

放线菌研究专栏

16S rRNA 二级结构可变区图形分析在放线菌分类中的应用*

陈国忠¹ 姜 怡^{1,2} 唐蜀昆¹ 李文均¹ 徐丽华^{1**}

(教育部微生物资源重点实验室云南省微生物研究所 云南大学 昆明 650091)¹
(Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Universität Kiel, Dusternbrooker Weg 20,
D-24105 Kiel, Germany)²

摘要: 采用 16S rRNA 可变区二级结构图形分析, 比较了姜氏菌属及几个相关属种可变区二级结构的变化。结果表明, 在 9 个可变区二级结构中茎的长度、环的数目和类型、茎的碱基对、以及环内部碱基均有不同。尤其在 V5 和 V6 两个区, 这种差别尤为明显。这为姜氏菌属的建立提供了又一个证据, 并认为 16S rRNA 可变区二级结构分析, 可以应用于属以上原核生物的分类。

关键词: 16S rRNA, 二级结构, 放线菌分类

中图分类号: 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654 (2006) 02-0184-04

Application of Analysis for Variable Regions of Secondary Structure of 16S rRNA in Actinomycete Classification*

CHENG Guo-Zhong¹ JIANG Yi^{1,2} TANG Shu-Kun¹ LI Wen-Jun¹ XU Li-Hua^{1**}

(The Key Laboratory for Microbial Resources of Ministry of Education, Yunnan Institute of Microbiology,
Yunnan University, Kunming 650091, China)¹
(Leibniz-Institut für Meereswissenschaften an der Universität Kiel, Dusternbrooker Weg 20,
D-24105 Kiel, Germany)²

Abstract: Secondary structure of nine variable regions of 16S rRNA of members of the genus *Jiangella* and related genera were selected. Patterns of the variable regions were analysed and compared. Result indicates that genus *Jiangella* is different from members of *Actinopolymorpha*, *Aeromicrobium*, *Nocarioides* and *Kribbella* in length and base composition of stem, and types, numbers and bases of cycles of the variable regions, and proposal of the genus *Jiangella* is reasonable. These data suggest that pattern analysis can be used as one criterion in characterization of bacteria at general level.

Key words: 16S rRNA, Secondary structure, Actinomycete classification

1992 年, Wisotzkey 等^[1]对芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的 16S rRNA 序列进行系统发育分析, 比较了该属菌种 16S rRNA 部分同源区段的二级结构, 并结合脂肪酸类型, 从该属划分出一个新属: 脂环酸芽孢杆菌属 (*Alicyclobacillus*)。2003 年, 陈朝银等^[2]对 *Thermaceae* 科 38 株菌的 16S rRNA 序列进行了系统分析, 重点研究了 16S rRNA 的特征

* 国家 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: 2005-12-07, 修回日期: 2006-01-16

性核苷酸和二级结构特征，将 38 株菌划分为 18 个种，此结果与 NCBI 中的分类基本一致。郭春雷等^[3]对其所分离得到的几株栖热菌属 (*Thermus*) 的菌株和该属一些有效发表种进行了 16S rRNA 的系统发育分析，预测并比较了 16S rRNA 部分区段的二级结构，利用内环、内环与发卡环之间碱基对数目以及发卡环的碱基数目区分种间差异，证明 16S rRNA 二级结构可以用来区分种一级的分类单位。本文报道利用 16S rRNA 可变区二级结构的图形分析，应用于姜氏菌属 (*Jiangella*)^[4] 的鉴定分析。

1 材料与方法

1.1 序列比对 将姜氏菌属 (*Jiangella*) 的典型菌株 YIM 002^T (序列注册号 AY631071)、相关属典型菌和 *E. coli* (J01695) 的 16S rDNA 序列编辑成为 Fasta 格式的文本文件，用 Clustal X 进行比对。

1.2 剪切并另存可变区 V1-V9 区段 根据 *E. coli* 的 16S rRNA 的二级结构模式图，在比对结果中剪切选取需要折叠预测的 V1-V9 可变区区段。

