

拟诺卡氏菌 16S rRNA, *gyrB*, *sod* 和 *rpoB* 基因的系统发育分析

杨玲玲 职晓阳 李文均*

(云南大学 微生物研究所 昆明 650091)

摘 要: 为了更好地了解拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)各物种间的系统发育关系,该属现有有效描述种的 *gyrB*, *sod* 和 *rpoB* 基因的部分序列被测定,结合 16S rRNA 基因,对拟诺卡氏菌属进行了系统发育重建。研究发现拟诺卡氏菌属 *gyrB*, *sod* 和 *rpoB* 基因的平均相似性分别为 87.7%、87.3% 和 94.1%,而 16S rRNA 基因的平均相似性则达到 96.65%。3 个看家基因均比 16S rRNA 具有更高的分歧度。比较基于不同基因的系统树发现,由 *gyrB* 基因得到的系统树拓扑结构与 16S rRNA 得到的结构在亚群上基本一致。因此, *gyrB* 基因在拟诺卡氏菌属的系统分类上比 16S rRNA 基因更具优越性。

关键词: 拟诺卡氏菌属;系统发育分析;16S rRNA 基因;看家基因

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2007)06-0951-05

拟诺卡氏菌属(*Nocardiopsis*)是一类广泛分布的高 G+C 含量革兰氏阳性好氧菌,最早由 Meyer^[1]有效描述,目前该属共有 24 个有效发表种^[2]。拟诺卡氏菌在各种环境中广泛分布^[3],尤其在中度和高度盐环境中表现出了优势菌群的特征^[4]。在现有的拟诺卡氏菌 24 个有效描述种之间,16S rRNA 基因相似性较高,一半以上有效种的新种地位必须借助于 DNA-DNA 杂交的结果。因此,16S rRNA 基因的高度保守性在该属的系统分类中成为了比较突出的缺点。80 年代以来,在原核生物的系统发育分析及分类地位的确定中,16S rRNA 基因作为一种理想的研究材料而被广泛应用。广泛分布、即保守又可变等特性使其成为系统分类学研究的“明星”分子。然而随着研究的深入,16S rRNA 基因也表现出了不容忽视的缺点:高保守性使其不能很好的区分属内不同的物种;在基因组内的多拷贝性使确定其序列的准确性降低。

为弥补 16S rRNA 基因的缺点,人们开始尝试使用其他不同的看家基因(*gyrB*、*recA*、*hsp65*、*parE* 基因等)进行原核生物的系统发育分析。蛋白质编码基因的分子进化,主要受到维持氨基酸序列的保守性的限制,而由于遗传密码子在第三位核苷酸上所具有的简并性使得 DNA 序列可以发生较多替换而不改变其氨基酸序列^[5]。因此,在属以下分类单元的系统发育分析和分类中,编码蛋白质基因被认为

是一种比 16S rRNA 基因更好的分子靶标。

本研究选用了 3 种常用于系统发育分析的看家基因: *gyrB* 基因,编码 DNA 促旋酶(DNA gyrase)的 B 亚基, DNA 促旋酶是细菌中的 II 型拓扑异构酶,在 DNA 的复制、转录、修复中都发挥重要作用^[6]; *rpoB* 基因,编码 RNA 聚合酶的 β 亚基,在转录中负责 RNA 合成^[7]; *sod* 基因,编码超氧化物歧化酶,超氧化物歧化酶可以催化超氧阴离子的歧化反应产生氧分子和过氧化氢^[8]。通过与 16S rRNA 基因分析结果的比较,对拟诺卡氏菌属各物种间的系统发育关系进行了全面地阐释。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 实验所用菌株见表 1。

1.1.2 培养基和菌的培养: GYM(葡萄糖 4g/L,酵母膏 4g/L,麦芽膏 10g/L, CaCO₃ 2g/L,琼脂糖 20g/L, pH7.4), 28℃ 下培养。2 株耐碱菌(*Nocardiopsis metallica* DSM 44494T, *Nocardiopsis alkaliphila* YIM 80379^T)调 pH 值至 9.0 培养, 10 株耐盐菌在培养基中添加 NaCl(100g/L)。

