分片段鉴定乳酸菌菌株,均能对不同乳酸菌菌株很好的分类,表现为通过运算的分类单位(operational taxonomic units,OTU)分析,*pheS* 基因应用于乳酸菌种分类,种间差异可以达到 10%以上,而种内差异只有 3%;*ropA* 基因的种间差异可以达到 5%以上,而种内差异为 2%。

在真菌的 DNA 条形码研究方面,相关报道较多,在真菌中,内转录间隔区(internal transcribed spacer region, ITS)是 rDNA 的非编码区域,其中 ITS-1(位于 18S rDNA 和 5.8S rDNA 之间)和 ITS-2(位于 5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间)常被用于真菌的分类^[12,13]。Long 等^[14]使用 ITS1、5.8S、ITS2 和细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COXI)鉴定发现腐霉属两个新种百色腐霉(*P. baisesense*)、短枝腐霉(*P. breve*);蔡箐等^[15]选用的 3 个 DNA 候选片段核糖体大亚基(nLSU)、内转录间隔区(ITS)和翻译延长因子 1- α (*tef1*- α),鉴定鹅膏属 10 个种 28 份样本材料,确定 ITS 作为鹅膏属分类的核心条形码,配合 *tef1*- α 和 nLSU 辅助条形码进行鹅膏属样品鉴定。此外,研究人员发现,对于有些真菌物种,需要使用 ITS 以外的 DNA 条形码,如 Zhao 等^[16]在丛赤壳类真菌中,选取 ITS、28S rDNA、 β -tubulin 和 EF-1 α 基因进行分类, β -tubulin 种间距离为 3.45%,种内距离为 2.77%,而且, β -tubulin 基因具有高的 PCR 和测序成功率,能够很好的对所选 28 种菌种进行分类,没有种间和种内的交叠,显示出比 ITS 更好的鉴定效果;而李艳春等^[17]选取 nrLSU、*tef1*- α 、*rpb1* 和

rpb2 4 个 ITS 之外的 DNA 条形码,扩增 575~834 bp 片段测序,通过对牛肝菌 46 份样品进行分类,将 46 份样品区分为 12 个种,12 个种之间存在外观形态特征和内部显微特征的差异,与 DNA 条形码分类结构保持一致,同样取得了较好的鉴定结果。

1.2 微生物的起源、进化等推断

DNA 条形码技术的应用不仅可以用来鉴定物种,而且可用于物种的起源、进化等分析^[3]。Min 等^[18]利用线粒体 DNA 条形码,进行 7 个子囊菌、2 菌种、3 个担子菌和 1 个壶菌的分子系统学研究,所构建的分子进化树与传统分类认定的物种进化关系一致。

2 应用局限性

2.1 DNA 条形码普适性有待提高

目前,微生物 DNA 条形码缺乏普适性,对于部分微生物物种,不能成功用一段常用的 DNA 链中的碱基序列来作为物种分类的标志物。在分类时一般选取几个代表属种进行测试,而微生物物种多样性丰富,因此,在少数物种上验证分类成功的 DNA 条形码,在其它物种不一定适用^[19,20]。根据生物条形码协会(Consortium for the Barcode of Life)提议,ITS 是真菌鉴定使用的主要 DNA 条形码,但还需要配合其它 DNA 条形码(LSU、SSU、RPB1、COI 等)一同使用,才能提高真菌分类的精确性;*COI* 基因条形码适用于青霉,但 *COI* 基因条形码成功应用于其它真菌分类却鲜有报道,在丛枝菌根真菌中,使用跨越 150SSU、ITS 和 LSU 的一个 1500 bp DNA 片段分类更为有效^[21]。

