

社鼠和针毛鼠线粒体 DNA 序列的歧异 及其系统进化关系*

江庆澜¹, 何 森², 辛景禧², 黄荣春³, 关海山³

(1. 广州市第一人民医院中心实验室, 广东 广州 510180;

2. 中山大学生命科学学院生物系, 广东 广州 510275;

3. 香港中文大学生物系, 香港新界)

摘 要: 社鼠和针毛鼠是有着广泛地理分布的山地鼠种, 它们的一些形态特征及核型明显有别于同属的其它鼠类。社鼠的亚种——雷琼社鼠局限于分布在广东省西部地区 and 海南省, 它的形态特征多似社鼠, 但也有少数特征相似于针毛鼠。对于社鼠和针毛鼠的分类地位及社鼠亚种的分化一直有着各种讨论。本研究进行了社鼠和雷琼社鼠以及针毛鼠龙门种群和香港种群的细胞色素 b (264 个核苷酸位点) 和 12S rRNA (387 个核苷酸位点) 基因片段的测序。社鼠与雷琼社鼠线粒体的细胞色素 b 基因片段间包含有 19 个变异位点、12S rRNA 基因片段间包含 11 个变异位点和 2 个插入/缺失位点。针毛鼠的 2 个种群间的细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段分别包含了 3 个和 11 个变异位点。通过邻接法和最大简约法重建的系统进化关系表明: 雷琼社鼠与社鼠有着紧密的亲缘关系, 它的亚种地位得到了线粒体 DNA 序列证据的肯定。针毛鼠龙门种群和香港种群细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段序列的歧异反映出两个种群由于长期的地理隔离及其所经历自然选择的结果。

关键词: 社鼠; 针毛鼠; 线粒体 DNA; 序列; 歧异; 系统进化关系

中图分类号: Q75 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 04-0084-04

社鼠 *Rattus confucianus* 和针毛鼠 *R. fulvescens* 是有着广泛地理分布的山地鼠种, 这两个种间的主要区别特征在于其尾长与体长的比例以及耳长的差异。雷琼社鼠 *R. c. lotipes* 仅分布于广东省的西部地区和海南省, 该亚种的大多数形态特征与社鼠一致, 但也有少数的特征相似于针毛鼠。对于社鼠和针毛鼠的分类地位以及社鼠的亚种分化一直是存在不同的观点和讨论^[1,2]。我们曾对针毛鼠和社鼠(雷琼社鼠)进行核型分析, 它们的二倍体数均为 46, 有别于鼠属的其它种 ($2n = 42$), 社鼠与雷琼社鼠的核型相同^[3]。动物核型并没有一定的进化速度, 而线粒体基因则具有进化的稳定性。因此, 目前更多地是应用线粒体 DNA 序列的分析数据进行动物的系统进化关系研究^[4], 这种分析方法对比于形态学或核型分析更能有效地直接研究动物进化关系及其过程^[5]。

1 材料与方法

1.1 标本的采集

实验所用的针毛鼠分别来自于广东省龙门县和香港, 社鼠来自龙门县, 雷琼社鼠来自广东省高州

市, 作为对照的外群褐家鼠采自广州市。以上 5 组鼠类各有 3 个个体被用作线粒体细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段 DNA 序列的测定和分析。

1.2 总 DNA 提取

使用试剂盒 QIAamp Tissue Kit (QIAGEN) 从 25 mg 肌肉组织中提取总 DNA, 将各 DNA 样本放置于 -20°C 低温冰箱贮存。

1.3 引物设计

根据大鼠线粒体 DNA 序列^[6]设计引物对 HCB/LCB 和 HRN/LRN, 分别对具有进化稳定性的细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段进行聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 的扩增和 DNA 序列的测定。其中引物 HCB (5'-AAACTGCAGCCCCTCA GAATGATATTTGTCTCA-3') 和 LCB (5'-AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA-3') 用于扩增细胞色素 b 片段, HRN (5'-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGTGT-3') 和 LRN (5'-AAAAAGCTTCAAACCTGGATTAGATACCCCACTAT - 3') 则应用于扩增 12S rRNA 片段。

1.4 聚合酶链式反应

每 100 μL 的 PCR 混合液中含有 1 ~ 10 ng 总

* 收稿日期: 2004 - 07 - 19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270752)