1.1.3 主要试剂和仪器: PCR 仪为 Biometra 公司产品(Tpersonal);核酸纯化试剂盒为北京百泰克生物技术有限公司产品;扩增及克隆所用试剂为 TaKaRa 公司产品;引物由上海生工生物工程技术服务有限

基金项目: 国家 973 项目(2004CB719601);国家自然科学基金(30600001);教育部新世纪优秀人才支持计划;云南省中青年学术和技术带头人后备人才基金;云南省自然科学基金(2004 C0002Q)

* 通讯作者。Tel: 86-871-6231202; Fax: 86-871-5173878; E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liaict@hotmail.com

作者简介: 杨玲玲(1981-),女,云南大理人,硕士研究生,主要从事放线菌系统学研究。E-mail: ling.yll@hotmail.com

收稿日期: 2007-04-20; 接受日期: 2007-06-11; 修回日期: 2007-06-27

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

表 1 实验所用菌株

Table 1 Nocardioopsis strains used in this study

Nocardioopsis species	Accession numbers			
	16S rRNA	<i>gyrB</i>	<i>sod</i>	<i>rpoB</i>
<i>Nocardioopsis prasina</i> ATCC 35940 ^T	X97884	EF565425	EF565387	EF565435
<i>Nocardioopsis listeri</i> DSM 40297 ^T	X97887	EF565422	EF565404	EF565436
<i>Nocardioopsis exhalans</i> DSM 44407 ^T	AY036000	EF565417	EF565395	EF565440
<i>Nocardioopsis xinjiangensis</i> YIM 90004 ^T	AF251709	EF565433	EF565393	EF565447
<i>Nocardioopsis chromatogenes</i> YIM 90109 ^T	AY619715	EF565414	EF565394	EF565451
<i>Nocardioopsis rhodophaeos</i> YIM 90096 ^T	AY619714	EF565426	EF565407	EF565449
<i>Nocardioopsis kunsanensis</i> DSM 44524 ^T	AF195412	EF565421	EF565390	EF565443
<i>Nocardioopsis gilva</i> YIM 90087 ^T	AY619712	EF565418	EF565405	EF565448
<i>Nocardioopsis halophila</i> DSM 44494 ^T	AJ421018	EF565419	EF565398	EF565442
<i>Nocardioopsis metallicus</i> DSM 44598 ^T	AJ420769	EF565424	EF565402	EF565445
<i>Nocardioopsis aegyptia</i> DSM 44442 ^T	AJ539401	EF565411	EF565397	EF565441
<i>Nocardioopsis alba</i> DSM 43377 ^T	X97883	EF565412	EF565399	EF565437
<i>Nocardioopsis lucentensis</i> DSM 44048 ^T	X97888	EF565423	EF565388	EF565438
<i>Nocardioopsis trehalosi</i> DSM 44380 ^T	AF105972	EF565430	EF565408	EF565454
<i>Nocardioopsis synnemataformans</i> DSM 44143 ^T	Y13593	EF565429	EF565403	EF565452
<i>Nocardioopsis tropica</i> DSM 44381 ^T	AF105971	EF565431	EF565396	EF565439
<i>Nocardioopsis baichengensis</i> YIM 90130 ^T	AY619716	EF565413	EF565392	EF565446
<i>Nocardioopsis composta</i> DSM 44551 ^T	AF360734	EF565415	EF565391	EF565444
<i>Nocardioopsis umidischolae</i> DSM 44362 ^T	AY036001	EF565432	EF565400	EF565453
<i>Nocardioopsis halotolerans</i> DSM 44410 ^T	AJ290448	EF565420	EF565389	EF565455
<i>Nocardioopsis rosea</i> YIM 90094 ^T	AY619713	EF565427	EF565406	EF565456
<i>Nocardioopsis salina</i> YIM 90010 ^T	AY373031	EF565428	EF565401	EF565450
<i>Nocardioopsis dassonvillei</i> subsp. <i>dassonvillei</i> KCTC 9190 ^T	X97886	EF565416	EF565410	EF565457
<i>Nocardioopsis alhaliphila</i> YIM 80379 ^T	AY230848	EF565434	EF565409	EF565458

