基于 rDNA ITS-1 序列酿酒酵母的系统分类学研究

冯光惠[1],余华顺[2],姚 娟[2],陈明利[1],张执欣[1],郭蔼光[1]
(1 西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨凌 712100;2 湖北安琪酵母股份有限公司研发中心,湖北 宜昌 443003)

[摘 要] 为了准确快速地为酵母生产提供优良菌株,采用核糖体 DNA ITS-1(Internal transcribed spacer 1)序列分析法,对 27 株酵母菌(其中 24 株为酿酒酵母属中的酿酒酵母(*S. cerevisiae*),其他 3 株分别为汉逊酵母属中的多形酵母(*H. polymorph*)、克鲁维酵母属中的乳清酵母(*K. marxianus*)和红酵母属中的粘质酵母(*R. mucilaginosa*))进行了系统分类学研究,提取这 27 株酵母菌的基因组 DNA 并进行 PCR 扩增,采用琼脂糖和非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,能将酵母菌株鉴定到属的水平;对 PCR 扩增序列进行克隆和测序,结果表明大多数酿酒酵母菌株之间的 ITS-1 序列有差异,主要表现在序列中的一段 Ploy-T 上,最少的有 7 个 T,最多的有 13 个 T。研究还用 Phylip 3.6 等 DNA 序列分析软件对不同 ITS-1 序列的菌株进行了系统发育分析,确定出不同菌株之间的亲缘关系,并纠正了长期认为是酿酒酵母的两株酵母菌。

[关键词] ITS-1 序列;酿酒酵母菌;系统发育分析
[中图分类号] Q939.97 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)11-0191-05

Phylogenetic reclassification analysis of *S. cerevisiae* based on the internal transcribed spacer 1(ITS-1) sequence of rDNA

FENG Guang-hui[1], YU Hua-shun[2], YAO Juan[2], CHEN Ming-li[1], ZHANG Zhi-xin[1], GUO Ai-guang[1]
(1 *College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*;
2 *Research & Development Center, The Angel Yeast Co. ltd, Yichang, Hubei* 443003, *China*)

Abstract: In order to supply high quality yeast strains rapidly and exactly in production, the number of 27 yeast strains are researched by analyzing phylogenetic position, 24 yeast strains of which are *S. cerevisiae*, the others are *H. polymorph*, *K. marxianus* and *R. mucilaginosa* respectively. The internal transcribed spacer sequences 1, part of 18S rDNA and 5S rDNA of yeast strains are amplified by PCR after DNA isolation and primer design. The strains between genus can be identified by AGE, and part of species can be identified by PAGE. By cloning and sequencing of the ITS-1 sequences, there are differences between many *S. cerevisiae*, except that few of them are same completely. The most diversity are series of sequences of Poly-T between 7 and 13. The taxonomic relationships between them are indicated by Phylip 3.6 with the different ITS-1 sequences of *S. cerevisiae* strains.

Key words: ITS-1 sequence; *S. cerevisiae*; phylogenetic position

酵母菌的种类很多,目前国内外共发现 80 多个属、900 多个种[1],而且每年不断有新种发现。由于酵母菌的巨大经济价值,国内外有关这类微生物基础和应用方面的研究较多,其中最基础的学科酵母

*[收稿日期] 2006-05-12
[作者简介] 冯光惠(1977-),男,陕西横山人,在读硕士,主要从事生物化学与分子生物学研究。
[通讯作者] 郭蔼光(1942-),女,陕西西安人,教授,博士生导师,主要从事生物化学与分子生物学研究。
E-mail: guoaiguang@yahoo.com.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

菌分类学,也经历了巨大变化[2]。在酵母菌分类鉴定研究中,一般采用常规的形态及生理生化性状。近年来,随着生物化学和分子生物学的发展,许多分子分类学方法被广泛应用于酵母菌分类学,如 DNA 中 G+C 含量测定、核酸杂交技术、限制性酶切片段长度多态性分析、电泳核型(EK)分析、随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析、序列分析法等。相比较而言,采用最多且分类鉴定结果更可靠的方法是核糖体 DNA ITS-1 序列分析法和 26S rDNA D1/D2 区序列分析法[3],其中核糖体 DNA ITS-1 序列分析法鉴定酵母菌不仅可靠、准确,而且实用[4-5]。但分子生物学方法在专业酵母生产公司的应用很少,导致在酵母生产中出现菌种混杂、生产能力低下等现象。为此,本研究对酿酒酵母核糖体 DNA ITS-1 序列进行分析,通过电泳和测序确立了相应菌株的系统发育地位和亲缘关系,以期为专业化酵母公司和发酵工业获得优良的生产菌种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

