

云南猕猴 mtDNA 控制区全序列测定

禹文海¹, 黄芬², 杨凤梅¹, 鲁帅尧¹, 赵远¹, 沈冬¹,
王俊斌¹, 陈丽雄¹, 和占龙¹

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 医学生物学研究所, 云南 昆明 650118;
2. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224)

【摘要】 目的 测定云南猕猴线粒体 DNA 控制区全序列, 对其进行鉴定及进化分析。方法 利用 PCR 技术扩增猕猴线粒体 DNA 控制区全序列, 结合 GenBank 中下载的猕猴参考序列 (AY612638), 采用多个生物学软件对序列碱基组成、同源性、转换/颠换比等遗传信息进行分析, 并基于邻接法 (NJ) 和最小进化法 (ME) 构建系统进化树。结果 云南猕猴线粒体 DNA 控制区全长为 (1 084 ~ 1 089) bp, A、T、G 和 C 四种碱基平均含量分别为 29.9%、26.9%、12.3% 和 30.9%, A + T 含量 (56.8%) 高于 G + C 含量 (43.2%)。所分析序列间的同源性为 91.5% ~ 99.5%, 平均核苷酸变异率为 4.5%, 变异类型包括转换、颠换、插入和缺失 4 种形式, 转换/颠换比值平均为 26.1。进化树显示云南猕猴存在两个平行进化的姐妹分支。结论 本研究获得了云南猕猴 mtDNA 控制区全序列, 为猕猴进化关系研究及 mtDNA 控制区功能研究奠定基础。

【关键词】 猕猴; 线粒体 DNA; 控制区; 全序列

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)12-0042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.12.011

Determination of the Complete Sequence of mtDNA Control Region in *Macaca mulatta* from Yunnan Province

YU Wen-hai¹, HUANG Fen², YANG Feng-mei¹, LU Shuai-yao¹, ZHAO Yuan¹, SHEN Dong¹,
WANG Jun-bin¹, CHEN Li-xiong¹, HE Zhan-long¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union
Medical College, Kunming 650118, China;

2. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650224, China)

【Abstract】 Objective To determine the complete sequences of the mitochondrial DNA control region in *Macaca mulatta* from Yunnan province. The complete sequences were analyzed for phylogenetic tree and nucleotide composition. **Methods** The complete sequences was amplified by polymerase chain reaction (PCR). The nucleotide composition was analyzed by comparison with the known control region sequence (AY612638) downloaded from GenBank database. The homology, the rate of transition/transversion and phylogenetic tree constructed by neighbor-joining (NJ) and minimum-evolution (ME) methods were also analyzed. **Results** The length of the mitochondrial DNA control region complete sequences were 1084 to 1089 bp, the average contents of A, T, G and C were 29.9%, 26.9%, 12.3% and 30.9%,

[基金项目] 云南省应用基础研究面上项目 (2008ZC069M 2009ZC184M); 云南省技术创新人才培养基金 (2009CI117)。

[作者简介] 禹文海 (1981 -), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 实验动物学, E-mail: wenhaiyu1234@163.com。

[通讯作者] 和占龙 (1972 -), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 灵长类实验动物学及人类疾病动物模型研究, E-mail: hzl@imbcams.com.cn。

respectively. The content of A + T (56.8%) was higher than G + C (43.2%) in the complete sequence. The homology of these sequences was 91.5% ~ 99.5%. The nucleotide mutational rate was 4.5% on average, including transition, transversion, insertion and loss. The rate of transition/transversion was 26.1 on average. The phylogenetic analysis based on mitochondrial DNA control region showed that the *Macaca mulatta* of Yunan was divided into two sister groups geographically. **Conclusions** The complete sequences of the mitochondrial DNA control region of *Macaca mulatta* has been determined. This study may be of importance for studies on evolution and function of the mitochondrial DNA control region of *Macaca mulatta*.

