

# 新的系统发育标记及其应用\*

石楠 张利平

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

**摘要:**系统发育标记是阐明个体间遗传关系的基因片段,为了区别遗传关系接近的分类单元,有许多新的系统发育标记被应用,配合其它分类手段的使用,为多相分类的研究注入了新的活力。本文就几种系统发育标记的特性及其在细菌系统发育研究中的作用做简要介绍。

**关键词:**系统发育标记, RNase P RNA 基因, *gyrB*, *gap*

**中图分类号:** Q93      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0253-2654 (2003) 03-0112-04

## NEW PHYLOGENETIC MARKERS AND THEIR APPLICATIONS

SHI Nan      ZHANG Li-Ping

(College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002)

**Abstract:** Phylogenetic markers are the gene fragments that demonstrate the genetic relationships between organisms. To differentiate close taxa, many new phylogenetic markers were used, with which the polyphasic taxonomy was enriched. This article chiefly described the characters of several phylogenetic markers and their applications in the studies of the phylogenetics of bacteria.

**Key words:** Phylogenetic markers, RNase P RNA gene, *gyrB*, *gap*

现今的微生物学领域中,研究各级分类单元的最有效手段是多相分类(Polyphasic taxonomy),它是目前公认的能更客观反应生物间自然系统进化关系的分类方法。多相分类的概念最早由 Colwell (1970)<sup>[1]</sup>提出,其中使用的数据和信息有3类:表型的、基因型的(或遗传型)和系统发育学的。表型信息包括:培养形态、生理生化等表型性状的分析,细胞壁化学组分和磷酸类脂、醌、全细胞脂肪酸等细胞化学的分析,还有全细胞可溶性蛋白电泳及核糖体蛋白图谱共8类;基因型信息来自于对细胞DNA或RNA分子的分析,常用方法有DNA的G+C mol%、DNA-DNA分子杂交、DNA-rRNA分子杂交、DNA限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLP)、随机扩增DNA片段多态性(Randomly Amplified Polymorphic DNAs, RAPD)的分析等,这些方法已成为现代细菌分类的主导方法;而系统发育学信息的研究一般采用一些基因片段作为分析对象,这些就是系统发育标记(Phylogenetic Markers)。系统发育标记是表示遗传关系的标识,应用不同的标记再结合其它分类信息可以将细菌的遗传关系及分类单元确定到种、属、科等不同的等级<sup>[2]</sup>。将微生物表型、基因型及系统发育3个不同层次的性状数据进行分析比较,这样得到的被研究对象的系统分类地位更接近生物界的自然分类系统。目前选用的系统发育标记以16S rDNA序列为主,随着科学技术的发展,又有许多新的系统发育标记被发现,并作为系统细菌分类的新生力量,逐步展示着自己的作用与价值。以下主要综述几种近来常用的系统发育标记。

\* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30270002)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30270002)

收稿日期: 2002-10-22, 修回日期: 2003-01-20

## 1 RNase P RNA 基因 (*rnpB*)

核酶 (Ribozymes) 是具有酶活性的 RNA 分子, 它们可以催化自身或其它 RNA 分子断裂。RNase P 是一种核糖核蛋白复合体, 存在于所有细胞中, RNA 就是 RNase P 的催化亚基。不同细菌类群的 RNase P RNA 基因序列间变化很大, 只有 35% ~ 50% 的相似性。在 G<sup>+</sup> 细菌中 RNase P RNA 由单拷贝基因 *rnpB* 编码, 其大小相对保守, 350bp ~ 400bp<sup>[2,3]</sup>。Herrmann<sup>[3]</sup>等曾对衣原体属 (*Chlamydiaceae*) 3 个种 *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* 和 *C. psittaci* (包括 11 个菌株和 14 个血清型) 的 *rnpB* 进行了 PCR 扩增, 种间的序列相似性小于 85%; 结合 PCR 产物的 RFLP 分析可以将 3 个种区分开来, 其中 *C. trachomatis* 的 14 个血清型之间的 *rnpB* 序列还有一个碱基的差异。Herrmann 等之后又对该属 9 种 60 个菌株的 *rnpB* 序列进行了分析, 认为其序列的不同可以作为衣原体种区分的标记。Schon 等<sup>[4]</sup>对 *Prochlorococcus* 类群不同成员的 *rnpB* 研究发现, 其序列差异性达到 27%, 由此构建的系统发育树与基于 16S rDNA 的树近似但不完全相同, 对于关系很近的基因型可以给出较独立的进化分枝。而糖单孢菌属 (*Saccharomonospora*) 典型菌株的 *rnpB* 种间相似性为 94.2% ± 1.3%, 种内相似性为 99.7% ~ 100%, 以此构建的系统发育树与用 16S rDNA 序列得到的结果类似<sup>[5]</sup>。从以上研究结果看出, *rnpB* 序列可以作为 16S rDNA 序列系统发育分析的有力补充, 在细菌的不同种属间进行种水平的分子鉴定。

