

阎氏菌科的 16S rRNA 可变区二级结构分析*

姜 怡^{1,2} 唐蜀昆¹ 徐丽华^{1**} J. F. Imhoff² 刘志恒³ 姜成林¹

(微生物药物国家工程研究中心云南省微生物研究所 昆明 650091)¹

(Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Universität Kiel, Dusternbrooker Weg 20, D-24105 Kiel, Germany)²

(中国科学院微生物研究所 北京 10080)³

摘要: 采用 16S rRNA 可变区二级结构图形分析, 比较了阎氏菌科阎氏菌属典型种与微球菌亚目中几个相关科属典型种可变区二级结构的变化。结果表明, V3、V4 存在明显的不同。将 16S rRNA 二级结构划分成不同的结构单元, 提出在 9 个可变区中, 至少要有 2 个不同的结构单元才可以定为新科, 存在 1 个不同的结构单元可以定位新属; 并认为 16S rRNA 可变区二级结构分析, 可以作为一种辅助手段, 应用于原核生物属以上水平的分类。

关键词: 16S rRNA, 二级结构, 阎氏菌科

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0176-07

Analysis for Secondary Structure of Variable Regions of 16S rRNA of the Family Yaniaceae*

JIANG Yi^{1,2} TANG Shu-Kun¹ XU Li-Hua^{1**} J. F. Imhoff
LIU Zhi-Heng³ JIANG Cheng-Lin¹

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091)¹

(Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Universität Kiel, Dusternbrooker Weg 20, D-24105 Kiel, Germany)²

(The Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)³

Abstract: Secondary structure of nine variable regions of 16S rRNA of members of the Family Yaniaceae and related family and genera were selected. Patterns of the variable regions were analysed and compared. Result indicates that the Family Yaniaceae is different from members of the suborder micrococineae in numbers and size of cycles, stem and single chains of 9 variable regions, and proposal of the family Yaniaceae is reasonable. These data suggest that pattern analysis can be used as one criterion in characterization of bacteria over general level.

Key words: 16S rRNA, Secondary structure, Yaniaceae

核糖体是生物合成蛋白质的主要场所。核糖体 16S rRNA 基因的全序列分析作为原

* 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (No. 2004CB719601)

国家自然科学基金项目 (No. 30270004、30560001)

** 通讯作者 Tel: 0871-5035263, Fax: 0871-5173878, E-mail: lihxu@ynu.edu.cn

收稿日期: 2006-04-16, 修回日期: 2006-07-06

核生物分类的主要依据已经得到广泛应用^[1]。其优点是序列既保守又变化，大小适中，便于定量，测序、分析技术程序成熟。其实，核糖体在蛋白质合成过程中，rRNA 是以其高级结构发挥功能的。如果把生物的分类与功能相结合，必然要涉及 rRNA 的高级结构的分析。本文在前文^[2]工作的基础上，试图以阎氏菌科 (Yaniaceae)^[3]为例，进一步探讨 16S rRNA 基因二级结构分析应用于放线菌分类的可能性。

1 可变区系统发育分析

从 GenBank 调集阎氏菌科阎氏菌属的两个菌种、微球菌亚目几个相关科属的典型菌，*Brevibacterium linens* 作为外群，共 11 个菌的 16S rRNA 基因序列，选取每个菌株 1~9 可变区 (V1~V9) 的序列，连接，再用邻接法及相关软件，构建 16S rRNA 二级结构“可变区系统发育树”，结果如图 1。为了对比，构建了 16S rRNA 全序列的系统发育树 (图 2)。这两棵树的整体图形差别很小，*Micrococcus lylae* 和 *Citricoccus muralis*; *Rothia mucilaginosa* 和 *Kocuria polaris*; *Yania halotolerans* 和 *Yania flava* 等在两棵树上都仍然聚在一起。但是可变区发育树中，各个菌种之间的差异却明显的扩大了。例如，图 1 *Yania flava* 与 *Citricoccus muralis* 的差异在 6.13%，而在图 2，它们的差异扩大到 8.33%，即提高了 26% 的分辨率。对于一些大属 (尤其对于链霉菌属达几百种之多)，提高分辨率对分类有利。