【Key words】 *Macaca mulatta*; mtDNA; Control region; Complete sequence

线粒体 DNA (mtDNA) 是细胞核外遗传物质,呈共价闭合的环状双链结构,能够独立地进行复制和转录,其具有母系方式遗传、碱基变异大、进化速度快等特点。其中,线粒体 DNA 控制区的进化速度是线粒体 DNA 其它区域的 3~5 倍,在生物遗传进化和种群遗传变异程度的研究中应用广泛^[1-5]。猕猴又称恒河猴、广西猴、黄猴,为灵长目猴科猕猴属的一个种。云南位于中国的西南方,猕猴资源十分丰富,在北部、西北部、中部、南部和东北部等均有分布^[6]。本研究以云南猕猴作为研究对象,测定线粒体控制区全序列,为猕猴的进化分析及开展猕猴遗传资源保护和合理开发利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

实验采集猕猴全血共 7 份(镇康县 1 份、景东县 1 份、镇沅县 1 份、保山市 1 份、邓川县 1 份、牟定县 1 份、宁蒗县 1 份),来源于中国医学科学院医学生物学研究所全国医学灵长类研究中心实验动物部,实验动物生产许可证:(滇)SCXK2010—0006。静脉抽取全血 2 mL EDTA 抗凝。采用 Axygen DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,详细操作步骤见说明书。

1.2 PCR 扩增与目的片段测定

参考相关文献选取引物对^[7,8],上游引物 F(5'-CCTTACCTGAATTGGAAGCGAACC-3')和下游引物 R(5'-GGCCAGGACCAAGCCTATTT-3'),由生工生物工程(上海)有限公司合成。在 PCR 仪(Bio-Rad C1000)中进行 PCR 扩增。反应体积为 25 μ L,引物 F 和 R 各(20 μ mol/L) 0.5 μ L,模板 DNA 2 μ L, 2 \times PCR Master Mix 12.5 μ L,双蒸 H₂O 9.5 μ L。反应条件为 95 $^{\circ}$ C 6 min,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min,66 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,参照 DNA marker DL2000 出现 1 450 bp 左右条带的 PCR 产物进行纯

化测序,测序由上海杰李生物技术有限公司完成。

1.3 序列分析及系统进化树构建

每个个体测得的正反链序列用 DNASTar 软件进行分析拼接,用 Clustalx1.8 软件进行序列比对并辅以人工校对,用 DNASTar 软件对序列间同源性进行分析,用 MEGA4.0 软件分析序列的碱基组成、转换和颠换。以来源于美国威斯康星州国家灵长类动物研究中心(WRPRC)的猕猴(GenBank No. AY612638)为外群,分别用邻接法(neighbor-joining, NJ)和最小进化法(minimum-evolution, ME)构建分子系统进化树。

2 结果

2.1 序列测定与鉴定

经 PCR 扩增后得到产物大小约为 1 450 bp,去除线粒体 DNA 控制区两侧的序列后,测得云南猕猴线粒体控制区全序列的长度为 1 084 ~ 1 089 bp,利用 BLAST 和 GenBank 中的猕猴线粒体序列进行比较,同源性达到 91.5% 以上,说明该序列为猕猴 mtDNA 控制区。本研究测得的云南猕猴线粒体 DNA 控制区全序列已提交 GenBank 数据库, GenBank No. 为 JF746819(保山)、JF746820(邓川)、JF746824(景东)、牟定(JF834919)、JF746839(宁蒗)、JF746823(镇康)和 JF746817(镇沅)。

2.2 序列碱基组成、遗传变异及同源性分析

线粒体控制区核苷酸序列碱基组成见表 1,不同地区猕猴线粒体 DNA 控制区 G + C 的含量(42.9% ~ 43.8%)低于 A + T 的含量(56.2% ~ 57.1%),A 碱基含量为 29.6% ~ 30.2%,C 碱基含量为 30.4% ~ 31.4%,T 碱基含量为 26.5% ~ 27.4%,G 碱基含量为 12.2% ~ 12.5%。序列遗传变异包括转换、颠换、插入和缺失 4 种形式,经 MEGA4.0 软件分析可知序列中的转换明显比颠换多,其中 T-C 转换多于 A-G, A-C 和 A-T 颠换多于 C-G 和 T-G,转换/颠换比值平均为 26.1。

表 1 不同地区猕猴线粒体 DNA 控制区核苷酸碱基组成比较

Tab. 1 Comparison of nucleotides composition in the mtDNA control region of *Macaca mulatta* from different areas