2.2 DNA 条形码技术的精确性受多种因素影响

目前,主要的影响因素有^[14,22]:(1)DNA 片段进化速度方面,所使用的 DNA 片段在不同物种进化的速度不一,不同物种种间差异和种内差异数值具有差异;(2)样品 DNA 方面,有些材料提取高质量的 DNA 困难,或有些 DNA 片段 PCR 扩增成功率较低,造成难以获取目标 DNA 片断。赵鹏等^[22]以丛赤壳科 5 个属 11 个种 17 个菌株为材料,评估 *COI* 基因作为丛赤壳科真菌 DNA 条形码的有效性,发现由于丛赤壳科真菌 *COI* 基因存在较大的内含子,造成分子实验操作困难,*COI* 基因片断的 PCR 扩增测序,成功仅率为 22.7%;(3)PCR 偏好性方面,使用 ITS 作为 DNA 条形码分类时,必须科学设计引物,否则在 PCR 扩增时就会产生偏好扩增,对于从环境直接提取的 DNA 样品,这无疑会造成鉴定失误;(4)序列分析的方法方面,分析算法还需要改进。

3 微生物 DNA 条形码技术的发展

3.1 技术使用在不断提升

近年来,研究人员一直致力于提升微生物 DNA 条形码技术,主要成果有(1)使用多个 DNA 片段组合作为 DNA 条形码来进行鉴定。使用对于单一 DNA 条形码不能正确进行分类的微生物物种,选取不同的 DNA 片段进行测定,即使用多个基因片段组合,通过几个不同的 DNA 序列组合来进行鉴定。Roe 等^[23]使用单一的 DNA 条形码,能够成功鉴定 40%~70%的长喙壳属和球腔菌属真菌,而使用 actin、EF1a、Btub、UFM、ITS2 片段组合条形码分类,鉴定成功率可以提升至 100%。目前,研究人员利用多个 DNA 片段组合鉴定物种发展形成了多位点序列分型(Multi Locus Sequence Typing, MLST)^[24]、多位点序列分析(Multilocus sequence analysis, MLSA)技术^[25]的相关报道不断增多,MLST 技术已经应用于肺炎链球菌、布鲁氏菌等微生物的分类^[26,27];(2)PCR 扩增难度的不断降低。真菌的线粒体基因具有很多较大的内含子,这个技术障碍可以通过应用反转录 PCR 的方式进行克服^[28];(3)与其它技术联合使用鉴定微生物物种。蒲小平等^[29]将生物条形码技术与基于磁性纳米微球的免疫检测技术结合,建立了生物条形码探针和金纳米颗粒(gold nanoparticles, AuNPs)快速检测致病性大肠杆菌 O157:H7 的方法。

3.2 新的微生物 DNA 条形码的发现

研究人员一直在寻找新的微生物 DNA 条形码,使微生物 DNA 条形码技术的鉴定水平更精确。Stockinger 等^[30]通过优化,选择出了 RNA 聚合酶 II 的大亚基 RPB1 片段作为 DNA 条形码的新区域,用于研究丛枝菌根真菌的多样性。

3.3 应用范围的扩大

微生物 DNA 条形码技术最常用的领域是微生物分类。目前,研究人员已经将该技术的应用范围扩大到分子系统学研究、生物安全监管、食品药品安全监管等^[29,31~33]。

3.4 成本的降低

为了使微生物 DNA 条形码技术更经济,研究人员用微条形码进行物种分类,达到降低技术成本的目的。常用 DNA 条形码长度约几百 bp,微条形码远远小于常用 DNA 条形码,有的只有 25 bp 大小,使 PCR 扩增的 DNA 片段大为减小,从而降低了测试成本^[34],例如,van Zuydam 等^[35]建立了鉴定小粘束霉属真菌的微条形码系统。

4 展望

随着基因组学、蛋白组学和转录组学等分子生物学技术和数据分析技术的进步,微生物 DNA 条形码技术水平不断提高,更适用的微生物 DNA 条形码有望出现,将更好地服务于微生物分类、多样性和进化研究和其它微生物研究领域。

参考文献:

- [1] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [2] Frézal L, Leblois R. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects[J]. Infection, Genetics and Evolution, 2008, 8(5): 727-736.
- [3] 裴男才, 陈步峰. 生物 DNA 条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能[J]. 生物多样性, 2013, 5: 616-627. Pei N C, Chen B F. DNA barcoding of life: A classification of uses according to function and scale after ten years of development[J]. Biodiversity Science, 2013, 5: 616-627.
- [4] 陈士林, 庞晓慧, 罗焜, 等. 生物资源的 DNA 条形码技术[J]. 生命科学, 2013, 5: 458-466. Chen S L, Pang X H, Luo K, et al. A DNA barcoding of biological resources[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2013, 5: 458-466.
- [5] Begerow D, Nilsson H, Unterseher M, et al. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and rapid identification procedures[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(1): 99-108.
- [6] Harris S E, Bellino M. DNA barcoding from NYC to Belize[J]. Science, 2013, 342(6165): 1462-1463.
- [7] 高恶斌, 王子乾. 分子生物学方法在浮游病毒多样性研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2014, 2: 47-55. Gao E B, Wang Z Q. Application of molecular biological methods to research on the genetic diversities of viroplankton[J]. Biotechnology Bulletin, 2014, 2: 47-55.
- [8] Butina T V, Belykh O I, Maksimenko S Y, et al. Phylogenetic diversity of T4 like bacteriophages in Lake Baikal, East Siberia[J]. FEMS Microbiology Letters, 2010, 309(2): 122-129.
- [9] Stoeckle M. Taxonomy, DNA, and the bar code of life[J]. Bioscience, 2003, 53(9): 796-797.
- [10] Lebonah D E, Dileep A, Chandrasekhar K, et al. DNA barcoding on Bacteria: A Review[J/OL]. Advances in Biology, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/541787>.
- [11] Naser S M, Dawyndt P, Hoste B, et al. Identification of *Lactobacilli* by *pheS* and *rpoA* gene sequence analyses[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(12): 2777-2789.
- [12] Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: An in silico ap-

