

# 大趾鼠耳蝠线粒体 DNA 控制区结构及变异

刘丰 宋雨 颜识涵 罗金红 冯江\*

(东北师范大学城市与环境科学学院 长春 130024)

**摘要:** 采用 PCR 产物直接测序法首次测定大趾鼠耳蝠 (*Myotis macrodactylus*) 10 个个体的线粒体 DNA (mtDNA) 控制区全序列, 并进行了结构和变异分析。结果表明, 大趾鼠耳蝠的控制区结构与其他哺乳动物相似, 可分为一个中央保守区 (包括 F、E、D、C、B 元件) 和两个外围结构域: 延伸的终止结合序列区 (包括 ETAS1 和 ETAS2 元件) 和保守序列区 (包括 CSB1、CSB2 和 CSB3 元件), 其中最为保守的是中央保守区 (核苷酸变异度为 1.8%)。大趾鼠耳蝠控制区核苷酸全序列具有丰富的长度多态性 (1 778 ~ 2 048 bp), 主要是由在碱基组成、重复数目和排列方式上异质的串联重复序列造成的。在 ETAS 内发现了 TACAT 及其反向互补序列 ATGTA, 支持滑移错配模式 (slipped mispairing model)。本研究为该物种的进一步研究和保护提供基础遗传数据。

**关键词:** 大趾鼠耳蝠; 控制区; 保守元件; 串联重复

**中图分类号:** Q951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)04-19-09

## Structure and Sequence Variation of the Mitochondrial DNA Control Region in *Myotis macrodactylus*

LIU Feng SONG Yu YAN Shi-Han LUO Jin-Hong FENG Jiang\*

(College of Urban and Environmental Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China)

**Abstract:** Using PCR product direct sequencing, mitochondrial control region (CR) sequences of 10 individuals of *Myotis macrodactylus* were analyzed for the first time. The CR sequences of *M. macrodactylus*, as in other mammals, could be subdivided into a central conserved domain (CD, including five boxes: F, E, D, C and B) and two flanking variable domains: extended termination associated sequences (ETAS, including two conserved elements: ETAS1 and ETAS2) and conserved sequences blocks (CSB, including three conserved elements: CSB1, CSB2 and CSB3). The CD was the most conserved domain with the nucleotide variance rate of 1.8%. Because of the repeated sequences which were different in base composition, copy number and arrange type, the CR sequences showed notable length polymorphism (1 778 - 2 048 bp). In the ETAS, the short sequence TACAT and its reverse complementary sequence were found seven times, supporting the slipped mispairing model. This paper has provided basic genetic data for further study and protection of *M. macrodactylus*.

**Key words:** *Myotis macrodactylus*; Control region; Conserved element; Tandem repeat

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 30770361), 教育部博士点基金项目 (No. 20060200007) 和东北师范大学国家大学生创新性实验计划项目 (No. 071020046);

\* 通讯作者, E-mail: fengj@nenu.edu.cn;

**第一作者介绍** 刘丰, 女, 本科生; 研究方向: 保护生物学; E-mail: liuf832@163.com。

**收稿日期:** 2009-01-16, **修回日期:** 2009-04-28

线粒体 DNA (mtDNA) 控制区 (control region, CR) 是动物 mtDNA 分子的主要非编码区<sup>[11]</sup>, 在 mtDNA 分子的复制和转录上起重要作用<sup>[2]</sup>。一些研究已经对哺乳动物和其他脊椎动物控制区整个结构特征给予详尽描述<sup>[3~7]</sup>。脊椎动物控制区分为 3 个不同的结构域, 包括延伸的终止结合序列区 (extended termination associated sequences, ETAS), 中央保守区 (central conserved domain, CD) 和保守序列区 (conserved sequences blocks, CSB), 彼此之间在碱基的进化速度和模式上有所不同<sup>[4,8,9]</sup>。依据 Sbis à 等<sup>[4]</sup> 的研究, 哺乳动物中 ETAS 包括两个保守元件, 即 ETAS1 和 ETAS2, 还包括 Doda 等<sup>[10]</sup> 首次鉴定的 TAS 元件。另外, 在许多哺乳动物 ETAS 区内检测到长串联重复序列<sup>[5,11]</sup>。CD 区在所有物种中是高度保守的区域。Southern 等<sup>[12]</sup> 首次在哺乳动物的 CD 区内识别了 F、E、D、C、B 保守元件。CSB 区包括 CSB1、CSB2 和 CSB3 三个保守元件, 在一些哺乳动物的 CSB 内还存在短串联重复序列<sup>[1,13~15]</sup>。

在翼手目中对控制区结构的细致研究较少, 仅见 Wilkinson 等<sup>[16]</sup> 对幕蝠 (*Nycticeius humeralis*) mtDNA 控制区长度和序列变异特点的分析; 孙克萍\* 对菊头蝠属及蹄蝠属动物 mtDNA 控制区序列变异和系统发育分析的研究等。对蝙蝠科鼠耳蝠属动物控制区序列的研究很少, 目前仅见对大鼠耳蝠 (*Myotis myotis*) 控制区和核基因的结构比对研究<sup>[17]</sup>; 对加州鼠耳蝠 (*M. californicum*) 控制区差异与形态学差异关系的研究<sup>[18]</sup> 等, 但这些都是基于控制区部分序列的研究。可能是因为鼠耳蝠属动物控制区具有较长的串联重复序列, 难以获得其全序列, 因此关于鼠耳蝠属蝙蝠 mtDNA 控制区结构的研究很少, 目前仅见 Pertri 等<sup>[1]</sup> 在对 mtDNA 末端序列异质性的研究中报道了一个大鼠耳蝠个体的控制区全序列, 并简单描述了其结构。