作者简介: 江庆澜 (1957 年生), 女, 博士; E-mail: qinglanj@ hotmail.com

DNA、8 μ L dNTP 混合液 (10 mol/L)、10 μ L 10X PCR 缓冲液、2.5 μ L Tfl DNA 聚合酶 (5 000 U/mL) 和 6 μ L MgCl₂ (25 mol/L)。聚合酶链式反应是在 PCR 仪 PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research Inc.) 进行, 每个循环的条件是: 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s、50 $^{\circ}$ C 退火 15 s 及 72 $^{\circ}$ C 延伸 120 s, 共进行 30 次循环。

1.5 PCR 产物的纯化

以离心柱管 Centricon - 100 units 对 PCR 产物进行纯化: 加入 2 mL 蒸馏水和 100 μ L PCR 产物混合物到离心柱管内, 以 5 800 r/min 离心 10 min, 重复 1 次, 然后将离心柱管倒置, 以 1 500 r/min 离心 2 min, 收集已纯化的 PCR 产物, 并将纯化的 PCR 产物贮存于 -20 $^{\circ}$ C。

1.6 线粒体 DNA 序列测定

应用试剂盒 ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PERKIN ELMER) 在 PCR 仪 Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER) 进行序列反应。以离心柱管 CENTRI - SEP 纯化序列反应产物, 纯化后的序列反应产物在测序仪 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PERKIN ELMER) 进行自动测序。

1.7 线粒体 DNA 序列分析和系统进化树的构建

每个线粒体 DNA 样品均分别进行轻、重链的测序和核对。应用软件 ABI SeqEd™ version 1.0.3^[7]

编辑细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段的序列, 采用软件 Clustal w 1.6^[8] 进行序列的多重对比, 运用软件 Mega 2^[9] 进行线粒体 DNA 序列间的可变核苷酸位点的统计, 根据 Kimura 双参数模型, 同时考虑碱基的转换和颠换, 确定遗传距离, 并以邻接法 (Neighbor-joining, NJ) 和最大简约法 (Maximum parsimony, PM) 构建系统进化树, 自举置信水平 (Bootstrap confidence level, BCL) 应用自引导检验估计, 共 1 000 次循环。

2 结 果

2.1 细胞色素 b 和 12S rRNA 基因序列的歧异

根据所检测和分析的细胞色素 b (264 个核苷酸位点长度) 和 12S rRNA (387 个核苷酸位点长度) 基因片段序列, 2 个基因片段的核苷酸转换率均高于颠换率, 核苷酸的转换多发生在密码子的第 3 个碱基位点。社鼠与雷琼社鼠间分别有 19 和 11 个核苷酸变异位点, 其中在 12S rRNA 片段中有 2 个插入/缺失的位点。比较针毛鼠龙门种群与香港种群细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段的序列, 分别包含有 3 和 11 个核苷酸变异位点。细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段测序结果显示, 在社鼠或针毛鼠种内, 各基因的核苷酸组成比例相近 (表 1), 种间的核苷酸取代率高于种内 (表 2)。

表 1 细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段的核苷酸比例
Tab.1 Nucleotide frequencies of cytochrome b and 12S rRNA gene fragment %

样 品	细胞色素 b				12S rRNA			
	T	C	A	G	T	C	A	G
社鼠	29.5	26.1	29.5	14.8	24.7	21.1	37.5	16.7
雷琼社鼠	28.0	27.7	29.2	15.2	24.3	20.7	38.0	17.0
针毛鼠 (香港种群)	33.3	22.3	30.3	14.0	25.1	19.9	38.5	16.5
针毛鼠 (龙门种群)	32.6	23.1	30.3	14.0	24.3	20.2	38.7	16.8

2.2 重建系统发生树

应用 Kimura 双参数模型计算遗传距离 (表 3 和表 4), 并构建 NJ 和 MP 系统发生树 (图 1)。根据细胞色素 b 片段序列数据所建立起的 NJ 和 MP 系统发生树, 社鼠和针毛鼠各自形成 2 个不同的初级分支, 其中, 社鼠及其亚种雷琼社鼠分别构成 2 个次级分支, 自举置信水平分别为 72% 和 82%, 针毛鼠的两个种群也各自成为不同的次级分支, 其自举置信水平均为 100%。依据 12S rRNA 基因片段序列数据构建的 NJ 和 MP 树, 社鼠成为初级的分支, 雷琼社鼠和针毛鼠从社鼠中分化为 2 个不同的次级分支, 自举置信水平分别为 99% 和 100%。针