27 株酵母菌均由湖北安琪酵母股份有限公司提供,见表 1。

表 1 供试酵母菌菌株及其 ITS-1 序列的 GenBank 登录号

Table 1 Yeast strains and the GenBank number of ITS-1 sequences

编号 Isolate code	菌株名称 Isolate species	登录号 GenBank number	编号 Isolate code	菌株名称 Isolate species	登录号 GenBank number
c2.15	汉逊酵母属 *H. polymorph*	DQ530282	B3.3	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	
			B3.7	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530269
A1.12	克鲁维酵母属 *K. marxianus*	DQ530281	a1.20	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530270
			B3.10	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530268
B3.6	红酵母属 *R. mucilaginosa*	DQ530283	a1.26	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	
			A1.22	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530277
A1.25	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ351857	a2.20	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530271
A2.17	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530261	a2.23	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530272
B1.11	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*		g3.2	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	
B1.1	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530262	g1.8	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530273
B1.2	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530263	g1.9	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	
B1.16	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530264	g1.10	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530274
B2.1	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530265	g3.1	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	
B2.6	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530266	g1.6	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530275
a3.6	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530267	g1.7	酿酒酵母属 *S. cerevisiae*	DQ530276

1.2 基因组 DNA 的提取

按照文献[6]的方法提取酵母菌基因组 DNA。

1.3 引物设计及其合成

酵母菌的 rDNA 单元在染色体上呈串联排列,其由转录区和非转录区构成。转录区包括 5S、5.8S、18S 和 26S rDNA,其中 5.8S、18S 和 26S rDNA基因组为 1 个转录单元。内转录间隔区 ITS 位于 18S 和 5.8S rDNA 之间(ITS-1)以及 5.8S 和 26S rDNA 之间(ITS-2)。

本研究在 ITS-1 序列的上游 18S rDNA 基因及下游 5.8S rDNA 基因中设计正(L1)、反(R1)向引物,PCR 扩增出包含 ITS-1 在内的目的 DNA 片段。

设计的正、反向引物序列分别为:L1,5′AAGTCGTAACAAGGTTTCCG 3′; R1,5′ATTTCGCTGCGTTCTTCATC 3′,均由上海生工生物技术有限公司合成。

1.4 PCR 反应体系和步骤

PCR 反应体系为:10 ×Buffer 5 μL,$MgCl_2$ 5 μL,10 mmoL/L dNTP 2 μL,PCR 引物各 25 pmol,DNA 模板 1 μL(200 ng),*Taq* 酶 2 U,加灭菌双蒸水至 50 μL。PCR 反应步骤为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 30 s,50 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 5 s,循环 35 次;最后 72 ℃延伸 10 min。PCR 扩增产物分别用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳和 50 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.5　阳性克隆的筛选、测序[7]

取酿酒酵母 A1.25 菌株 DNA 片断的 PCR 扩增产物,用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒(SK1141)纯化后,连接到 pUCm-T 质粒载体上过夜,转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,LB 平板培养基上培养后,用含 X-gal(5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷)和 IPTG(异丙基硫代-β-D-半乳糖苷)的 AMP+(氨苄青霉素)抗性平板筛选,挑白色菌落培养,采用碱裂解法[6]提取质粒后,经 PCR 初步筛选为阳性的重组转化子,再用限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ进行双酶切验证。其他所有菌株的 PCR 和双酶切鉴定方法同上,进行穿刺培养后送交上海生工生物技术有限公司测序。

1.6　序列分析[8]