大趾鼠耳蝠 (*M. macrodactylus*) 隶属翼手目 (Chiroptera) 蝙蝠科 (Vespertilionidae) 蝙蝠亚科 (Vespertilioninae) 鼠耳蝠属 *Leuconoe* 亚属的水鼠耳蝠组 (*M. daubentonii* group)<sup>[19]</sup>, 目前报道该物

种仅分布于日本、俄罗斯、西伯利亚、朝鲜<sup>[20]</sup> 和中国<sup>[21]</sup>。大趾鼠耳蝠在国内分布范围较小, 仅限于吉林省南部的通化地区<sup>[21]</sup>。目前, 国外对其的研究主要集中在分类与核型<sup>[22,23]</sup> 方面, 国内仅见关于其外形、头骨、牙齿特征<sup>[21]</sup> 和声波<sup>[24]</sup> 的研究。本文获得大趾鼠耳蝠的控制区全序列, 并对其控制区结构特征进行全面细致研究, 为该物种的进一步研究和保护提供基础遗传数据。

## 1 材料与方法

**1.1 样本采集和 DNA 提取** 2008 年 7 月 13 ~ 18 日, 利用雾网, 在吉林省集安市长岭县大粒子洞 (41°03' N, 125°50' E, 海拔 250 m) 捕获大趾鼠耳蝠成体 6 只 (3 雌, 3 雄, 代码: JA-1 ~ JA-6); 2007 年 5 月 12 日在通化市柳河县罗通山小水洞 (42°22' N, 126°06' E, 海拔 820 m) 捕获大趾鼠耳蝠成体 4 只 (1 雌, 3 雄, 代码: TH-1 ~ TH-4)。利用上海生工生物工程技术有限公司生产的 UNIQ-10 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒 (SKI205), 从约 30 mg 的冻存肌肉组织中提取大趾鼠耳蝠个体的基因组 DNA。

**1.2 DNA 扩增和测序** 利用聚合酶链式反应 (PCR 技术) 扩增和测序 10 个样本的控制区全序列。本研究中把控制区分为前后两段, 用两对引物分别获得前后两段序列, 然后手工查找中间引物对应的序列, 拼接后获得全序列。由于中间引物位于最为保守的 CD 区, 比较稳定, 该方法可行。mtRNA<sup>Pro</sup> 端的引物为 Thr-L (5'-CCCGGICTTGTAACC-3') 和 DL-H (5'-CCTGAA-GTAGGAACCAAGATG-3')<sup>[16]</sup>, mtRNA<sup>Phe</sup> 端的引物为 L16517 (5'-CATCTGGTCTTACTTCAAG-3') 和 SH651 (5'-AAGGCTAGGACCAAACCT-3')<sup>[14]</sup>。PCR 反应体系总体积为 25 μl, 含 10 × Buffer 2.5 μl, 0.2 μmol/L dNTP 2.0 μl, 10 μmol/L 引物各 1.0 μl, 以及约 50 ng 的 DNA 模板, 2.5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, 中国)。Thr-L 和 DL-H 引

\* 孙克萍. 中国菊头蝠科与蹄蝠科蝙蝠分子系统发育研究. 长春: 东北师范大学博士学位论文, 2008.

物的热循环反应:94 2 min;然后 94 30 s,55 30 s,72 30 s,共 34 个循环;终延伸 72 10 min。L16517 和 SH651 引物的热循环反应:95 3 min;然后 95 45 s,50 45 s,72 1 min,共 35 个循环;终延伸 72 7 min。所有 PCR 产物利用 EZ-10Spin Column DNA Gel Extraction Kit(BBI 公司)(BS353)纯化回收后直接测序。序列测定在上海生工生物工程技术有限公司完成。

**1.3 DNA 序列分析** Sbisa 等<sup>[4]</sup>通过对哺乳动物控制区全序列的研究给出哺乳动物控制区中 CD 区和 ETAS1、ETAS2、CSB1、CSB2 及 CSB3 元件的序列比对图,孙克萍\*通过对菊头蝠科与蹄蝠科蝙蝠控制区全序列的研究分别给出这两科蝙蝠的控制区全序列比对图,并划分出各结构域和保守元件。本文主要参照这两篇文献来

分析大趾鼠耳蝠控制区的结构。利用 Clustal X (Higgins and Sharp 1989) 比对大趾鼠耳蝠控制区全序列,并辅以人工校正,手工查找重复序列。利用 Mega 3.0 软件分析序列的碱基组成和变异位点。

## 2 结 果

**2.1 控制区长度多态性和结构特征** 所有测序个体的控制区全序列均录入 GenBank,登录号为 FJ593870 ~ FJ593879。检测的 10 个样本中,控制区长度变化范围是 1 778 bp (JA-4) 到 2 048 bp (TH-4),所有个体均显示了不同的控制区长度。排除重复序列后,10 只个体的控制区全序列显示出 3 种长度多态性,分别为 1 089 bp (JA-4)、1 095 bp (JA-2、JA-6)、1 096 bp (JA-1、JA-3、JA-5、TH-1 ~ TH-4)。