1.3 对上述序列进行编辑 将 T 替换成 U，并去掉序列中的空位 “-”。

1.4 折叠 打开 RNAstructure3.71 程序，选择 File-New Sequence；选取其中一段序列，复制，粘贴至 Sequence 框内，方向由 5 端到 3 端。点击 START-Draw Structures；得到折叠后的结果。ENERGY 表示的是该结构的自由能，能值越低，表示该结构越稳定，一般认为最低或者次低的能值最接近真实的结构。

1.5 构建二级结构图 使用 Rnaviz2.0^[5,6] 程序可以打开二级结构图像文件，生成二级结构图像。

2 结果与讨论

在 16S rRNA 全序列构建的系统进化树上 (图 1)^[4]，*Jiangella gansuensis* YIM002^T (AY631071) 与 *Actinopolymorpha singaporensis* IM7744^T (AF237815) 划在一个组，其他相关属还有 *Kribbella*，*Aeromicrobium*，*Nocardioide* 属。

这几个属的 16S rRNA 二级结构 9 个可变区 (V1-V9) 的比较结果如下：

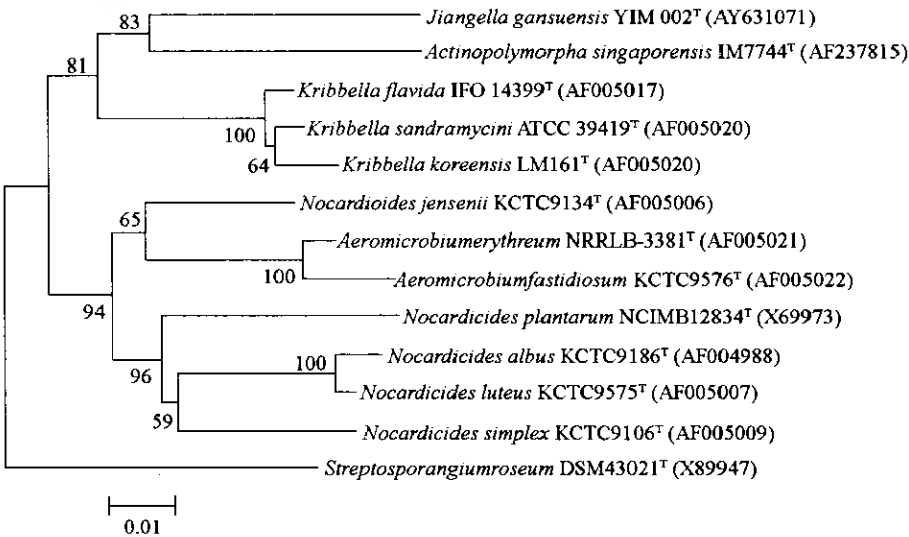


图 1 *Jiangella* YIM 002^T 与相关菌的系统发育树

2.1 V1 区 虽然 V1 区被认为是可变区, 但是它的二级结构的保守性仍然较高。图 1 表明, 这五个属的 V1 区二级结构有两种类型, *Jiangelle* 比 *Actinopolymorpha* 在其环的近顶端多出一对 U-G 碱基对, 这两个属分属两个类型, *Kribbella*, *Aeromicrobium* 和 *Nocardioides* 属的成员则同时具备两种类型。

2.2 V2 区 此区包含 Helix 9、10、11 三个茎^[7], 序列长达 70 多个碱基, 总体变化在 9 个可变中是最显著的。

如图 2 所示, *Jiangelle* 与 *Actinopolymorpha* 差别很明显。*Actinopolymorpha* 多出 (1) (2) 两个 GU 环, *Jiangelle* 则缺少这两个环, 却在“3”处保留 1 个未配对的 U; 在“4”的位置上, *Jiangelle* 有 4 个碱基对, 而 *Actinopolymorpha* 则成环。