将不同 ITS-1 序列的酿酒酵母菌株(以 GenBank 核酸序列数据库中同一模式酿酒酵母菌株的 ITS-1 序列为对照,用 ITS-1 表示)序列存为 FASTA 格式,用 ClustalX1.8 软件[9]进行比对,保存为 Phylip 格式,以 DNADIS 软件计算距离矩阵,用 Neighbor-Joining 分析方法[10]进行分子系统学分析,用自展法(Bootstrap)进行统计学检测,自展数据集为 1 000 次,用 TreeView 软件显示系统树[11]。

2　结果与分析

2.1　酿酒酵母菌株基因的 PCR 扩增

2.1.1　琼脂糖凝胶电泳检测　图 1 表明,同一属内不同酵母菌株的 ITS-1 序列电泳条带在一条直线上,不同属之间差别明显。说明可以用琼脂糖凝胶电泳鉴别少量属于不同属的酵母菌株,且该方法较常规生理生化方法鉴别更简单、快速。

2.1.2　聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果　图 2 结果表明,同为酿酒酵母(*S. cerevisiae*)的不同亚种菌株 ITS-1 序列,电泳条带少部分有微小区别。该方法较琼脂糖凝胶电泳分辨率提高,原则上相差 1～2 个碱基就可以区别开来,但实际中细微差别的电泳条带用肉眼无法辨别,而且菌株数多时易发生混淆,也只能区别少量属之间菌株的差异,不适合种以下菌株的鉴别。

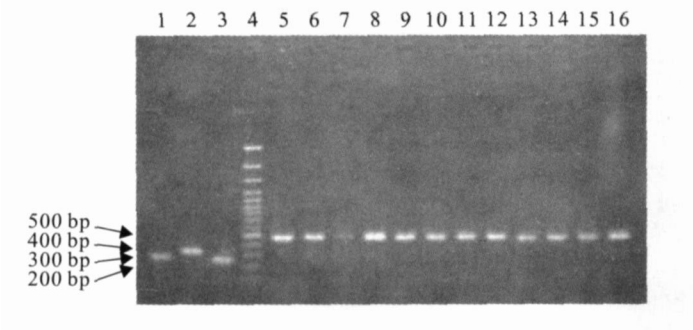

图 1　酵母菌株基因 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.1　Identification of agarose gel electrophoresis

1.c2.15;2.A1.12;3.B3.6;4.Marker;5.A1.25;6.A2.17;7.B1.11;8.B1.1;9.B1.2;10.B1.16;11.B2.1;12.B2.6;13.a3.6;14.B3.10;15.B3.7;16.B3.3

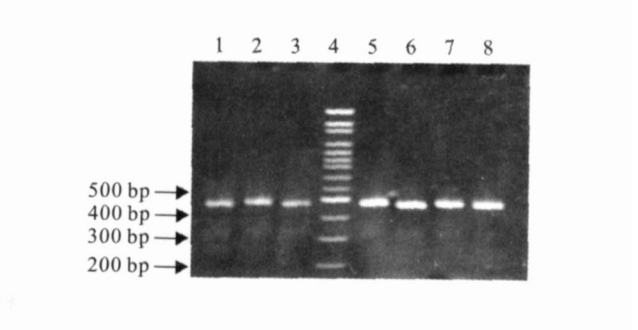

图 2　酵母菌株基因 PCR 扩增产物聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果

Fig.2　Identification of polyacarylamide gel electrophoresis

1.A1.25;2.A2.17;3.a3.6;4.Marker;5.a1.20;6.a1.26;7.a2.20;8.a2.23

2.2　阳性克隆的 PCR 初筛和双酶切检测结果

图 3 表明,A1.25 菌株的阳性转化质粒经 *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ双酶切后,得到了两条酶切片断,其中较小的一条酶切片断较 PCR 扩增片断稍大一点,较大片断与阴性质粒的双酶切片断大小基本一致,阳性质粒与阴性质粒的电泳条带差异明显,此结果也符合 pUCm-T 质粒载体上的序列特性,所以此克隆被认定为阳性克隆。