表 1 大趾鼠耳蝠控制区内各元件的核苷酸组成和变异(排除重复序列)

Table 1 Nucleotide composition and variation in the control region domains of *Myotis macrodactylus* (excluding repeats)

	延伸的终止结合序列区 ETAS			中央保守区 CD					保守序列区 CSB					
	ETAS	ETAS1	ETAS2	CD	F	E	D	C	B	CSB	CSB1	CSB2	CSB3	
碱基含量 Nucleotide composition (%)	A	40.5	42.2	40.1	28.9	32.4	22.9	32.8	27.0	11.1	33.9	32.9	23.5	50.0
	T	33.1	34.9	37.0	26.6	10.8	24.0	24.1	34.4	44.4	27.6	25.7	11.8	5.6
	G	7.0	7.0	6.0	18.1	10.8	20.0	13.6	15.4	16.7	13.5	20.7	0	5.6
	C	19.4	15.9	16.9	26.4	46.0	33.1	29.5	23.2	27.8	25.0	20.7	64.7	38.9
变异位点 Variable sites	16	2	1	7	0	1	1	0	0	20	1	0	0	
保守位点 Conserved sites	277	56	64	384	28	34	36	26	18	393	22	17	18	
简约信息位点 Parsimony informative sites	5	2	0	3	0	1	0	0	0	3	1	0	0	
总位点数 Total sites	293	59	65	392	28	35	37	26	18	413	24	17	18	
变异率 Variance rate (%)	5.5	3.4	1.5	1.8	0	2.9	2.7	0	0	4.9	4.2	0	0	
卡方检验 Chi square test	$\chi^2$	0.24	2.08	0.0	0.38	0.07	0.49	0.24	0.07	0.0	0.22	0.85	0.0	0.0
	<i>df</i>	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	27	18	27
	<i>P</i>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

大趾鼠耳蝠控制区全序列在排除重复序列后,经过多重比对共确定了 1 096 个比对位点,经过比对我们定义控制区轻链 5 端到核苷酸位点 293 处为 ETAS 区;比对位点 294 到位点 688 处为 CD 区;比对位点 689 至控制区轻链 3 末端为 CSB 区(图 1,2)。同时在不同结构域内还

检测到多个保守元件和重复序列(图 1,2),与其他哺乳动物控制区结构特征相似。

**2.2 ETAS 结构域** 所有检测个体的 ETAS 结构域长度变化范围为 698 bp (JA-4) 到 941 bp (JA-1、TH-1)。在控制区 ETAS 内存在两个保守元件(ETAS1、ETAS2)和长度为 81 bp 的串联重

\* 孙克萍. 中国菊头蝠科与蹄蝠科蝙蝠分子系统发育研究. 长春: 东北师范大学博士学位论文, 2008.

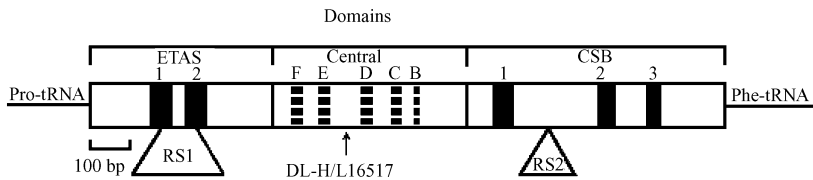


图 1 大趾鼠耳蝠 mtDNA 控制区结构示意图(参照 Sun 等<sup>[25]</sup>绘制)

Fig. 1 Schematic diagram of the organization of the mitochondrial control region in *Myotis macrodactylus* (Drawn referring to Sun *et al.*<sup>[25]</sup>)

大趾鼠耳蝠 mtDNA 控制区位于 tRNA<sup>Pro</sup> 基因和 tRNA<sup>Phe</sup> 基因之间。靠近 tRNA<sup>Pro</sup> 基因的是延伸的终止结合序列区 (ETAS), 该结构域内有 2 个保守元件 (ETAS1、ETAS2) 和长的串联重复序列 (RS1); 靠近 tRNA<sup>Phe</sup> 基因的是保守序列区 (CSB), 该结构域内有 3 个保守元件 (CSB1、CSB2 和 CSB3) 和短的串联重复序列 (RS2); 位于 ETAS 和 CSB 之间的是中央保守区 (Central), 该结构域内有 5 个保守元件 (F、E、D、C、B)。DL-H/L16517 表示测序中所用的中间引物。

The D-loop region of *Myotis macrodactylus* locates between the tRNA<sup>Pro</sup> and tRNA<sup>Phe</sup>. Next to the tRNA<sup>Pro</sup> is the extended termination associated sequences domain (ETAS Domain), including two short conserved sequence blocks (ETAS1, ETAS2) and long tandem repeat sequences (RS1); next to the tRNA<sup>Phe</sup> is the conserved sequence blocks domain (CSB Domain), including three conserved sequence blocks (CSB1, CSB2 and CSB3) and short tandem repeat sequences (RS2); between the ETAS and CSB is the central domain, including five short conserved sequence blocks (F, E, D, C, B). DL-H/L16517 is the middle primer we used in the DNA sequencing.