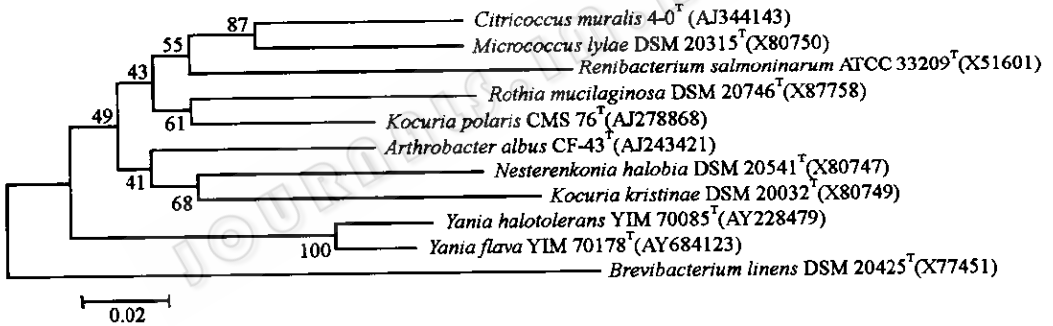


图 1 阎氏菌科与相关科属 16S rRNA 9 个可变区构建的系统发育树

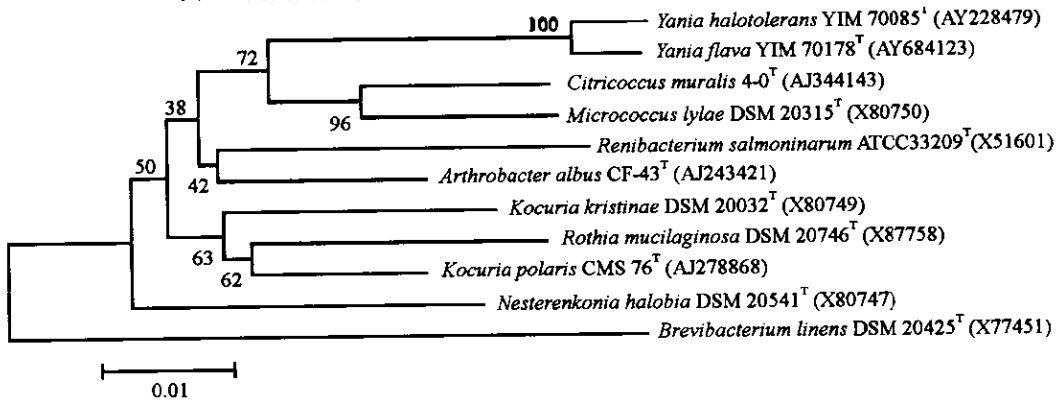


图 2 阎氏菌科与相关科属 16S rRNA 全序列构建的系统发育树

2 可变区二级结构图形分析

2.1 V1 区 按照前文^[2]的方法构建的 V1 可变区二级结构的图像 (图 3) 表明，10 个

菌 (*Brevibacterium linens* 未显示) 的图形分为两种类型, *Nesterenkonia halobia*, *Kocuria polaris*, *Rothia mucilaginoso* and *Micrococcus lylae* 为一种类型, 由两个茎连接 1 个较大的内环、1 个端环所组成; 另外 6 个菌除此之外, 其尾部分别有两条碱基组成相同的单链, 且内环较小; 各个菌种内环的大小和组成, 茎的长短和组成各有不同。总体上, V1 区的二级结构相对保守, 图形差异较小。