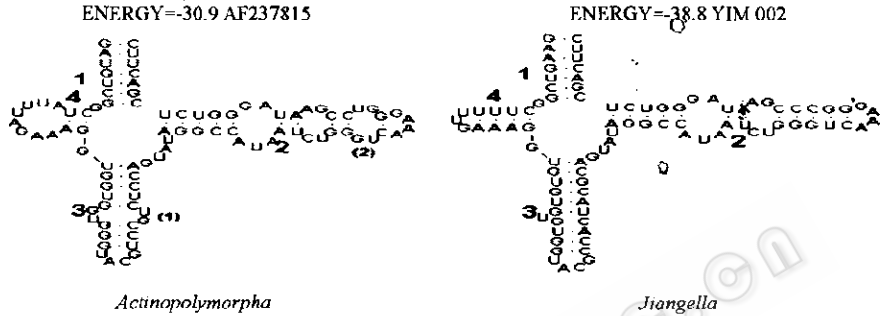


图 2 YIM 002 和几个相关属的 V2 区的二级结构图

2.3 V3 区 V3 区的二级结构有 3 种类型 (图 3), *Jiangelle* 单独属于一种类型, 其它 4 个属分属两种类型, 它们的差别明显。*Jiangelle* 的“头部”比 *Actinopolymorpha* 多了一个碱基对; 除此之外, 顶环内的碱基及茎的碱基对也各不相同。

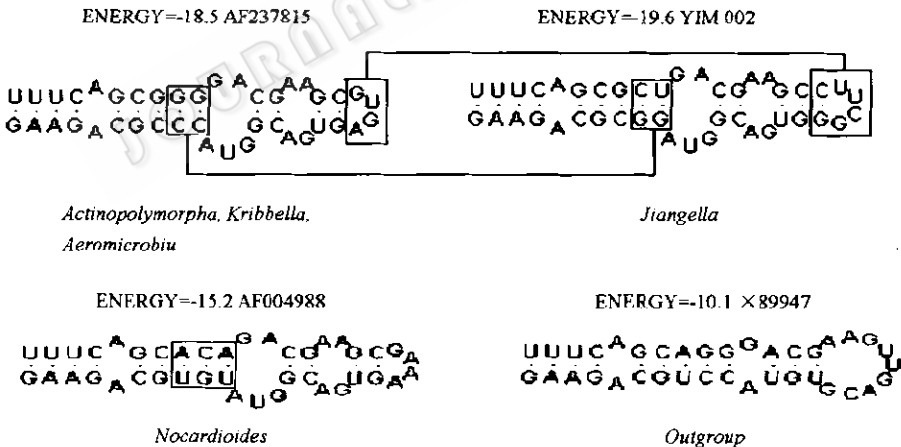


图 3 YIM 002 和几个相关属的 V3 区的二级结构图

2.4 V5 区 该区有 3 个分支, 茎 1 和 3 比较保守, 茎 2 往往具有典型的 GU 环, 特征明显, 容易区分。*Jiangelle* 含有两个 CU 环, 在相关序列中, 只有 *Aeromicrobium* 也含有两个 GU 环, 但具体位置和细节上有所差别 (图 4), *Jiangelle* 中靠近顶端的那个 GU 环距离顶环只有 2 个碱基对, 而后者有 3 个碱基对, 且 G 和 U 在“两条链”的相对位置也恰恰相反。这样看来, 唯独 *Jiangelle* 结构最为特殊, 它和其它相关种属有着明显的差别。