复序列 (repeated sequences 1, RS1), 重复次数为 6 到 9 次不等 (图 1, 表 2)。RS1 包括部分 ETAS1 和部分 ETAS2 元件。排除 RS1 后, ETAS 长度变化范围是 290 bp (JA-4) 到 293 bp (JA-1 ~ JA-3, JA-5 ~ TH2), 核苷酸变异率为 5.5%。其中, ETAS1 的核苷酸变异率 (3.4%) 显著比 ETAS2 (1.5%) 高。ETAS 与其中的元件在碱基组成上都表现出相似的偏倚性: A > T > C > G, A + T > C + G, 显示出明显的 AT (73.6%) 富集 (表 1)。此外, 在 ETAS 内还发现 5 个 TACAT 和 2 个 ATGTA 短序列 (图 1), 这些反向互补的短序列可以形成多个发夹结构。

**2.3 CD 结构域** 3 个结构域中, CD 区的长度变异最小, 从 392 bp (JA-4) 到 394 bp (JA-2, JA-6)。CD 区也是最为保守的区域, 核苷酸变异率仅为 1.8%。在 CD 内识别 5 个保守元件, F、E、D、C、B 元件 (图 1, 2), 仅在较长的 E (35 bp)、D (37 bp) 元件中各检测到一个变异位点。在碱基组成上 CD 区表现为 A > T > C > G, 但相对两个外围结构域而言表现出 CG (45.5%) 富集, 具有较高的 G 含量 (18.8%) 和较低的 A 含量 (28.9%) (表 1)。

**2.4 CSB 结构域** 10 个个体的样本中 CSB 的长

度变化范围为 623 bp (JA-3) 到 761 bp (JA-2)。在 CSB 内检测到 3 个保守元件 (CSB1、CSB2 和 CSB3) 和长度为 6 bp 的短串联重复序列 (repeated sequences 2, RS2), 位于 CSB1 和 CSB2 之间, 重复次数 35 ~ 59 次不等 (图 1, 表 3)。排除重复序列后 CSB 的长度只有 JA-4 为 407 bp, 其余个体均为 408 bp。CSB 区核苷酸变异率为 4.9%, 3 个元件中仅在较长的 CSB1 (24 bp) 中检测到 1 个变异位点。CSB 的碱基组成表现为 A > T > C > G, 其 AT 含量为 61.5%。

**2.5 重复序列** 本研究所有个体在 ETAS1 和 ETAS2 之间均存在长度为 81 bp 的长串联重复序列。各样本间重复数目 (6 ~ 9 次不等) 存在差异, 在具有相同重复单元和拷贝数的个体内重复单元的排列方式也不一致 (表 2)。不同重复单元是以单一可变单元为基础发生碱基的颠换和转换的, 无插入和缺失 (图 3)。

RS1 中重复单元 C 出现的次数最多, 共出现 32 次, 占总数的 38.8%, 该重复单元的碱基组成为: A = 44.4%, T = 37.1%, G = 4.9%, C = 13.6%, 表现出 A > T > C > G 的碱基组成偏倚, 且 AT (81.5%) 明显富集。比较所有个体的长串联重复序列, 81 bp 中有 15 个位点共发生 144