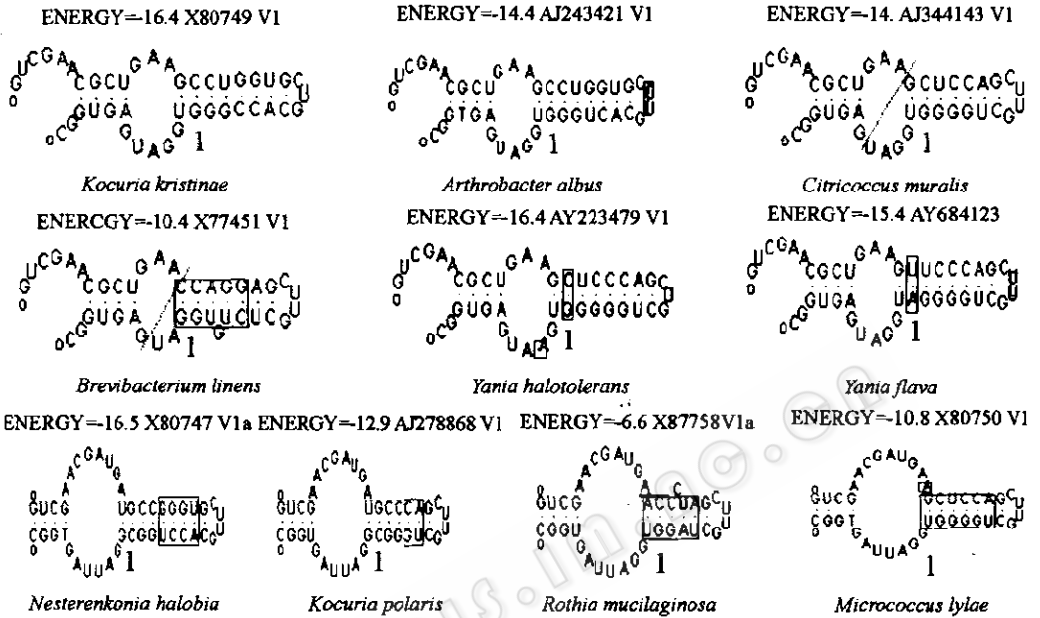
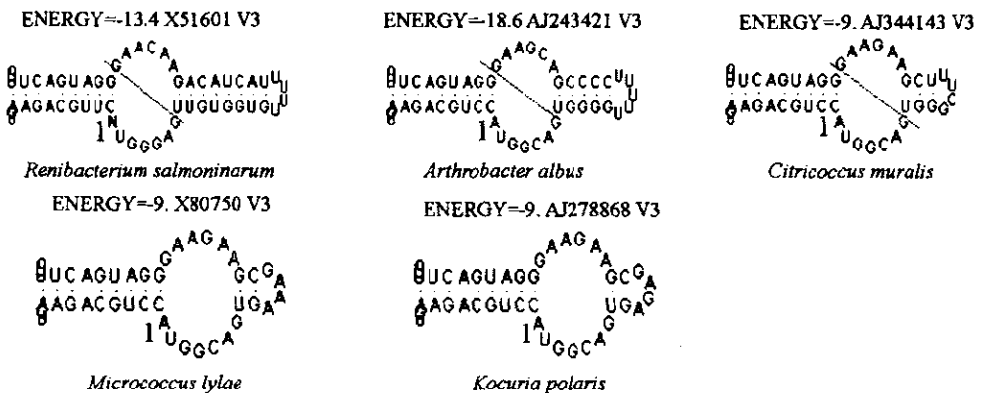


图3 *Yania* 和相关菌种 V1 可变区的二级结构

2.2 V3 区 V3 可变区二级结构图形如图 4。 *Renibacterium salmoninarum*, *Arthrobacter albus*, *Citricoccus muralis*, *Micrococcus lylae*, *Kocuria polaris*, *Kocuria kristinae* and *Nesterenkonia halobia* 7 个菌为一种类型, 由两个茎 (其中 1 个茎均含有 A-A 未配对碱基, 也可以称之为内环) 连接 1 个内环、一个端环组成; *Rothia mucilaginoso* 为另一个类型, 由 1 个茎连接一个大的端环和两条未配对单链组成; *Brevibacterium linens* (外群) 由两个茎、1 个端环、1 个内环、1 个突环, 两条单链组成; *Yania halotolerans* 则由 4 个茎、3 个内环、1 个端环组成。很显然, *Yania halotolerans* 的图形为一个独特的类型, 与所有其他相关菌都不同, 完全可以将它们彼此分开。