毛鼠的 2 个种群各自成为不同系统发生树的 2 个顶级分支, 自举置信水平分别为 82% 和 96%。

表 2 各组鼠类间细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段的取代率¹⁾

Tab.2 Ratio of substitution in Cyt b and 12S rRNA gene fragments between the different groups %

样 品	1	2	3	4
1 社鼠		2.8	3.9	3.6
2 雷琼社鼠	7.2		3.6	3.9
3 针毛鼠 (香港种群)	11.7	12.8		2.8
4 针毛鼠 (龙门种群)	11.3	12.5	1.1	

1) 下三角数据为细胞色素 b 基因片段的取代率, 上三角数据为 12S rRNA 基因片段的取代率

表 3 基于细胞色素 b 序列的 Kimura 双参数距离和标准误¹⁾

Tab.3 Kimura-2parameter distance and standard error based on cytochrome b sequences

样 品	1	2	3	4
1 社鼠		0.017	0.024	0.024
2 雷琼社鼠	0.076		0.026	0.025
3 针毛鼠(香港种群)	0.130	0.145		0.006
4 针毛鼠(龙门种群)	0.125	0.141	0.011	

1) 下三角数据为遗传距离, 上三角数据为标准误

表 4 基于 12S rRNA 序列的 Kimura 双参数距离和标准误¹⁾

Tab.4 Kimura-2parameter distance and standard error based on 12S rRNA sequences

样 品	1	2	3	4
1. 社鼠		0.009	0.010	0.010
2. 雷琼社鼠	0.030		0.010	0.010
3. 针毛鼠(香港种群)	0.040	0.038		0.008
4. 针毛鼠(龙门种群)	0.038	0.040	0.029	

1) 下三角数据为遗传距离, 上三角数据为标准误

3 讨 论

动物系统进化关系是依据现存种类及其祖先的形态学特征及其基因组信息进行推论的结果^[9]。动物由于其分布区域的改变可使基因漂移, 而分布区的地理隔离使同种动物经历不同的自然选择。在不同环境中, 由于自然选择作用及其基因(尤其是核基因)中突变核苷酸位点的差异, 可使同种动物在形态学特征上发生程度不同的改变。

线粒体各基因均具有相对稳定的进化速率, 因而, 线粒体 DNA 的编码序列被广泛应用于哺乳类动物的各级分类等级的系统进化关系的研究, 线粒体系统进化学使动物系统发生历史的研究以及解决它们间系统进化关系的疑难问题有所突破^[4]。

在本项研究中, 2 种鼠类的细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段的核苷酸转换率均高于颠换率, 而且, 核苷酸的转换多发生在密码子的第 3 个碱基位点, 这种转换的结果使动物可以经受更小的自然选择压力, 从而能够维持线粒体 DNA 的正常功能, 使突变的核苷酸位点能够保存下来, 这是线粒体 DNA 颠换的积累较转换更慢的根本原因。

在社鼠及其亚种雷琼社鼠间, 线粒体细胞色素 b 基因的进化方式是核苷酸取代, 而它们的 12S rRNA 基因则以核苷酸取代和插入/缺失的方式进化。针毛鼠种群间细胞色素 b 和 12S rRNA 基因的进化方式均为核苷酸取代。基于细胞色素 b 和 12S

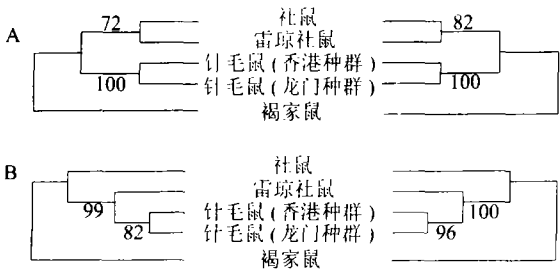


图 1 Kimura 双参数距离重建的系统发生和自举置信水平
Fig.1 Phylogenetic reconstruction by Kimura's 2-parameter distance and bootstrap confidence level