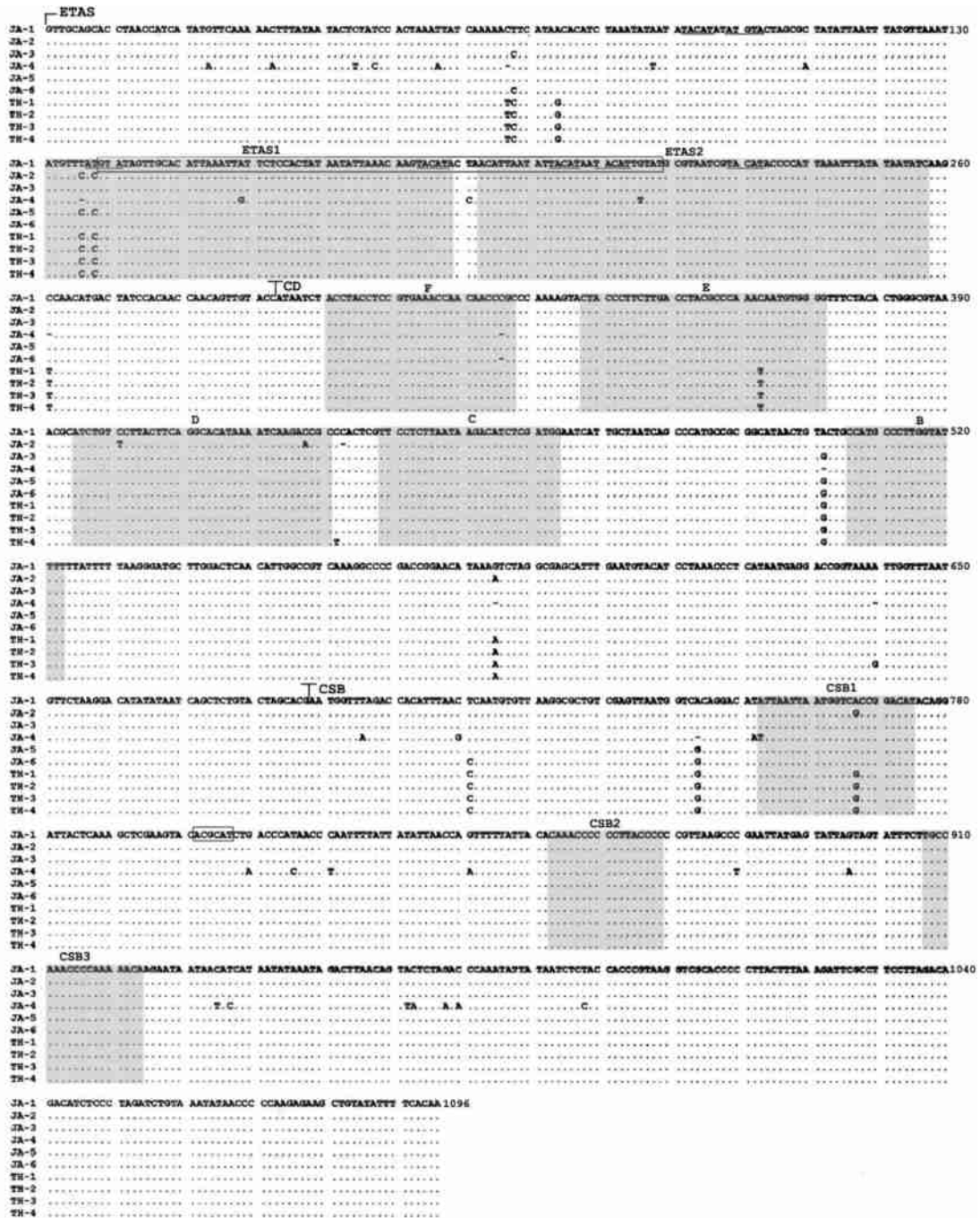


图 2 10 只大趾鼠耳蝠个体的控制区序列比对图(排除重复序列)

Fig. 2 Alignment of the control region sequences of 10 *Myotis macrodactylus* (excluding repeats)

JA-1~JA-6 和 TH-1~TH-4 分别表示测序的 10 只个体样本。图中用“T”划分出了延伸的终止结合序列区(ETAS)、中央保守区(CD)和保守序列区(CSB)。各保守元件用灰色部分标出,包括 ETAS 结构域中的 ETAS1 和 ETAS2 元件,CD 内的 F~B 元件,CSB 内的 CSB1、CSB2、CSB3 元件。串联重复序列(RS1 和 RS2)的重复单元用方框标出,短序列 TACAT 及其反向互补序列 ATGTA 用下划线标出。

JA-1 to JA-6, TH-1 to TH-4 are the code numbers of the 10 individuals sequencing in this paper. The three domains (ETAS, CD and CSB) were shown by “T”. ETAS1 and ETAS2 within the ETAS domain, conserved boxes F - B within the CD, CSB1, CSB2 and CSB3 elements within the CSB domain were highlighted in gray. The repeated units in the tandem repeat sequences (RS1 and RS2) were indicated with the rectangles. The short sequences TACAT and its reverse complementary sequence ATGTA were underlined.

A	GTATAATTGC	ACATTAAATT	ATTCTCCACA	TAAATATTAA	ACAAGTACAT	ACTAACATTA	ATATTACATA	ATACATTGTA	T
B	.....T	.....	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....
C	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
D	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....G	.....	.....
E	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....CA	.....
F	.....C..T	.....G..TA	.....G..C	.....G	.....	.....A	.....	.....AC	.....
G	.....T	.....G	.....TA	.....G	.....	.....A	.....	.....AC	.....
H	.....T	.....C	.....TA	.....G	.....	.....A	.....	.....AC	.....
I	.....T	.....C	.....TA	.....G	.....	.....G	.....	.....A	.....
J	.....T	.....C	.....TA	.....G	.....	.....T..T..G	.....	.....TA	.....
K	.....T	.....	.....C	.....	.....	.....	.....G	.....	.....
L	.....T	.....	.....	.....	.....	.....C	.....	.....	.....
M	.....T	.....	.....	.....	.....G	.....	.....	.....	.....
N	.....T	.....	.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....
O	.....T	.....	.....C	.....	.....	.....	.....	.....	.....
P	.....T	.....	.....C	.....	.....	.....	.....	.....CA	.....
Q	.....C.....T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....

图 3 10 个样本的 RS1 中出现的所有重复单元

Fig. 3 All of the repeated units in RS1 of the 10 individuals

左侧 A~Q 为 10 个样本的 RS1 中出现的不同重复单元的代码,“.”表示与重复单元 A 一致的核苷酸。

A - Q on the left are the codes of different repeated units in RS1 of the 10 individuals.

“.” means the nucleotide is the same as it in repeated unit A.

表 2 大趾鼠耳蝠 ETAS 区 RS1 的重复元件及其排列

Table 2 The repeated motifs and their array of the RS1 in the ETAS domain of all the bats in this study

样本个体 Individual sample	重复单元的排列 Array	重复次数 No. of repeats
JA-1	A,C,C,L,L,L,L,M,E	9
JA-2	A,C,C,L,L,L,M,E	8
JA-3	A,B,A,C,D,C,C,E	8
JA-4	F,G,H,I,I,J	6
JA-5	C,C,C,C,C,C,E	8
JA-6	A,B,C,C,C,K,C,E	8
TH-1	A,C,C,N,C,C,C,O,P	9
TH-2	A,C,O,C,O,P	7
TH-3	A,C,Q,Q,C,C,O,P	8
TH-4	A,C,C,C,C,C,O,P	9

A~Q 表示 RS1 中不同的重复单元,具体的碱基序列见图 3。

A - Q mean different repeated units in RS1 and the specific sequences are shown in the Fig. 3.