2.3　酿酒酵母菌株基因的测序结果

将所测序列登录到 GenBank,序列相同的登录其中一个,获取序列登录号,见表 1。用 ClustalX1.8软件对所测序列进行比对,结果表明,大多数酿酒酵母菌株之间的 ITS-1 序列有差异,主要表现为:序列中的一段 Ploy-T 上,最少的有 7 个 T,最多的有 13 个 T,说明序列的长短不同;其他差异均是个别碱基的变化,或为颠换,或为转换,长度上差别细微。

2.3.1　酿酒酵母菌株不同属之间的差异　酿酒酵母菌株不同属之间的差异非常明显,不仅在碱基数量上,而且在序列的比对结果上差异也很大,这与前面的电泳结果一致。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

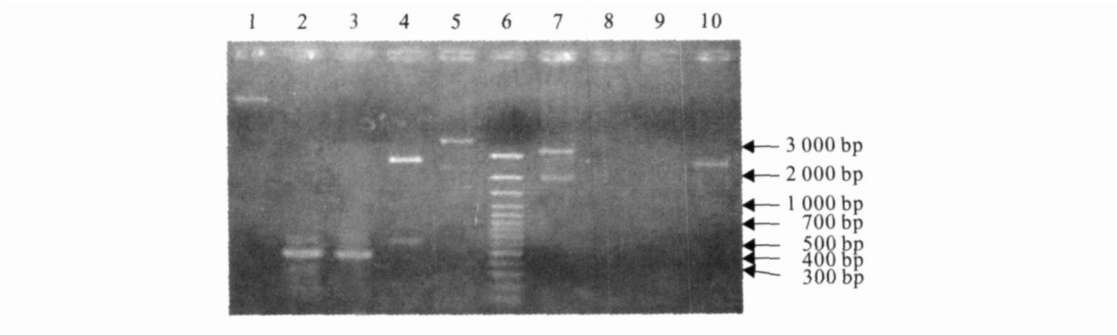

图 3 A1.25 菌株阳性转化质粒的 PCR 初筛和双酶切检测结果

1. 基因组 DNA ;2. 基因组 DNA 为模板的 PCR 产物 ;3. 阳性转化质粒的 PCR 产物 ;4. 阳性转化质粒的双酶切产物 ;5. 阳性质粒 ;6. Marker ;7. 阴性质粒 ;8. 阴性质粒的 PCR 产物 ;9. ddH_2O 为模板的 PCR 产物 ;10. 阴性质粒的双酶切产物

Fig. 3 Identification of A1.25 strain's masculine transformation plasmid by PCR and double enzymatic digest

1. Genetic DNA ;2. PCR of genetic DNA ;3. PCR of masculine transformation plasmid ;4. Double enzymatic digest of masculine transformation plasmid ;5. Masculine plasmid ;6. Marker ;7. Recessive plasmid ;8. PCR of recessive plasmid ;9. PCR of ddH_2O ;10. Double enzymatic digest of recessive plasmid