2.5 V6 区 该可变区和 V5 区有些相似, 大多含有 3 个茎。V6 区的 3 个茎当中, 只有

ENERGY=-31. YIM002 ENERGY=-32.3 AF237815 ENERGY=-33.1 AF005021 ENERGY=-36. X89947

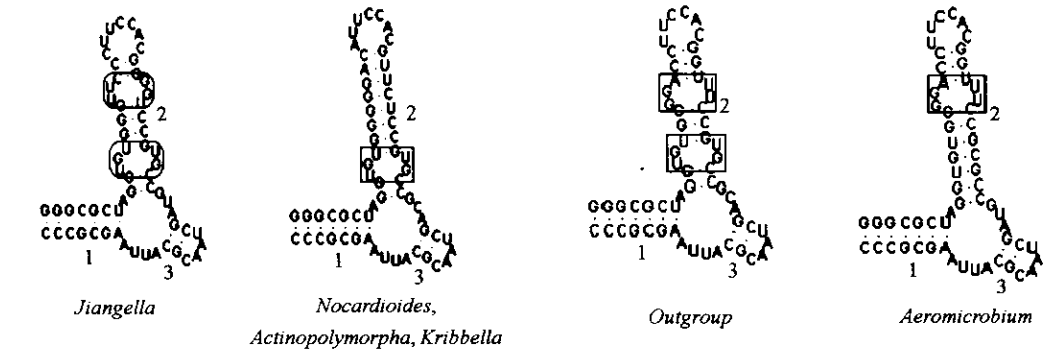


图 4 YIM 002 和几个相关属的 V5 区的二级结构图

Jiangelle 中的茎“3”含有 3 个碱基对，其它种属为 2 个碱基对，或者不形成茎；茎 2 的碱基组成也不同（图 5）。

ENERGY=-15.5 AF237815 ENERGY=-16. YIM002 ENERGY=-14.3 AF005021 ENERGY=-16.3 AF005007

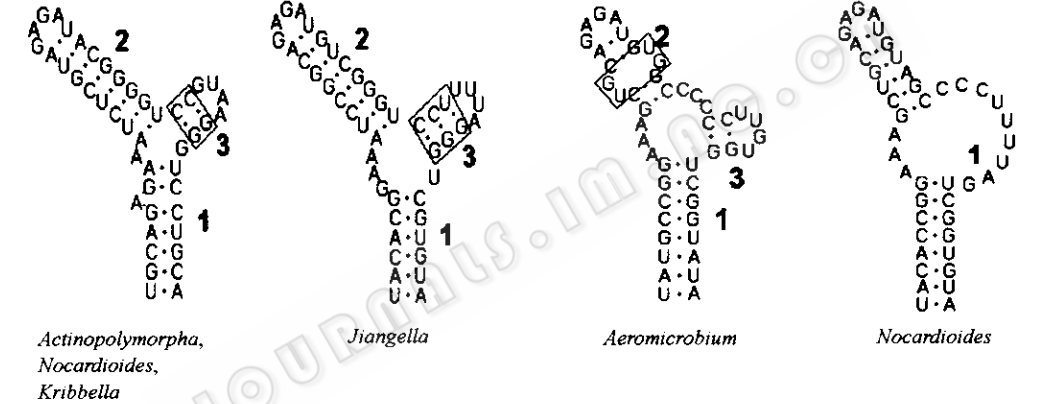


图 5 YIM 002 和几个相关属的 V6 区的二级结构图

2.6 讨论 16S rRNA 的二级结构存在单链，端环，双链螺旋（茎），内环，非配对碱基，突环结构等多种图形差异。虽然一级结构的变化（碱基差异）是分子系统学的基础，但二级结构的变化（图形差异）也具有一定的分子鉴定意义。经过以上分析，发现 *Jiangelle* 的二级结构与其它相近属有着明显的差别，主要表现在 9 个可变区二级结构中茎的长度、环的数目和类型、茎的碱基对、以及环内部碱基的不同。尤其在 V5 和 V6 两个区，这种差别尤为明显。根据这些特征差异，可以将 *Jiangelle* 和其它种属彼此区分开，为姜氏菌属的建立提供了又一个有意义的分子指征。我们认为，16S rRNA 可变区二级结构分析（图形差异），可作为分类的辅助分析方法应用于属以上原核生物分类的验证。

参考文献

[1] Wisotzkey J D, Jurtshuk P Jr, Fox G E, et al. Int J Syst Bacteriol, 1992, 42: 263 ~ 269.
[2] Chen C, Zhao S, Ben K. FEMS Microbiol Lett, 2003, 221 (2): 293 ~ 298.
[3] Guo C L, Wang T, Peng Q, et al. J Microbiol, 2003, 41 (2): 152 ~ 156.
[4] Song L, Li W J, Wang Q L, et al. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55: 881 ~ 884.
[5] Peter D R, Rupert D W. RnaViz, Nucl Acids Res, 1997, 25: 4679 ~ 4684.
[6] Peter D R, Jan W, Rupert D W. Bioinformatics, 2003, 19: 299 ~ 300.
[7] Neefs J M, Van de Peer Y, De Rijk P, et al. Nucleic Acids Res, 1993, 21 (13): 3025 ~ 3049.