次变异,其中转换发生 132 次,占 91.7%,而且多为 C、T 转换,占总转换的 75.0%。在不同的个体之间第一个(最靠近 tRNA<sup>Phe</sup> 端)重复单元是最为保守的,只有 2 个个体发生了碱基变异。所有个体 RS1 的中间部分皆有相同的重复单元出现(表 2)。

本研究中所有个体的 CSB1 和 CSB2 之间都存在长度为 6 bp 的短的串联重复序列(RS2),重复次数 35~59 次不等,重复单元为 ACGCAT(图 1,表 3)。在所有个体中未发现 RS2 的各重复单元间有任何变异,但是所有

RS2 在结束后都出现了一个与重复单元相似的 5 或 6 bp 的短序列,其中 CTGACC 出现了 4 次,频率最高。

表 3 大趾鼠耳蝠 CSB 区 RS2 中重复元件及排列

Table 3 The repeated motifs and their array of RS2 in the CSB domain of all the bats in this study

样本个体 Individual sample	碱基排列 Base sequences	重复次数 No. of repeats
JA-1	(ACGCAT) 49 + ACGAT	49
JA-2	(ACGCAT) 59 + CCGAT	59
JA-3	(ACGCAT) 35 + CCGCAT	35
JA-4	(ACGCAT) 46 + ACGCAC	46
JA-5	(ACGCAT) 42 + CTGACC	42
JA-6	(ACGCAT) 47 + CTGACC	47
TH-1	(ACGCAT) 41 + ACGAAT	41
TH-2	(ACGCAT) 44 + CTGACC	44
TH-3	(ACGCAT) 55 + CTGACC	55
TH-4	(ACGCAT) 51 + ACGCTT	51

### 3 讨论

3.1 大趾鼠耳蝠控制区结构功能与变异 10 个个体的控制区全序列表现出丰富的长度多态性,长度差异达到 270 bp,除去重复序列后仅体现出 3 种长度多态性,长度差异为 7 bp,由此可见,控制区全序列的长度多态性主要是由两侧结构域中的串联重复序列造成的。

控制区 3 个结构域中处于中间位置的 CD 区变异率最低,G 含量最高,A 含量最低,相对

地表现出 CG 富集,这些现象都支持把大趾鼠耳蝠控制区划分为 ETAS、CD、CSB 3 个结构域。CD 区作为最为保守的结构域,应该具有重要的生物功能与其保守性相对应,但目前其具体功能还不清楚,仅发现 CD 区可能包括特殊的序列,能够与线粒体相关的细胞骨架分子结合<sup>[26]</sup>。

研究发现 ETAS1 可能包括新生 DNA 链终止信号的识别位点,ETAS2 可能包括终止因子的束缚位点<sup>[3]</sup>。Larizza 等<sup>[4]</sup>对啮齿目物种的研究发现,ETAS1 总是存在,而 ETAS2 可能不存在或十分不保守,这表明在 mtDNA 复制中 ETAS1 元件在功能上比 ETAS2 更为重要<sup>[5-7]</sup>。本研究的大趾鼠耳蝠个体均存在这两个元件,且 ETAS1 的变异度(3.4%)高于 ETAS2(1.5%)。ETAS2 元件较高的保守性暗示大趾鼠耳蝠的 ETAS2 元件可能在 mtDNA 复制过程中起着重要作用,或者显示了 ETAS2 元件特殊的进化方式。

CSB 中包含 3 个保守元件(CSB1、CSB2 和 CSB3),是一个在功能上十分重要的区域,包括重链复制起点(OH)、重链和轻链的转录启动子(HSP 和 LSP),分别指导重链和轻链的转录<sup>[27]</sup>。大趾鼠耳蝠 CSB 中的 3 个元件仅在 CSB1 中检测到 1 个变异位点(表 1),Sbisa 等<sup>[4]</sup>认为 CSB1 在所有物种内总是存在的,是功能上最重要的元件,但保守性最差<sup>[5-7]</sup>。目前对啮齿目棕背鼠耳蝠(*Clethrionomys rufocanus*)和鼯形鼠(*Spalax ehrenbergi* superspecies)<sup>[5,6]</sup>的研究中发现有 CSB1-like 元件存在于 ETAS 内,Sun 等<sup>[25]</sup>对菊头蝠的研究中发现 CSB1-like 位于 CSB 内,而本次对于大趾鼠耳蝠的研究并未发现 CSB1-like 元件,可见 CSB1-like 元件在功能上可能并不是必须的,所以不是在所有哺乳动物中都存在。

**3.2 串联重复序列** 根据 Wilkinson 等<sup>[11]</sup>对翼手目 18 个物种控制区的研究结果,翼手目控制区的 RS1 重复单元长度为 78~85 bp,重复次数 2~9 次不等。我们在大趾鼠耳蝠的 ETAS 中发现了长度为 81 bp 的串联重复序列,重复次数 6~9 次不等(表 2),与翼手目的研究结果一致。