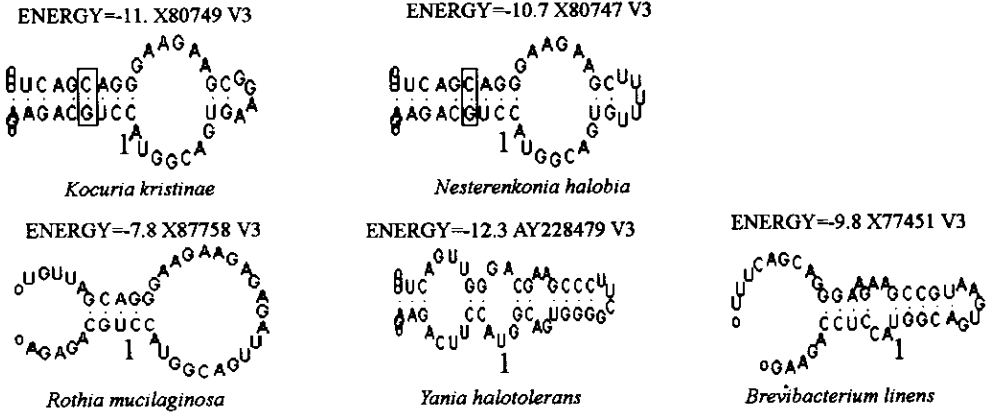


图 4 *Yania* 和相关菌种 V3 可变区的二级结构

2.3 V4 区 V4 区的图像示于图 5，可以分为 5 种类型。*Renibacterium salmoninarum*, *Kocuria polaris*, *Rothia mucilaginosa*, *Arthrobacter albus*, *Kocuria kristinae*, *Nesterenkonia halobia* 等 6 个属属于相同类型，由 UG 单链两边各连接 1 个茎，左边的茎有 1 个 G (*Nesterenkonia halobia* 为 A) 突环，右边的茎连接 1 个内环、1 个茎和 1 个端环；*Kocuria polaris* 与这 6 个菌不同之处在于有 A-A 未配对碱基，使原来完整的双螺旋（茎）断裂；*Citricoccus muralis* 由 3 个茎连接两个内环和 1 个端环组成；*Brevibacterium linens* (外群) 由 3 个茎连接两条单链、两个内环和 1 个端环组成；*Yania* 两个种则是由 U-G 和 GA 两个未配对碱基分别连接的 3 个茎（其中 1 个 A 突环）、1 个端环所组成，而没有