公司合成。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

用微波法提取培养物基因组 DNA^[9]。PCR 扩增引物及相关资料见表 2。PCR 反应总体积为 50μL，包括 2μL DNA，4μL 10pmol/μL dNTPs，0.3μL 15U/μL 的 Taq 酶，1μL 25pmol/μL 的引物，5μL 10X PCR 缓冲

液 (TaKaRa)。反应条件根据文献^[10,11,12]提供的方法设定。*gyrB*、*rpoB* 和 *sod* 基因的扩增长度分别约为 1200bp、320bp 和 450bp。PCR 产物以 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检验。扩增产物纯化后，连接到 pMD18-T (TaKaRa) 克隆载体中，得到的阳性克隆送上海生工测序。

表 2 PCR 扩增引物

Table 2 Primers used in PCR experiment

Gene	Primer	Sequence (5'→3')	Reference
<i>gyrB</i>	UP-1	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCA (T/C)GC (T/C/A/G)GG (T/C/A/G)GG (T/C/A/G)GG (T/C/A/G)AA (A/G)TT (T/C)GA	Yamamoto & Harayama (1995) ^[10]
	UP-2R	AGCAGGCTACGGATGTCCGAGCC (A/G)TC (T/C/A/G)AC (A/G)TC (T/C/A/G)GC (A/G)TT (T/C/A/G)TCAT	
<i>rpoB</i>	MF	TCGACCACTTCGGCAACCGC	Kim et al. (1999) ^[11]
	MR	TCGATCGGGCACATCGGGCC	
<i>sod</i>	Z205	AGCTTACCACAGCAAGCACCA	Zolg & Philippi-Schulz (1994) ^[12]
	Z212	TCGCTCCAGTTCACGACC (A)TTCCA	

1.3 系统发育分析

所得到的 *gyrB*、*rpoB* 和 *sod* 基因的核苷酸序列，以及从 GenBank 数据库中得到的 16S rRNA 基因核苷酸序列，分别用 CLUSTAL_X^[13] 进行比对分析，进化距离在 Mega 3.0^[14] 中计算，使用 ModelTest 3.7^[15]

进行碱基替代模型的选择，并估计相关参数；在 PAUP* (4.0b10 版本)^[16] 中进行邻位相接 (Neighbor-Joining, NJ) 树和最大简约法 (Maximum-Parsimony, MP) 树的构建；自展检验 (bootstrap) 重复抽样 1000 次，选 *Thermobifida fusca* YX (登陆号: CP000088) 作为

外类群 (包括其 16S rRNA, *gyrB*, *sod* 和 *rpoB* 基因)。

2 结果和讨论

2.1 基于 16S rRNA 的系统发育分析

拟诺卡氏菌属所有 24 株典型种的 16S rRNA 基因序列下载自 GenBank 核酸序列数据库。进行多重

序列比对后, 为避免测序结果长短不一, 对后续分析造成影响, 比对结果前端与后端的空(Gaps)做删除处理。进化距离计算过程中, 比对结果中所有空位被删除, 依据 Kimura 2-parameter 模型, 碱基替代包括转换与颠换且二者比率为 2:1。24 株典型种的 16S rRNA 基因序列两两之间的平均相似值达到