## 2 *gyrB*

*gyrB* 即促旋酶 (*gyrase*) 的 B 亚单位基因, DNA 促旋酶是原核 II 型拓扑异构酶。Hiroaki 等<sup>[6]</sup>对分枝杆菌属 (*Mycobacterium*) 15 种 43 个菌株的 *gyrB* 序列分析认为, *gyrB* 序列可以比 16S rDNA 序列更好的区分相似种。因为 16S rDNA 的平均碱基替换率是每 5,000 万年 1%, 而 *gyrB* 是每 100 万年 0.7% ~ 0.8%, 所以 *gyrB* 序列分析可应用于种的鉴定。日本已建立细菌鉴定与分类数据库 (Identification and Classification of Bacteria, ICB), 提供关于 *gyrB* 序列的数据 (参见网站 [www.mbio.co.jp](http://www.mbio.co.jp))。他们又对小单孢菌属 (*Micromonospora*) 15 个有效描述的种和 4 个亚种的 *gyrB* 序列进行了研究, 得到了与基于 16S rDNA 序列相似的系统发育关系, 但种内关系结果不同。经过与 DNA-DNA 杂交结果比较, 得出的结论是基于 *gyrB* 序列的分类关系更符合杂交结果。于是 Hiroaki 等认为 *gyrB* 序列作为分类手段, 可用于高 G + C mol% 的 G<sup>+</sup> 细菌种或亚种水平的系统发育关系的分析<sup>[7]</sup>。Suzuki 等<sup>[8]</sup>在将一类海洋细菌定为新属时将 *gyrB* 序列分析作为多相分类的一个指标, 认为在种的水平上使用 *gyrB* 序列要优于 16S rDNA 序列, 基于 *gyrB* 的分群与 DNA-DNA 杂交结果相符合。Dauga<sup>[9]</sup>在比较肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*) 不同属的系统进化关系时发现, 基于 *gyrB* 和 16S rRNA 基因, 不同属表现不同水平的变化。16S rRNA 基因适于描述较远的系统发育关系, 而 *gyrB* 序列比较适用于属内或属间关系的比较。可见, *gyrB* 序列作为定种的标记已得到了有力而广泛的证明, 而 *gyrB* 结合其它标记一同使用, 可以将其作用更好发挥。譬如 *gyrB* 曾与 *rpoD* 配合使用 (*rpoD* 是 RNA 聚合酶  $\sigma$ -70 因子的基因), 在对假单孢菌属 (*Pseudomonas*) 20 个菌株的系统分析中, 得到了与 16S rDNA 分析不同的结果, 作者认为只有非可变区的 16S rDNA 序列可用于系统分析, *gyrB* 与 *rpoD* 分析则将菌株 *P. putidabionus* B 的分类位置重新定位<sup>[10]</sup>。

### 3 gap

*gap* 是编码三磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 的基因。Brown 等<sup>[11]</sup> 对欧文氏菌属 (*Erwinia*) 和 *Brenneria* 属的 57 个分离物进行了 *gap* 片段的 PCR 扩增, 测序结果及系统发育分析结果表明, 这两属的分离物之间有显著的种间遗传多样性, *gap* 序列所拥有的遗传变异足以区分这两属的不同种。Yugueros 等<sup>[12]</sup> 在研究葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 时发现, 采用一对特异引物, *gap* PCR 扩增的结果具有高度的特异性, 可以快速的鉴定出该属的至少 12 个种; 若利用 *gap* PCR 与 RFLP 的结合, 则可以将该属的 24 个亚种特异鉴别。真核生物中也以三磷酸甘油醛脱氢酶的基因作为系统研究的手段, 该基因用 *gpd* 表示, 但不属于本文介绍范畴, 不再赘述。