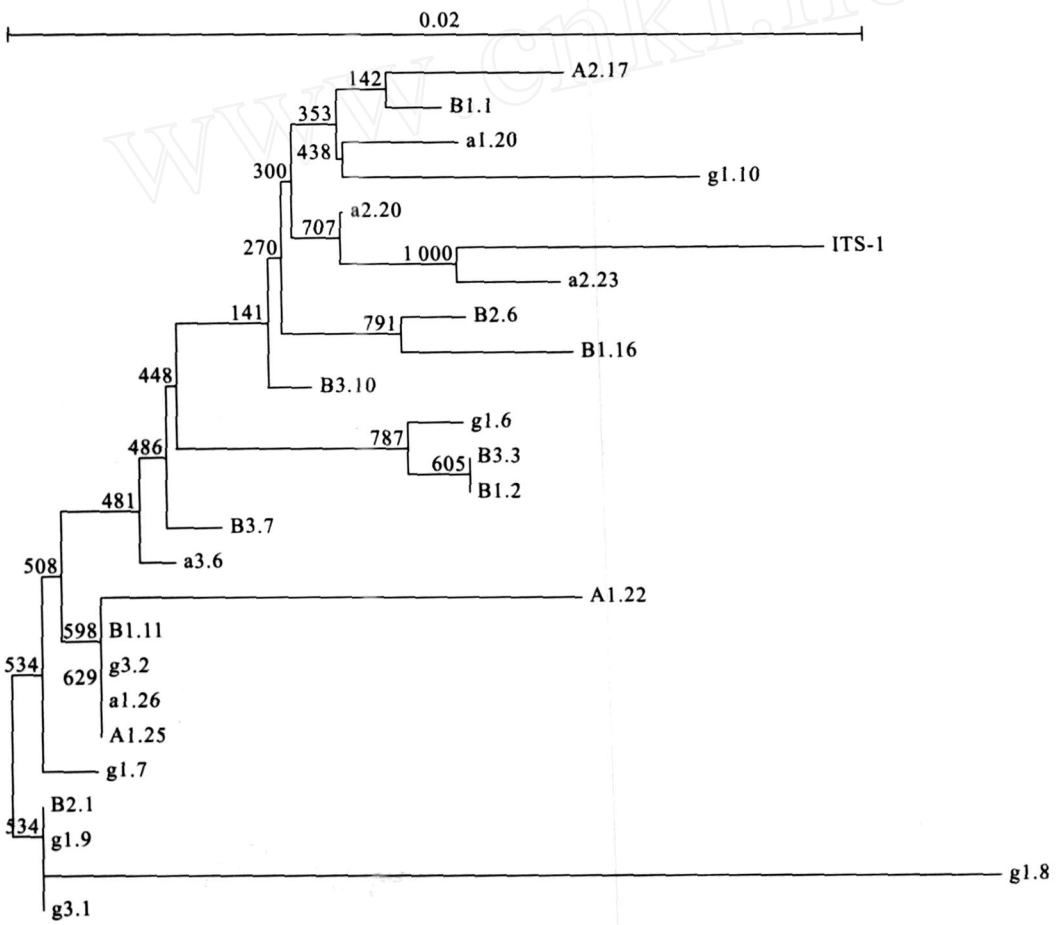

图 4 基于 ITS-1 序列以邻接法构建的酿酒酵母菌株系统发育树分支上的 Bootstrap 值

Fig. 4 Phylogenetic tree of *S. cerevisiae* strains drawn from neighbor joining analysis based on the ITS-1 sequence alignment number above lines represent bootstrap values

2.3.2 酿酒酵母菌株之间的差异 对酿酒酵母菌株的测序结果进行分析发现,有些酿酒酵母菌株之间的 ITS-1 序列完全相同,如菌株 A1.25、a1.26、g3.2 和 B1.11,菌株 B2.1、g1.9 和 g3.1,以及菌株

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

B1.1 和 B3.3,因此,可以认为它们分别是酿酒酵母菌中某个亚种(或变种)的不同菌株。

2.3.3　酿酒酵母菌株系统发育分析　图 4(Bootstrap 是来自 1 000 个复制序列的统计,0.02 表示序列差异水平)表明,与对照菌株亲缘关系最近的是 a2.23 和 a2.20 两个菌株,而 A1.22、g1.8 与其他酿酒酵母菌株之间的亲缘关系较远。目前,在该领域比较公认的观点是,具有相同 ITS 序列的酵母菌株应属于同一个种;在 ITS 序列中碱基差异大于 1 % 的菌株,则应属于不同的种[10-11]。用 DNAMAN 软件对不同菌株之间的相似性进行分析,结果表明,大部分菌株之间的相似性在 99 %以上,认为它们属于酿酒酵母内的不同亚种,而相似性小于 99 %的两个菌株,虽然和酿酒酵母的关系比较近,只能认为是酵母属中不同于酿酒酵母的其他菌株。这可能是因为在 ITS 全序列中,5.8S rDNA 的保守性强,不同菌株之间的序列基本没有变化,而酿酒酵母的 ITS-2 序列的保守性又强于 ITS-1 序列,序列变化相对后者更小,序列长度也小于后者的缘故。在 NCBI 上 Blast 后进一步确认,酵母菌 A1.22 是葡萄汁酵母(*S. uvarum*)、g1.8 是糖化酵母(*S. diastaticus*)。