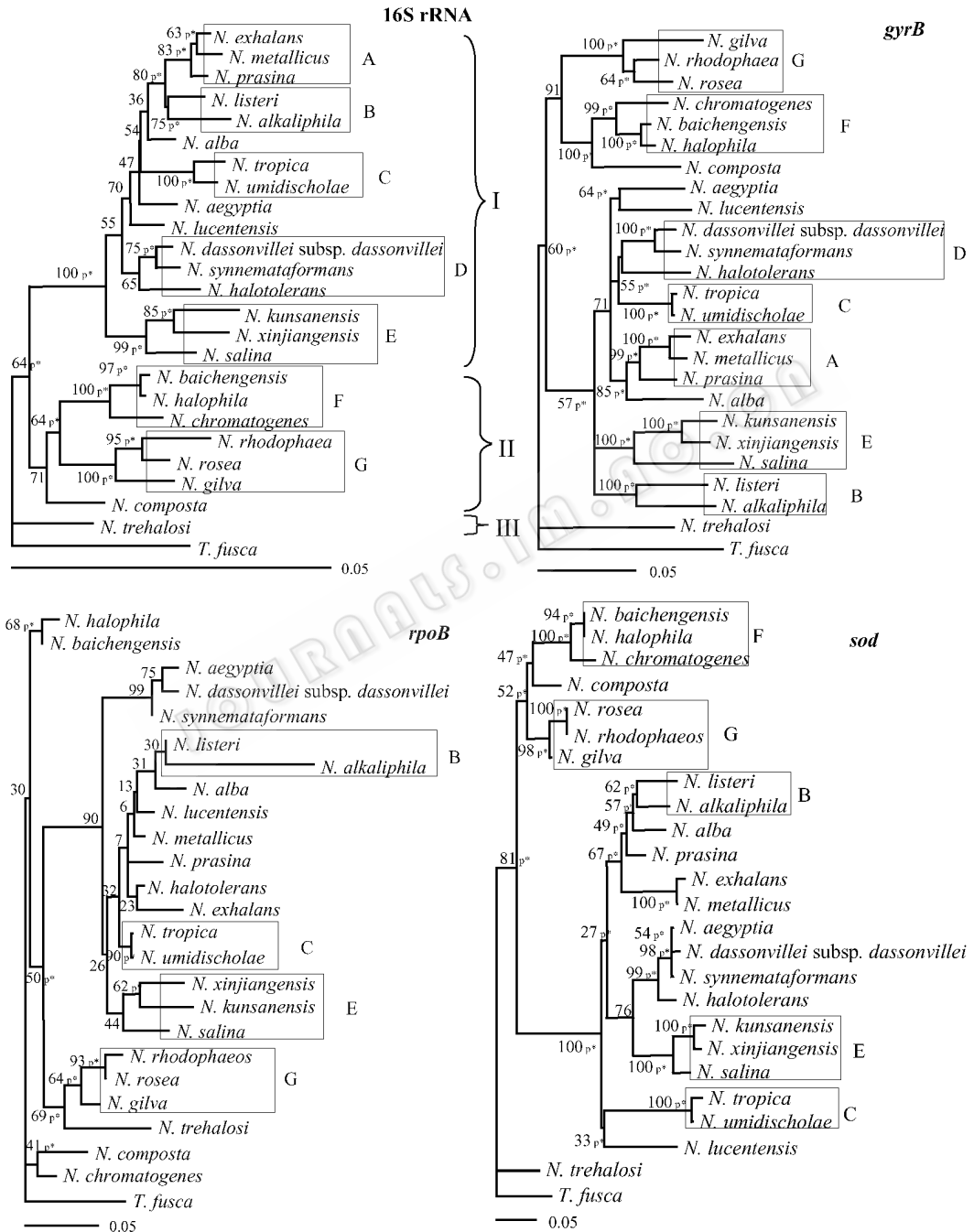


图 1 采用邻接法构建的拟诺卡氏菌属 16S rRNA, *gyrB*, *sod* 和 *rpoB* 基因系统发育树 (p* 表示在 MP 算法中得到一致分歧)

Fig. 1 Phylogenetic trees derived from 16S rRNA, *gyrB*, *sod* and *rpoB* gene sequences by neighbor-joining method. Numbers shown next to each node indicate bootstrap values. The 'p*' labels indicate branches that were also found with the parsimony algorithms.

The scale bar represents the number of substitutions per nucleotide position. *N.*, *Nocardiosis*; *T.*, *Thermobifida*.