A: 基于细胞色 b 数据的 NJ 树 (左) 和 MP 树 (右);
B: 基于 12S rRNA 数据的 NJ 树 (左) 和 MP 树 (右);
横线上下的数据均为自举置信水平数值

rRNA 基因片段序列所得到的 Kimura 双参数遗传距离数据及其重建的系统进化树表明, 雷琼社鼠与社鼠有着更近的亲缘关系, 在分子生物学的水平上认证了形态学上对于雷琼社鼠大多数特征相似于社鼠、少数特征相似于针毛鼠的讨论及其分类地位。与此同时, 针毛鼠细胞色素 b 和 12S rRNA 基因片段序列的数据也证明了香港种群和龙门种群由于地理隔离所致的歧异, 这两个种群在重建的 NJ 和 MP 系统进化树中成为不同的分支, 并分别为极高的自举置信水平所支持。

致谢: 衷心感谢香港中文大学莫乘风和杨汉斌先生对本项研究给予大力协助, 衷心感谢湛江鼠疫防治所莫冠英先生和广东省昆虫研究所黄李标先生提供大量鼠类标本

参考文献:

[1] WANG T Z, Xu W X. Glire (Rodentia and Lagomorpha) fauna of Shanxi province [M]. Xi'an: Shanxi Normal University Press, 1992: 184-187.
[2] HUANG W J, CHEN Y X, WEN Y X. Rodents in China [M]. Shanghai: Fudan University Press, 1995: 60-137.
[3] JIANG Q L. Study on chromosomal classification of *Rattus confucianus*, *R. confucianus lotipes* and *R. fulvescens* [J]. Supplement to the Journal of Sun Yatsen University, 1995, 1: 98-103.
[4] ARNASON U, ADDEGOKE J A, BODIN K, et al. Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 2002, 99: 8151-8156.
[5] HILLIS M, MORITZ C, MABLE B K. Molecular systematics [M]. Massachuset: Sinauer Associates, 1996.
[6] GADALETA G G, PEPE G D, CANDIA C, et al. The complete nucleotide sequence of the *Rattus norvegicus* mitochondrial genome: cryptic signals revealed by comparative analysis between vertebrates [J]. Journal of Molecular Evolution,

- 1989, 28: 497 – 516.
- [7] APPLIED BIOSYSTEMS INC. ABI SeqEd™ package, version 1.0.3.1992.
- [8] THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. Clustal w version 1.6. European Molecular Biology Laboratory, 1996.
- [9] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA 2: Molecular evolutionary genetics analysis software, 2001.

Divergence of Mitochondrial DNA Sequence and Phylogenetic Relationships of *Rattus confucianus* and *Rattus fulvescens*

JIANG Qing-lan¹, HE Miao², XIN Jing-xi², OOI E. C. Vincent³, KWAN Hoi-shan³

(1. Core Lab, The First Municipal People's Hospital of Guangzhou, Guangzhou 510180, China;

2. Department of Biology, School of Life Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China;

3. Department of Biology, The Chinese University of Hong Kong, NT, Hong Kong, China)

Abstract: *R. confucianus* and *R. fulvescens* are the mountain murines with widely geographic distribution. *R. c. lotipes* is restrictedly distributed in the west region of Guangdong province and Hainan province. The karyotypic and some of their morphological characteristics differ from the other species in genus *Rattus*. The most of morphological characteristics of subspecies *R. c. lotipes* are identical to *R. confucianus*, but few features are similar to *R. fulvescens*. The various opinions have been in the discussions for the classification positions of *R. fulvescens* and *R. confucianus*, and the subspecies differentiation of *R. confucianus*. In this study, the sequences of mitochondrial cytochrome b (Cyt b) and 12S rRNA gene fragments were detected. The Cyt b and 12S rRNA gene fragments between *R. confucianus* and its subspecies *R. c. lotipes* separately include 19 variable sites and 11 variable sites. 2 sites of insertion/deletion in the 12S rRNA fragment are observed. The Cyt b and 12S rRNA fragments between two populations of *R. fulvescens* separately include 3 variable sites and 11 variable sites. This analysis shows that *R. c. lotipes* is closer to *R. c. confucianus* than to *R. fulvescens*. The position of this subspecies is confirmed by the data of mtDNA. The sequences divergences in Cyt b and 12S rRNA gene between Longmen and Hong Kong populations of *R. fulvescens* reflect the natural selection for their history of geographic isolation.

Key words: *R. confucianus*; *R. fulvescens*; mitochondrial DNA; sequence; divergence; phylogenetic relationship