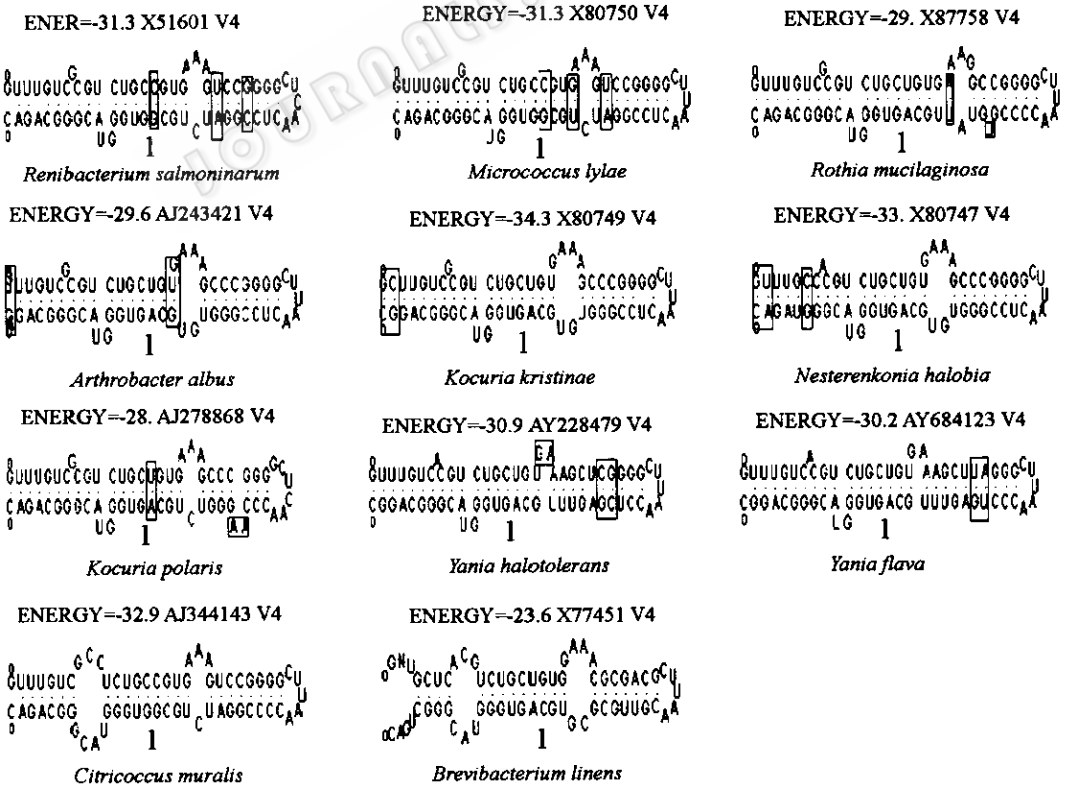


图 5 *Yania* 和相关菌种 V4 可变区的二级结构

内环, 属于一个单独的类型, 与其他4种结构明显不同。

2.4 V5区 V5区二级结构图形示于图6。所有11个菌的图形一致性较高, 都属于同一种类型。*Yania* 与其他菌种不同之处仅在于碱基组成的差异。

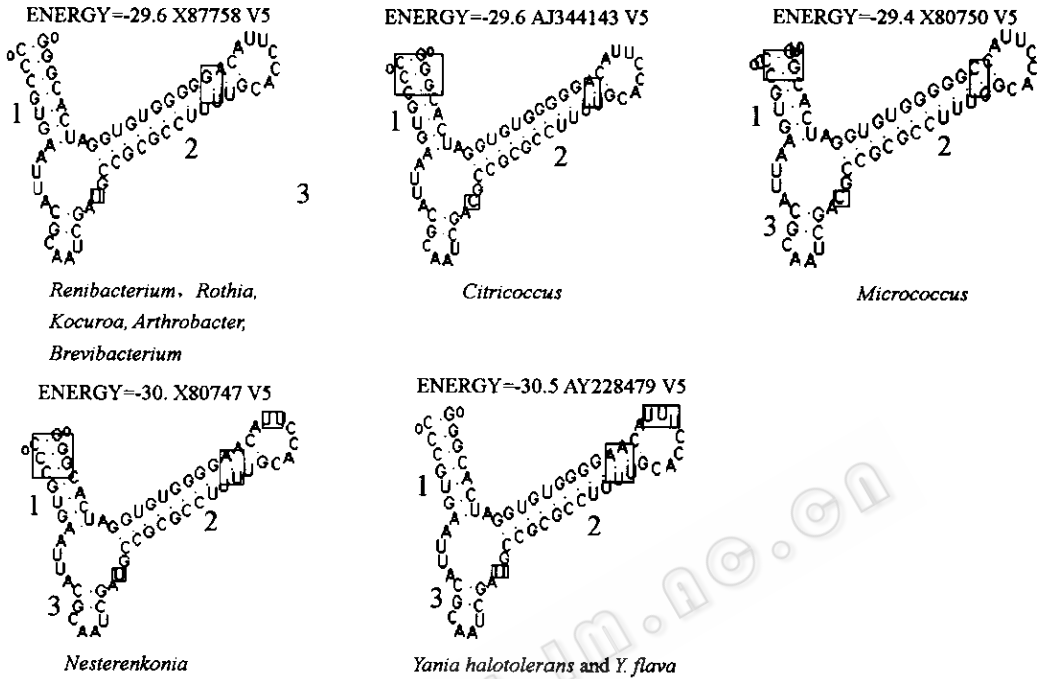
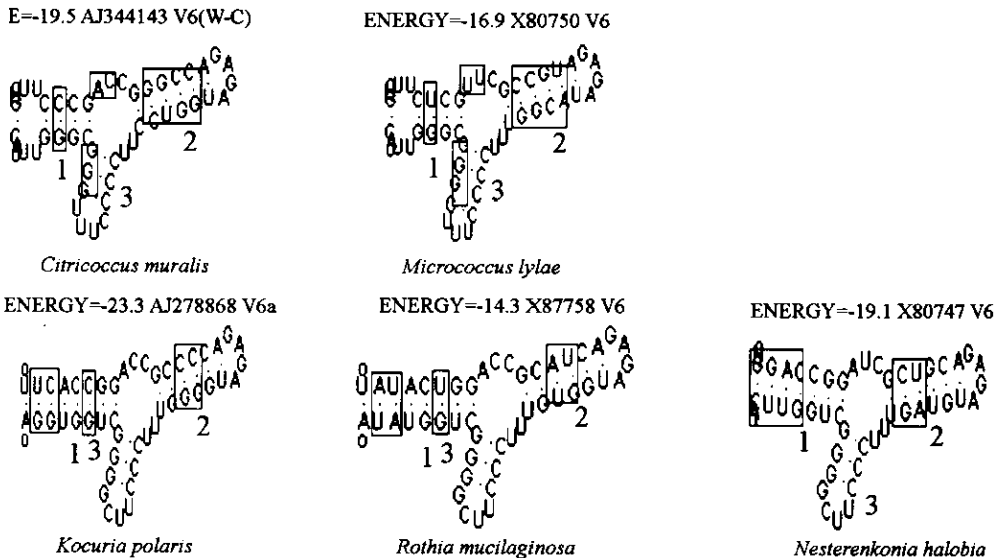