### 4 其它

细菌中系统发育标记多种多样, 还有许多不同的标记应用于系统发育研究领域, 只是不同的标记应用范围可能不同。Hosam 等<sup>[13]</sup> 用编码 RuBP 羧化酶 (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO) 的基因对深海微生物进行了研究。一般 RuBisCO 有两种类型, I 型和 II 型的大亚基分别由 *cbbL* 和 *cbbM* 编码, 大亚基是这种酶负责固定二氧化碳的部位。他们发现从厌氧古菌中分离到的 RuBisCO 基因与已知的类型相去甚远, 原核生物中 RuBisCO 的类型变化多样, 需氧种与厌氧种、光能自养与化能自养的种之间各不相同。他们认为, RuBisCO 基因的多样性就可以反映深海自养微生物群落系统发育的多样性, 而利用 RuBisCO 基因与 16S rDNA 就可以弄清深海共生与周生微生物区系间的系统发育关系。Felis 等<sup>[14]</sup> 利用管家基因 *recA* (277bp) 的序列测定及系统发育分析将乳杆菌群 (*Lactobacillus casei* group) 中种的分类地位进行了研究, 发现菌株 *L. casei* ATCC 334 和 *Lactobacillus paracasei* NCD0 151 (T) 形成独立的系统发育群, 为乳杆菌群的分类变更提供了新证据。Kwan 等<sup>[15]</sup> 利用部分 RNA 聚合酶基因 (*rpoB*) 和 *DotA* 基因 (*dotA*) 序列分析嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 各亚种的种群结构, 发现其间有水平基因转移或重组, 证明了遗传重组在嗜肺军团菌进化中的重要性。目前应用最广的系统发育标记仍然是 16S rDNA 序列, 但其局限性也日渐显露, 比如在确定密切相关个体间的关系时它是不太适宜的, 在定种时又是不完备的<sup>[4]</sup>。所以尽管 16S rDNA 序列测定在目前的细菌系统学中必不可少, 仍然有必要找到其它的系统发育标记支持或补充其结果。当然, 新生的系统发育标记也好, 传统的分子生物学手段也好, 都只是多相分类的一个环节, 都需要其它分类信息的互相印证才能得到准确的结果, 多种信息的综合才是多相分类的大趋势。

不断涌现出的多种系统发育标记各有千秋, 除以上描述的以外, 还有 ATP 合成酶的  $\beta$  亚单位基因、谷氨酸合成酶基因、延长因子 Tu 基因、类组蛋白基因 (*hbb*)、热激蛋白基因 (*hsp60*) 等都被用于系统发育研究中; 所有这些系统发育标记有的崭露头角, 有的蕴涵巨大潜能, 但还都需要实践的进一步检验。作为分子生物学迅速发展的必然结果, 相信还会有新的标记种类被发现, 同时现有标记的作用也将得到更清晰的确认, 应用范围将更加广泛, 这都将为细菌系统学研究做出不可估量的贡献。

## 参考文献

- [1] Colwell R R. *J Bacteriol*, 1970, **104**: 410~433.
- [2] Yoon J H, Park Y H. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 2021~2029.
- [3] Hermann B, Pettersson B, Everett K D E, *et al.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 149~158.
- [4] Schon A, Fingerhut C, Hess W R. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, **52**: 1383~1389.
- [5] Cho M, Yoon J H, Kim S B, *et al.* *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, **48**: 1223~1230.
- [6] Hiroaki K, Takayuki E, Shigesaki H. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, **38** (1): 301~308.
- [7] Hirnaki K, Tomohiko T, Shigeaki H. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 127~134.
- [8] Suzuki M, Nakagawa Y, Harayama S, *et al.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**: 1639~1652.
- [9] Dauga C. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, **52**: 531~547.
- [10] Yamamoto S, Harayama S. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, **48**: 813~819.
- [11] Brown E W, Davis R M, Gouk C, *et al.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, **50**: 2057~2068.
- [12] Yugeros J, Temprano A, Sánchez M, *et al.* *Journal of Clinical Microbiology*, 2001, **39** (10): 3693~3695.
- [13] Hosam E, Takeshi N. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, **67** (4): 1751~1756.
- [14] Felis G E, Dellaglio F, Mizzi L, *et al.* *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2001, **51**: 2113~2117.
- [15] Kwan S K, Hae K L, Mi Y P, *et al.* *Journal of Bacteriology* 2003, **175**: 1111~1115. © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>