来源 Sources	碱基数及其含量(%) The base number and its content					总长(bp) Total length
	A	C	G	T	G + C	
保山 Baoshan	328(30. 2%)	335(30. 8%)	133(12. 2%)	291(26. 8%)	43. 0%	1087
邓川 Dengchuan	325(29. 9%)	338(31. 1%)	135(12. 4%)	290(26. 7%)	43. 5%	1088
景东 Jingdong	324(29. 8%)	331(30. 4%)	136(12. 5%)	298(27. 4%)	42. 9%	1089
牟定 Mouding	324(29. 9%)	335(30. 9%)	134(12. 4%)	291(26. 8%)	43. 3%	1084
宁蒗 Ninglang	324(29. 8%)	334(30. 7%)	135(12. 4%)	294(27. 0%)	43. 1%	1087
镇康 Zhenkang	326(30. 0%)	339(31. 2%)	133(12. 2%)	289(26. 6%)	43. 4%	1087
镇沅 Zhenyuan	324(29. 8%)	333(30. 6%)	135(12. 4%)	296(27. 2%)	43. 0%	1088
AY612638(USA)	321(29. 6%)	341(31. 4%)	135(12. 4%)	288(26. 5%)	43. 8%	1085

不同地区猕猴线粒体控制区全序列间差异及同源性见图 1。

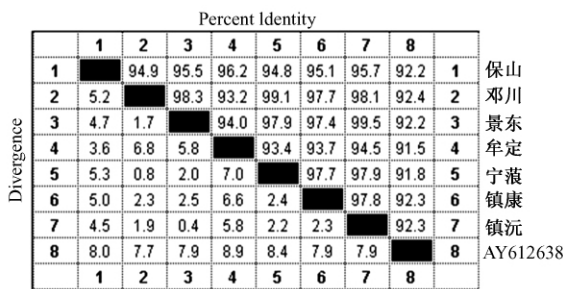


图 1 不同地区猕猴线粒体 DNA 控制区全序列间同源性分析

Fig. 1 Homology of the mtDNA control region of *Macaca mulatta* from different areas

云南不同地区猕猴的同源性为 93.2% ~ 99.5% ,具有较高的同源性 ,同源性最高的是镇沅和

景东猕猴 ,其次是邓川和宁蒗猕猴 ,同源性最低的是邓川和牟定猕猴。与 GenBank 中参考序列 (AY612638) 同源性为 91.5% ~ 92.4% 之间 ,其中 ,与邓川猕猴同源性最高(92.4%) ,与牟定猕猴同源性最低(91.5%) 。

2.3 构建系统进化树

以美国威斯康星州国家灵长类动物研究中心的猕猴为外群构建 NJ 树(图 2-A) 和 ME 树(图 2-B) ,各分支上的数值为 1000 次自举(Bootstrap) 分析得到的支持率。从图 3 中可以看出 NJ 树和 ME 树具有相同的拓扑结构 ,两者均表明所分析的猕猴分为两大分支 ,来源于美国的猕猴单独为一支 ,而云南猕猴聚为一支。云南猕猴分为两个平行的姐妹分支 ,保山和牟定猕猴为一支 ; 景东、镇沅、邓川、宁蒗和镇康猕猴聚为另一支。其中 ,景东和镇沅以及邓川和宁蒗猕猴遗传关系最近。

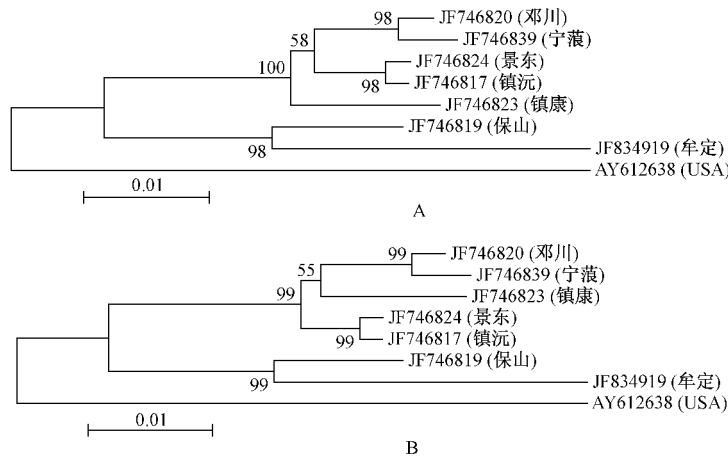


图 2 基于线粒体 DNA 控制区构建的 NJ(A) 和 ME(B) 系统树

Fig. 2 Phylogenetic trees constructed using NJ (A) and ME (B) methods based on the complete sequences of mtDNA control region