图6 *Yania* 和相关菌种 V5 可变区的二级结构

2.5 V6区 V6区的图形示于图7。*Citricoccus muralis* 和 *Micrococcus lylae* 属于同一类型, 由1个内环连接3个茎、3个端环组成; *Kocuria polaris*, *Rothia mucilaginoso*, *Nesterenkonia halobia*, *Arthrobacter albus*, *Yania halotolerans*, *Yania flava*, *Renibacterium salmoninarum* 和 *Kocuria kristinae* 属于另一类型, 由3个茎、2个端环、1个内环组成, 比前一种类型少1个端环, 彼此的碱基组成各异; *Brevibacterium linens* (外群) 是一个单独的



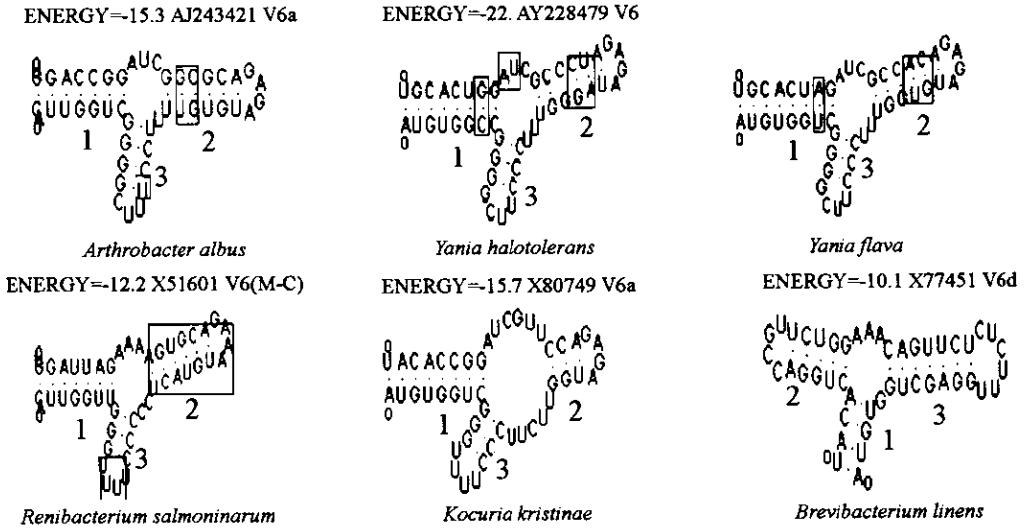


图7 *Yania* 和相关菌种 V6 可变区的二级结构

类型, 虽然也是由3个茎、2个端环、1个内环组成, 但端环的位置不同, 其端环与茎2连接, 而茎1却无端环。

2.6 V8区 V8区的图形示于图8, 可以分为两种类型。 *Kocuria polaris*, *Kocuria kristinae*, *Micrococcus lylae*, *Arthrobacter albus*, *Rothia mucilaginos* 和 *Renibacterium salmoninarum* 属于同一类型, 由3个茎、两个大小不一的内环、1个端环组成, 但 *Renibacterium salmoninarum* 的一个内环仅为 A-G 未配对碱基构成的小环; *Yania halotolerans*, *Y. flava*, *Nesterenkonia halobia* 和 *Brevibacterium linens* 为另一个类型, 是由 CU 连接3个茎、1个由 G-G 组成的内环和1个端环构成。