96.65% ,有 41.3% 的相似值高于或等于 97% ,从中可以反映出 16S rRNA 基因在拟诺卡氏菌属中各物种间的进化速率比较低。ModelTest 根据等级制似然比检验对碱基替代模型选择的结果显示 ,最适于该数据集(16S rRNA 基因)的 DNA 进化模型为 TrN + I + G。根据自展值的高低即分枝的稳定性 ,从 24 株典型种中划分出了 7 个较为稳定的亚群和 3 个大类群(图 1 注 :*N. trehalosi* 为第 3 大类群)。7 个亚群在 16S rRNA 基因的 NJ 和 MP 树中都较为稳定 ,只有 D 亚群的 *N. halotolerans* 在 MP 树中被独立于 A , B , C 和 D 亚群之外。另外 ,属于 7 个亚群之外的 *N. alba* ,*N. aegyptia* 和 *N. composta* 的系统发育地位在 NJ 和 MP 树之间存在较大的出入 ,且在两类树中各自的自展值都低于 50%。*N. lucentensis* 和 *N. trehalosi* 都为独立的分枝且比较稳定。*N. trehalosi* 处于拟诺卡氏菌属较为古老的分枝。通过更换外类群 ,发现 *N. trehalosi* 的系统发育位置也会发生变化(文中未显示) ,例如用链霉菌做外类群时 ,*N. trehalosi* 会和 E , G 亚群处于同一分枝上。但如用双外类群时 *N. trehalosi* 还是处于拟诺卡氏菌属最古老的分枝上。因此 ,*N. trehalosi* 如图 1 所示的系统发育关系可能会得到更多的支持。

2.2 基于部分 *gyrB* ,*sod* 和 *rpoB* 基因的系统发育分析

所有拟诺卡氏菌相应的 *gyrB* ,*sod* 和 *rpoB* 基因被测定(登录号见表 1)。比对结果的处理以及进化距离的计算与 16S rRNA 基因相同。24 株拟诺卡氏菌部分 *gyrB* ,*sod* 和 *rpoB* 基因的平均相似值为 87.7% ,87.3% 和 94.1%。ModelTest 碱基替代模型选择的结果显示 ,适合于三个基因片段的模型分别为 F81 + I + G ,F81 + I + G 和 F81 + G。比较 16S rRNA ,*gyrB* ,*sod* 和 *rpoB* 基因的 NJ 树发现 ,3 大类群和 7 个亚群在 *gyrB* 的 NJ 树中仍然保存完整 ,且分枝的稳定性较高。但亚群之间的相互关系发生了变化 ,尤其是独立分枝的 *N. alba* ,*N. aegyptia* 和 *N. composta* 的变化较大。*N. trehalosi* 仍然处于较古老的分枝上。与 *gyrB* 相比 ,*sod* 和 *rpoB* 基因的系统进化树与 16S rRNA 表现出了较高的不一致性 ,只分别保留了 4 个亚群 ,且相应的自展值较低。序列信息的长度可能是造成这种现象的主要原因。从平均长度分别为 320bp 和 450bp 的 *rpoB* 与 *sod* 基因得到的拟诺卡氏菌属各物种间的进化关系 ,虽然不能被完全否定 ,但很明显在正确揭示其关系上 ,存在着很大漏洞。通过延长扩增产物的长度 ,得到更多的数据信息 ,或许会得到更真实的结果。基于 *gyrB* 的系

统进化树 ,虽然不同亚群间出现了变化 ,但在分枝内部 ,各物种与其最邻近种的关系较为稳定 ;并且 ,*gyrB* 基因的 NJ 树和 MP 树表现出了较高的一致性。所以 ,*gyrB* 基因可以作为一个联想的材料 ,辅助 16S rRNA 基因用于拟诺卡氏菌的系统发育地位的确定。从整个拟诺卡氏菌的系统进化关系来看 ,7 个亚群内物种关系是相对稳定的 ,3 大类群的相互关系也较为确定 ,若要确定 *N. alba* ,*N. aegyptia* 和 *N. composta* 等的系统进化地位还必须要有更大的信息量。

gyrB 类似的看家基因 ,在系统发育分析和分子进化领域里 ,发挥了其高分辨率的优势 ,更为人们提供了正确认识微生物物种进化的一个全新的角度。借助于多基因位点联合分析的方法 ,人们对此过程的认识必将更加深刻。但看家基因在微生物系统发育分析中缺点也是同时存在 ,高度的变异性直接导致了 PCR 引物通用性的减低 ,进而导致各类看家基因在不同类群中的可操作性降低。在这一点上 ,16S rRNA 基因的高度保守性恰恰成为了使其可以广泛通用的保障。