目前已在很多脊椎动物中报道过 RS1,例如普通白齿鼯(*Crocidura russula*)<sup>[14]</sup>、首鲟(*Acipenser transmontanus*)<sup>[28]</sup>、非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)<sup>[29]</sup>、绵羊(*Ovis aries*)和家猫(*Felis catus*)<sup>[4]</sup>等,重复次数 1~8 次不等。RS1 在脊椎动物中的普遍存在,其数目上的变异引起了人们的关注。据研究,RS1 的重复数目并不是随机的,而是有一定选择的。具有多个重复单元的 mtDNA 可以弥补某个重复序列上的有害突变,使个体在选择上具有一定的优势,这可能是 mtDNA 的一种修复机制;然而 9 个以上的重复在复制过程中更容易发生有害突变,会使个体在选择上有一定的劣势<sup>[11]</sup>。此外,大趾鼠耳蝠不同个体 RS1 的重复序列中,靠近 *Pro* 基因的重复单元最为保守,说明第一个重复单元可能具有更重要的功能,承受的选择压力更大,因而表现出更保守的结构<sup>[16]</sup>。

在 CSB1 和 CSB2 之间发现短的串联重复序列,该元件仅在哺乳动物中有报道<sup>[4]</sup>,且不同物种间重复单元的长度变化很大<sup>[14]</sup>,从 6 bp 到 38 bp<sup>[30,31]</sup>不等。本研究中所有大趾鼠耳蝠个体 RS2 的重复单元长度均为 6 bp,与大鼠耳蝠<sup>[11]</sup>相同。大趾鼠耳蝠 RS1 结束的位置伴随以重复单元为基础发生了变异的短序列(表 3),可能是复制中的突变造成<sup>[14]</sup>。

这些长、短串联重复序列(RS1 和 RS2)的形成机制大都解释为复制过程中的滑移错配(slipped mispairing)事件<sup>[32,33]</sup>。在大趾鼠耳蝠控制区的 RS1 中,我们发现同一个体中靠得越近的重复单元在碱基上的差异越小,也就是说相邻的两个重复序列比其他任意两个重复序列表现出更小的变异,且每个个体的 RS1 中,中间部分都含有相同的重复单元,这些发现也支持滑移错配假说<sup>[25]</sup>。Saccone 等<sup>[34]</sup>发现在哺乳动物 ETAS 中短序列 TACAT 和它的反向互补序列 ATGTA 常常一起出现,形成发夹结构。事实上,在大趾鼠耳蝠的 ETAS 内也发现了这种反向互补的短序列。这些反向互补序列形成的发夹结构可能是在 mtDNA 复制过程中导致滑移错配事件,形成重复序列的主要原因<sup>[4]</sup>。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Petri B, Von Haeseler A, Paeabo S. Extreme sequence heteroplasmy in bat mitochondrial DNA. *Biological Chemistry Hoppe Seyler*, 1996, **377**: 661 ~ 667.
- [ 2 ] Randi E, Lucchini V. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alcedo*. *Journal of Molecular Evolution*, 1998, **47**(4): 449 ~ 462.
- [ 3 ] Brown G G, Gadaleta G, Pepe G, et al. Structural conservation and variation in the D-loop-containing region of vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Biol*, 1986, **192**(3): 503 ~ 511.
- [ 4 ] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 1997, **205**(1-2): 125 ~ 140.
- [ 5 ] Larizza A. Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-Loop region in rodents. *Journal of Molecular Evolution*, 2002, **54**(2): 145 ~ 155.
- [ 6 ] Matson C W, Baker R J. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of red-backed voles (*Clethrionomys*). *Molecular Biology and Evolution*, 2001, **18**(8): 1 494 ~ 1 501.
- [ 7 ] Reyes A, Nevo E, Saccone C. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of subterranean mole rats, *Spalax ehrenbergi* superspecies. *Israel Molecular Biology and Evolution*, 2003, **20**(4): 622 ~ 632.
- [ 8 ] Lee W J, Conroy J, Howell W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, **41**(1): 54 ~ 66.
- [ 9 ] Baker A J, Marshall H D. Mitochondrial Control Region Sequences as Tools for Understanding Evolution. San Diego, CA: Academic Press, 1997, 51 ~ 79.
- [ 10 ] Doda J N, Wright C T, Clayton D A. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1981, **78**(10): 6 116 ~ 6 120.
- [ 11 ] Wilkinson G S, Mayer F, Kerth G, et al. Evolution of repeated sequence arrays in the D-Loop region of bat mitochondrial DNA. *Genetics*, 1997, **146**(3): 1 035 ~ 1 048.
- [ 12 ] Southern O, Southern P J, Dixon A E. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *Journal of Molecular Evolution*, 1988, **28**(1): 32 ~ 42.
- [ 13 ] Høelzel A R, Lopez J V, Dover G A, et al. Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequence in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *Journal of Molecular Evolution*, 1994, **39**(2): 191 ~ 199.
- [ 14 ] Fumagalli L. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. *SMBE*, 1996, **13**: 31 ~ 46.
- [ 15 ] Ketmaier V, Bernardini C. Structure of the mitochondrial control region of the eurasian otter (*Lutra lutra*; Carnivora, Mustelidae): patterns of genetic heterogeneity and implications for conservation of the species in Italy. *Journal of Heredity*, 2005, **96**(4): 318 ~ 328.
- [ 16 ] Wilkinson G S, Chapman A M. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics*, 1991, **128**(3): 607 ~ 617.
- [ 17 ] Castella V, Ruedi M, Excoffier L. Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology*, 2001, **14**(5): 708 ~ 720.
- [ 18 ] Rodriguez R M, Ammerman L K. Mitochondrial DNA divergence does not reflect morphological difference between *Myotis californicus* and *Myotis ciliolabrum*. *Journal of Mammalogy*, 2004, **85**(5): 842 ~ 851.
- [ 19 ] Corbet GB, Hill J E. A World List of Mammalian Species (3rd edition). London: Natural History Museum Publications and Oxford University Press, 1991.
- [ 20 ] Wilson D E, Reeder D. Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 2005.
- [ 21 ] 江廷磊, 刘颖, 冯江. 中国翼手类一新纪录种. *动物分类学报*, 2008, **33**(1): 212 ~ 216.
- [ 22 ] Harada M, Yosida T H. Karyological study of four Japanese *Myotis* bats (Chiroptera, Mammalia). *Chromosoma*, 1978, **65**(3): 283 ~ 291.
- [ 23 ] Yoshiyuki M A. A Systematic Study of the Japanese Chiroptera. Tokyo, Japan: National Science Museum Press, 1989, 71 ~ 242.
- [ 24 ] 罗金红, 颜识涵, 宋雨等. 大趾鼠耳蝠回声定位声波特征与分析. *动物学杂志*, 2008, **44**(1): 133 ~ 138.
- [ 25 ] Sun K, Feng J, Jin L, et al. Structure, DNA sequence variation and phylogenetic implications of the mitochondrial control region in horseshoe bats. *Mammalian Biology*, 2008, **74**(2): 130 ~ 134.
- [ 26 ] Jackson D A, Bartlett J, Cook P R. Sequences attaching loops of nuclear and mitochondrial DNA to underlying structures in human cells: the role of transcription units. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**(7): 1 212 ~ 1 219.
- [ 27 ] Clayton D A. Nuclear gadgets in mitochondrial and transcription. *Trends Biochem Sci*, 1991, **16**(3): 107 ~ 111.
- [ 28 ] Brown J R, Beckenbach A T, Smith M J. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations of white



- sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Genetics*, 1992, **132** (1) : 221 ~ 228.
- [29] Dunorr-Bluteau D C, Brun G M. Mapping at the nucleotide level of *Xenopus laevis* mitochondrial D-loop H strand: structural features of the 3 region. *Biochem Int*, 1987, **14** (4) : 643 ~ 657.
- [30] Arnason E, Rand D M. Heteroplasmy of short tandem repeats in mitochondrial DNA of Atlantic Cod, *Gadus morhua*. *Genetics*, 1992, **132** (1) : 211 ~ 220.
- [31] Hoelzel A R, Hancock J M, Dover G A. Generation of VNTRS and heteroplasmy by sequence turnover in the mitochondrial control region of two elephant seal species. *Journal of Molecular Evolution*, 1993, **37** (2) : 190 ~ 197.
- [32] Levinson G, Gutman G A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol Bio Evol*, 1987, **4** : 203 ~ 221.
- [33] Madsen C S, Ghivizzani S C, Hauswirth W W. *In vivo* and *in vitro* evidence for slipped mispairing in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, **90** (16) : 7 671 ~ 7 675.
- [34] Saccone C, Attimonelli M, Sbisà E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 1987, **26** (3) : 205 ~ 211.

## 《动物学杂志》投稿注意事项

### 1 稿件的投寄

稿件可通过本刊的电子信箱 (E-mail : journal @ioz. ac. cn) 投寄 (Word 文件作附件), 同时邮寄打印稿一份, 小四号字单面隔行打印。

### 2 论文的格式要求

**题目** 应言简意赅。中文题目字数一般不超过 20 个字; 英文题目不超过 10 个实词, 实词首字母大写。

**作者** 署名入应是对论文的全部或部分内容做出主要贡献, 并能对文章内容负责的人。

**单位** 应写作者单位的标准全称及所在地和邮编。

**摘要** 中文摘要放在文首。内容必须包括: 研究目的、方法、结果 (主要数据) 和结论。用第三人称叙述。英文摘要放在中文摘要下面, 其内容应与中文摘要相对应或略详于中文摘要。

**关键词** 一般为 3 ~ 5 个, 中英文对应, 分别列在中英文摘要下面。

**前言** 结合文献阐述国内外相关研究领域的发展状况及本研究的目的和意义。

**正文** 材料与方法对材料的来源及方法的出处应详细陈述; 结果的数据要完整, 微观形态的稿件应有实验照片作为依据, 文字叙述要简洁明了, 与图表内容相互呼应; 讨论应依据前言的内容、结果的数据、现象展开讨论, 以达到解决问题或得出结论的目的。

**全文书写规格** 文中请使用国家颁布的法定计量单位和符号及规范化的名词、术语。文中首次出现的英文缩写词, 应先写出中文名称后, 再在括号内写出英文全称和缩写词。物种名称在文中第一次出现时应附拉丁学名 (种属名用斜体, 属名首字母大写)。名词术语的用法文中应前后一致。

**小标题**: 应简短准确、层次清楚。各级标题一律采用阿拉伯数字连续编码, 左顶格编排, 如“1”(一级标)、“1.1”(二级标)、“1.1.1”(三级标)。

**图表**: 力求精选, 反应同一数据的图与表不能重复。其序号一律采用阿拉伯数字编码, 在文中引用处注明。线条图应用计算机绘制, 激光打印机打印; 照片图要求反差适中、层次清晰。显微及电镜照片, 应注明长度标尺和放大倍数。

(下转第 57 页)