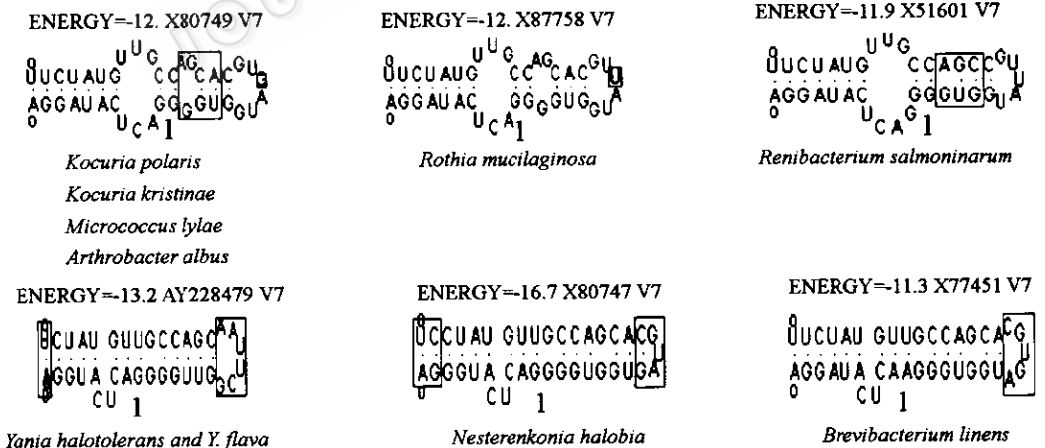


图8 *Yania Yania* 和相关菌种 V7 可变区的二级结构

3 讨论

通过上述6个(其他未列出)可变区二级结构的图形分析可以看出, 阎氏菌科 V3, V4 区的二级结构类型与相邻科属不同, 存在明显的差异, 完全可以将阎氏菌科与

它们分开,说明阎氏菌科可以成立。

当代放线菌分类是以 SSU rRNA (尤其是 16S rRNA) 一级结构序列分析及所构建的系统发育树为基本依据。其中一个优点是可以得到比较菌种之间的相似性,并以“%”定量表示其结果。定量看起来很准确,其实所确定的标准仍然有人为性。例如 16S rRNA 序列相似性小于 97% 作为定种的基本界限,但仍然需要其他定性证据,才能比较客观地判定一个种是否成立。还有,如果从进化与功能的角度看问题,每个碱基所扮演的角色不可能是完全相等的。这点是一级结构序列分析不能显示的。核糖体结构与功能研究的结果认为,尽管 rRNA 的高级结构是以一级结构为基础的,但在执行蛋白质合成等各项功能时,高级结构的稳定性更为重要。相对于保守区,16S rRNA 9 个可变区的碱基组成更容易被替换,或发生突变。但尽管是可变区,其高级结构却相对稳定。这种高级结构的保守性对于维系其功能非常重要。如果一级结构的碱基突变不致改变其高级结构,则不影响其功能。高级结构的变化,将导致功能变化。因此,rRNA 高级结构的分析应该具有分类意义。不过高级结构的分析远比一级结构分析困难得多,核心问题是难于定量。因此,SSU rRNA 全序列分析与二级结构分析相结合有可能起到取长补短的作用,而使分类更加接近客观实际。

阎氏菌科及姜氏菌属及相关科属典型菌株 16S rRNA 9 个可变区二级结构图形分析的结果表明,其结构存在 3 种基本结构单元:环(包括端环、内环、突环),双螺旋(茎)和单链;3 种结构单元的大小,位置,长度及碱基组成各不相同。我们建议,在以 SSU rRNA 基因一级结构序列分析进行分类时,增加以下两个补充手段。

(1) 将 16S rRNA 9 个可变区构建的系统发育树作为区别分类单元的手段之一。它可以提高分辨率。(2) 将 16S rRNA 9 个可变区二级结构图形分析作为区分属以上分类单元的手段之一。我们建议将 3 种基本结构单元(环,茎,单链)的数量、有无和位置作为区分结构类型的主要依据,而不管这些结构单元的大小、长度及碱基组成。如果 9 个可变区中,存在至少两个以上不同的结构类型,就可以将其定为新科;如果存在一个独特类型,可以定为新属。

参 考 文 献

- [1] Stackebrandt E, Rainey F A, Ward-Rainey N L. *Int J Syst Bacteriol*, 1997, **47**: 479 ~ 491.
- [2] 陈国忠, 姜 怡, 唐蜀昆, 等. *微生物学通报*, 2006, **33**: 184 ~ 187.
- [3] Li W J, Schumann P, Zhang Y Q, *et al.* *Int J Syst Evol Microbiol*, 2005, **55**: 1933 ~ 1938.