3 讨论

云南猕猴线粒体 DNA 控制区全长为 1 084 ~ 1 089 bp, A、T、G 和 C 四种碱基平均含量分别为 29.9%、26.9%、12.3% 和 30.9%, 序列表现出了很强的反 G 偏倚(即 G 的含量明显低于其它 3 种碱基的含量), 这与脊椎动物线粒体 DNA 的 G 碱基极低现象一致^[9-12]。A + T 碱基平均含量(56.8%) 高于 G + C 碱基平均含量(43.2%), 与其它哺乳动物 A、T 含量高和 G、C 含量低的特点相似。序列变异包括了转换、颠换、插入和缺失四种形式, 其中转换最为常见, 转换与颠换的比值为 26.1, 明显大于转换与颠换比的临界值 2.0^[13], 表现出较高的转换偏爱性, 与其他哺乳动物线粒体 DNA 序列的研究结果是一致的^[14, 15], 同时也说明云南猕猴线粒体 DNA 控制区序列突变未达到饱和状态。

我们采用邻接法(NJ)和最小进化法(ME)构建系统进化树, 以来源于美国威斯康星州国家灵长类动物研究中心的猕猴为外群, 分析不同地区猕猴的遗传进化关系。系统进化树显示云南猕猴聚为一支, 而来源于美国的猕猴单独聚为一支。就云南猕猴而言存在两个姐妹分支, 来自不同地区的猕猴大多按照其来源地分别相对聚在一起, 表现出与地理位置一定的对应关系。目前未见报道国内其它地区猕猴线粒体 DNA 控制区全序列的测定和提交 GenBank 数据库, 少数研究报道只是测定了其中的部分序列, 因此本实验中并没有与国内其它地区猕猴群体进行比较研究。

参考文献:

[1] Wenink PW, Baker AJ, Tilanus MG. Mitochondrial control-region sequences in two shorebird species, the turnstone and the dunlin, and their utility in population genetic studies [J]. Mol Biol Evol, 1994, 11(1): 2-31.

- [2] 潘登, 符云新, 张亚平. 基于线粒体控制区的滇金丝猴群体遗传学研究 [J]. 遗传, 2006, 28(4): 432-436.
- [3] 柳杨, 李进华, 赵健元. 黄山短尾猴 mtDNA 控制区序列变异及种群的遗传多样性 [J]. 动物学报, 2006, 52(4): 724-730.
- [4] 何丽, 张于光, 李迪强, 等. 川金丝猴 mtDNA D-loop 序列遗传多样性分析 [J]. 动物学杂志, 2010, 45(1): 70-76.
- [5] 徐怀亮, 李地艳, 程安春, 等. 四川地区猕猴线粒体 DNA 控制区遗传多样性及其种群遗传结构 [J]. 兽类学报, 2010, 30(3): 247-255.
- [6] 蒋学龙, 王应祥, 马世来. 中国猕猴的分类及分布 [J]. 动物学研究, 1991, 12(3): 241-247.
- [7] 董高华, 徐怀亮, 帅素容. 藏酋猴线粒体基因组序列测定与进化分析 [D]. 硕士学位论文, 2008, 四川农业大学.
- [8] Blancher A, Bonhomme M, Crouau-Roy B, et al. Mitochondrial DNA sequence phylogeny of 4 populations of the widely distributed cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis fascicularis*) [J]. J Hered, 2008, 99(3): 254-264.
- [9] Sueoka N. Two aspects of DNA base composition: G + C content and translation-coupled deviation from intra-strand rule of A = T and G = C [J]. J Mol Evol, 1999, 49(1): 49-62.
- [10] 周继亮, 张亚平, 黄美华, 等. 腹亚科蛇线粒体细胞色素 b 基因序列分析及其系统发育 [J]. 动物学报, 2001, 47(4): 361-366.
- [11] 杜民, 齐兴柱, 尹绍武, 等. 基于 Cyt b 基因序列研究 6 种裸胸鲳属鱼类的进化关系 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 23-30.
- [12] Ding S, Zhuang X, Guo F, et al. Molecular phylogenetic relationships of China Seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences [J]. Sci China C Life Sci, 2006, 49(3): 235-242.
- [13] Knight A, Mindell DP. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of fea's viper [J]. Syst Biol, 1993, 42(1): 18-31.
- [14] Gu ZL, Zhao XB, Li N, et al. Complete sequence of the yak (*Bos grunniens*) mitochondrial genome and its evolutionary relationship with other ruminants [J]. Mol Phylogenet Evol, 2007, 42(1): 248-255.

(修回日期)2011-08-10