参 考 文 献

- [1] Meyer J. *Nocardiopsis* , a new genus of the order Actinomycetales. *Int J Syst Bacteriol* , 1976 , 26 : 487 - 493 .
- [2] Li WJ , Kroppenstedt RM , Wang D , et al. Five novel species of the genus *Nocardiopsis* isolated from hypersaline soils and emended description of *Nocardiopsis salina* Li et al. 2004. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2006 , 56 : 1089 - 1096 .
- [3] Kroppenstedt RM , Evtushenko LI. The family *Nocardiopsaceae*. In : Dworkin M , et al. The Prokaryotes. 3rd ed (release 3.11). New York : Springer , 2006 .
- [4] Tang SK , Li WJ , Wang D , et al. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. *Actinomycetologica* , 2003 , 17 : 6 - 10 .
- [5] Kasai H , Watanabe K , Gasteiger E , et al. Construction of the *gyrB* database for the identification and classification of bacteria. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* , 1998 , 9 : 13 - 21 .
- [6] Küpfer M , Kuhnert P , Korczak BK , et al. Genetic relationships of *Aeromonas* strains inferred from 16S rRNA , *gyrB* and *rpoB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2006 , 56 : 2743 - 2751 .
- [7] Kim BJ , Kim CJ , Chun JS , et al. Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kiastatospora* based on partial RNA polymerase β -subunit gene (*rpoB*) sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2004 , 54 : 593 - 598 .
- [8] Adékambi T , Drancourt M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA , *hsp65* , *sodA* , *recA* and *rpoB* gene sequencing. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2004 , 54 : 2095 - 2105 .
- [9] 徐 平 , 李文均 , 徐丽华 , 等 . 微波法快速提取放线菌基因

- [10] Yamamoto S, Harayama S. PCR Amplification and Direct Sequencing of *gyrB* Genes with Universal Primers and Their Application to the Detection and Taxonomic Analysis of *Pseudomonas putida* Strains. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1104 – 1109.
- [11] Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, et al. Identification of Mycobacterial Species by Comparative Sequence Analysis of the RNA Polymerase Gene(*rpoB*). *J Clin Microbiol*, 1999, **37**: 1714 – 1720.
- [12] Zolg JW, Philipp-Schulz S. The Superoxide Dismutase Gene, a Target for Detection and Identification of *Mycobacteria* by PCR. *J Clin Microbiol*, 1994, **32**: 2801 – 2812.
- [13] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**: 4876 – 4882.
- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150 – 163.
- [15] Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*, 1998, **14**: 817 – 818.
- [16] Swofford DL. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), 2002, version 4, Sunderland, MA: Sinauer Associates.

Phylogenetic analysis of *Nocardiopsis* species based on 16S rRNA, *gyrB*, *sod* and *rpoB* gene sequences

YANG Ling-ling, ZHI Xiao-yang, LI Wen-jun*

(Yunnan Institute of Microbiology, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract : In order to understand the phylogenetic relationships among *Nocardiopsis* species more rationally, the *gyrB*, *sod* and *rpoB* gene partial sequences of 24 validly published *Nocardiopsis* species were determined. The phylogenetic trees were reconstructed including 16S rRNA gene and above-mentioned three housekeeping genes. The average similarities of *gyrB*, *sod* and *rpoB* of *Nocardiopsis* species were 87.7%, 87.3% and 94.1%, respectively. Meanwhile, the average similarity of 16S rRNA gene of *Nocardiopsis* species was 96.65%. The variabilities of *gyrB*, *sod* and *rpoB* gene in *Nocardiopsis* are greater than that of 16S rRNA gene. By comparing the phylogenetic trees, the topology of *gyrB* gene tree is almost consistent with that of 16S rRNA gene tree. Consequently, the *gyrB* gene possesses the superiority in phylogenetic taxonomy of the genus *Nocardiopsis*.

Keywords : *Nocardiopsis*; Phylogenetic analysis; 16S rRNA gene; Housekeeping gene

Foundation item: Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2004CB719601); the National Natural Science Foundation of China (30600001); Yunnan Provincial Natural Science Foundation (2004 C0002Q); LI Wen-jun was also supported by the Program for New Century Excellent Talent in University (NCET)

* Corresponding author. Tel: 86-871-6231202; Fax: 86-871-5173878; E-mail: wjli@ynu.edu.cn, liact@hotmail.com

Received: 20 April 2007 / Accepted: 11 June 2007 / Revised: 27 June 2007