- proach reveals potential PCR biases[J]. *Bmc Microbiology*, 2010, 10(1): 189.
- [13] Stockinger H, Krüger M, Schüßler A. DNA barcoding of *arbuscular mycorrhizal* fungi[J]. *New Phytologist*, 2010, 187(2): 461-474.
- [14] Long Y Y, Wei J G, Sun X, et al. Two new *Pythium* species from China based on the morphology and DNA sequence data[J]. *Mycological Progress*, 2012, 11(3): 689-698.
- [15] 蔡箐, 唐丽萍, 杨祝良. 大型经济真菌的 DNA 条形码研究—以我国剧毒鹅膏为例[J]. *植物分类与资源学报*, 2012, 6: 614-622.
Cai Q, Tang L P, Yang Z L. DNA barcoding of economically important mushrooms: A case study on lethal *Amanitas* from China [J]. *Plant Diversity and Resource*, 2012, 6: 614-622.
- [16] Zhao P, Luo J, Zhuang W Y. Practice towards DNA barcoding of the nectriaceous fungi[J]. *Fungal Diversity*, 2011, 46(1): 183-191.
- [17] 李艳春, 吴刚, 杨祝良. 我国云南食用牛肝菌的 DNA 条形码研究[J]. *植物分类与资源学报*, 2013, 6: 725-732.
Li Y C, Wu G, Yang Z L. DNA barcoding of edible *Boletales* (*Boletaceae*) from Yunnan, China[J]. *Plant Diversity and Resources*, 2013, 6: 725-732.
- [18] Min X J, Hickey D A. Assessing the effect of varying sequence length on DNA barcoding of fungi[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(3): 365-373.
- [19] 周均亮, 赵瑞琳. 真菌 DNA 条形码技术研究进展[J]. *微生物学通报*, 2013, 8: 1468-1477.
Zhou J L, Zhao R L. Advances on DNA barcoding in fungi[J]. *Microbiology*, 2013, 8: 1468-1477.
- [20] Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(16): 6241-6246.
- [21] Stockinger H, Krüger M, Schüßler A. DNA barcoding of *arbuscular mycorrhizal* fungi[J]. *New Phytologist*, 2010, 187(2): 461-474.
- [22] 赵鹏, 罗晶, 庄文颖. *COI* 基因作为丛赤壳科真菌 DNA 条形码的测试[J]. *菌物学报*, 2012, 2: 243-250.
Zhao P, Luo J, Zhuang W Y. Can *COI* gene be used as DNA barcode for the nectriaceous fungi[J]. *Mycosystema*, 2012, 2: 243-250.
- [23] Roe A D, Rice A V, Bromilow S E, et al. Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: Insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(6): 946-959.
- [24] Boers S A, van der Reijden W A, Jansen R. High-throughput multilocus sequence typing. Bringing molecular typing to the next level[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e39630.
- [25] Shneyer V S. On the species-specificity of DNA: Fifty years later[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(12): 1377-1384.
- [26] 钱婧, 薛莲, 谢贵林, 等. 171 株儿童侵袭性肺炎链球菌血清分型和多位点序列分型研究[J]. *临床儿科杂志*, 2012, 30(2): 187-191.
Qian J, Xue L, Xie G L, et al. Serotyping and multilocus sequence typing of 171 isolates from children with invasive pneumococcal diseases[J]. *Journal of Clinical Pediatrics*, 2012, 30(2): 187-191.
- [27] 周晓艳, 陈燕芬, 崔步云, 等. 我国羊种 3 型布鲁氏菌的多位点序列分型研究[J]. *中国人兽共患病学报*, 2011, 27(5): 371-375.
Zhou X Y, Chen Y F, Cui B Y, et al. Multiple sequence typing analysis of *Brucella melitensis* serotype 3 strains [J]. *Chinese Journal of Zoonoses*, 2011, 27(5): 371-375.
- [28] Santamaria M, Vicario S, Pappadà G, et al. Towards barcode markers in fungi: An intron map of *Ascomycota* mitochondria[J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(Suppl 6): S15.
- [29] 蒲小平, 杨海麟, 周楠迪. 基于生物条形码探针和金纳米颗粒的大肠杆菌 O157: H7 检测[J]. *食品科学*, 2011, 8: 177-181.
Pu X P, Yang H L, Zhou N D. Detections of *Escherichia coli* O157: H7 based on bio-bar codes probes and gold nanoparticles[J]. *Food Science*, 2011, 8: 177-181.
- [30] Stockinger H, Peyret-Guzzon M, Koegel S, et al. The largest subunit of RNA polymerase II as a new marker gene to study assemblages of fungi in the field[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e107783.
- [31] Hajibabaei M, Singer G A C, Hebert P D N, et al. DNA barcoding: How it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics [J]. *Trends in Genetics*, 2007, 23(4): 167-172.
- [32] Buée L, de Boer W, Martin F, et al. The rhizosphere zoo: An overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors[J]. *Plant and Soil*, 2009, 321(1-2): 189-212.
- [33] 陈岩, 张立, 刘力, 等. 我国检疫性有害生物 DNA 条形码信息系统建设[J]. *植物检疫*, 2014, 28(1): 1-5.
Chen Y, Zhang L, Liu L, et al. DNA barcode databases on Chinese quarantine pests [J]. *Plant Quarantine*, 2014, 28(1): 1-5.
- [34] Summerbell R C, Lévesque C A, Seifert K A, et al. Microcoding: The second step in DNA barcoding[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1897-1903.
- [35] van Zuydam N R, Paciura D, Jacobs K, et al. Barcoding and microcoding using “identiprimers” with *Leptographium* species[J]. *Mycologia*, 2010, 102(6): 1274-1287.

(责任编辑: 竺利波, 黎贞崇)