3　讨　论

利用核糖体 DNA 的 ITS-1 序列在遗传进化中速度快的特性,可以对真菌和细菌进行分类鉴定。本研究中,琼脂糖凝胶电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳可将属之间的菌株区别开,是一种简便实用的分子鉴定方法,对少量属水平酵母菌株之间快速鉴定效果较好。利用琼脂糖和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测酵母菌株的关键是,要设计好 1 对特异引物,只有这样才能扩增出特异的目的条带,并直接影响到克隆测序的成功。在 PCR 反应过程中,反应条件的优化也很重要,除对各个步骤精心设计外,尤其是延伸这一步骤,以 1S、2S、4S、6S、8S、10S、12S、15S、20S、30S 等 10 个不同梯度对扩增效果进行琼脂糖电泳观察比较发现,5S 的延伸结果更佳。这些重要因素的采纳为快速准确鉴定酵母菌提供了方便。

采用克隆测序,尽管需要花费较多的时间,但是目前各个研究领域对真菌或细菌的分类,最终大多是用测序的方法来分析和鉴定菌种。测序对菌种的鉴定无疑是最可靠、最准确的,不仅能纠正以往在分类上出现的混乱,还可确立菌种间新的分类地位和亲缘关系。本试验区别出两株(A1.22、g1.8)非酿酒酵母属的菌株,测序结果与 GenBank 上发布的模式酿酒酵母差别较大,Blast 后确证二者分别是葡萄汁酵母和糖化酵母。用测序和其他方法对酵母菌进行分类学研究时,也存在一些难以避免的问题。如果鉴定的菌种太多,一些特殊性质的菌种就会影响分类结果,所以仍需要结合常规的形态特征和生理生化及分子生物学方法进行确证。在用不同的生物软件分析序列结果时,也会出现微小的差别。目前,国内外还没有一种通用而且绝对准确的鉴定方法,生物软件也只是以局部序列对整体进行分析,已有的分析方法和鉴定手段均处于不断的完善之中。

在分类研究中,应尽量做到各种方法结合应用,互为参照。简便、快速并能反映自然的亲缘关系是酵母菌分类的目标,分子生物学技术和计算机技术的快速发展、Internet 数据库的日益完善以及相关软件的日趋成熟必然带动核酸分子系统学的发展,而核酸分子系统学的发展必然使酵母菌的分类逐步进入理想的境界[9]。

[参考文献]

[1] 王启明. 中国担子菌酵母的分类和分子系统学研究[D]. 北京:中国科学院微生物研究所,2004.

[2] 白逢彦. 酿酒酵母属的分类学研究进展[J]. 微生物通报,2000,27(2):139-142.

[3] 白逢彦,贾建华. 脉冲电泳核型分析在酿酒酵母菌分类学研究中的应用[J]. 微生物学报,2000,40(1):9-13.

[4] David V,Leonard B. A Conerved motif in the 5.8S ribosomal RNA genes is a useful diagnostic marker for plant internal transcribed spacer(ITS) sequences[J]. Plant Molecular Biology Reporter,1997,15:326-334.

[5] Su Yao-Chi. Differential diagnosis of five avian *Eimeria* species by polymerase chain reaction using primers derived from the internal transcribed spacer 1(ITS-1) sequence[J]. Veterinary Parasitology,2003,117:221-227.

[6] 黄培堂. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 北京:科学出版社,2002.

[7] 徐学锋,林范学,程水明,等. 中国香菇自然种质的 rDNA 遗传多样性分析[J]. 菌物学报,2005,24(1):29-35.

[8] 许超德,李绍兰,杨丽源,等. 几株云南野生隐球酵母菌的分类研究[J]. 云南大学学报,2004,26(1):75-79.

[9] 白逢彦,贾建华,梁慧燕. 假丝酵母属疑难菌株大亚基 rDNA D1/D2 区域序列分析及其分类学意义[J]. 菌物系统,2002,21(1):27-32.

[10] 毛志群,张　伟,马　雯. 分子生物技术在酵母菌分类中的应用进展[J]. 河北农业大学学报,2002,25(Sup.):230-233.

[11] 许超德,李绍兰. 核酸分子系统学方法在酵母菌分类中的应用进展[J]. 微生物通报,2004,31(3):126-129.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net