

巢鼠属动物的线粒体基因组分析

张亦飞[#] 蔡赫[#] 郭秋颖 张智慧 金志民 张隽晟 刘铸^{*}

牡丹江师范学院生命科学与技术学院 牡丹江 157011

摘要:为了分析巢鼠属(*Micromys*)动物线粒体基因组结构及特征,以及通过线粒体基因组分析其系统发育关系,本研究对巢鼠(*M. minutus*)、红耳巢鼠(*M. erythrotis*)和川西巢鼠(*M. pygmaeus*)进行了线粒体基因组测序,并对其线粒体基因组结构、碱基组成、密码子使用情况以及tRNA二级结构进行分析,基于13个蛋白质编码基因串联序列构建最大似然系统发生树和贝叶斯系统发生树。本研究测序的巢鼠、红耳巢鼠和川西巢鼠线粒体基因组全序列长度分别为16 239 bp、16 240 bp和16 239 bp,其结构都包含22个tRNA编码基因、13个蛋白质编码基因、2个rRNA编码基因、1个L链复制起点(O_L)以及1个控制区(D-loop)。密码子使用情况,巢鼠和川西巢鼠差异较小,红耳巢鼠与另外两种巢鼠的差异相对较大。3种巢鼠的20种tRNA可形成三叶草型二级结构, *trnK*和*trnS1*由于缺少D环和二氢尿嘧啶臂无法折叠为三叶草结构,tRNA二级结构中出现的错配均为U-G错配。线粒体基因组各部分的遗传距离显示,巢鼠与川西巢鼠的遗传距离较小,系统发生树也显示巢鼠和川西巢鼠在一个分支,有较近的系统发育关系。3种巢鼠的线粒体基因结构及特征符合脊椎动物的线粒体基因组结构特征。

关键词:巢鼠属;巢鼠;红耳巢鼠;川西巢鼠;线粒体基因组

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2025) 06-882-07

Mitochondrial Genome Analysis of the Genus *Micromys*

ZHANG Yi-Fei[#] CAI He[#] GUO Qiu-Ying ZHANG Zhi-Hui JIN Zhi-Min
ZHANG Jun-Sheng LIU Zhu^{*}

College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011, China

Abstract: [Objectives] To analyze the structure and characteristics of the mitochondrial genome of the genus *Micromys* and elucidate the phylogenetic relationships of this genus through mitochondrial genomic analysis, we conducted mitochondrial genome sequencing for *M. minutus*, *M. erythrotis*, and *M. pygmaeus*. [Methods] The mitochondrial genome structure, base composition, and codon usage were analyzed by SnapGene 6.0.2 and PhyloSuite 1.2.2. The secondary structure of tRNA was analyzed via the online tool tRNAscan-SE. On the basis of the concatenated sequences of 13 protein coding genes, the maximum likelihood and Bayesian

基金项目 牡丹江师范学院科研项目(No. HX2023004), 黑龙江省自然科学基金项目(No. LH2021C095);

* 通讯作者, E-mail: liuzhu590@sohu.com;

共同第一作者 张亦飞,男,硕士;研究方向:动物学;E-mail: duel18751130607@163.com;

蔡赫,女,硕士;研究方向:动物学;E-mail: swxch777@126.com。

收稿日期: 2025-02-06, 修回日期: 2025-05-06 DOI: 10.13859/j.cjz.202525018 CSTR: 32109.14.cjz.25018

inference phylogenetic trees were constructed in MEGA 11.0 and MrModeltest2 v2.4, respectively. [Results] The complete mitochondrial genome sequences of *M. minutus*, *M. erythrotis*, and *M. pygmaeus* obtained in this study were 16 239 bp, 16 240 bp, and 16 239 bp, respectively. Their structures all included 22 tRNA-encoding genes, 13 protein-coding genes, 2 rRNA-encoding genes, one origin of light strand replication (OL), and one control region D-loop. The codon usage patterns of *M. minutus* and *M. pygmaeus* were similar, while *M. erythrotis* showed great differences in codon usage from the other two species (Fig. 1). The 20 types of tRNA in the three species could form a cloverleaf secondary structure, while *trnK* and *trnS1* could not fold into a cloverleaf structure due to the absence of D-loop and dihydrouridine arm. All mismatches in the tRNA secondary structures were U-G mismatches. The genetic distances across different parts of the mitochondrial genome indicated that *M. minutus* and *M. pygmaeus* had a smaller genetic distance (Table 1), and the phylogenetic tree also showed that the two species were in the same branch, indicating a closer phylogenetic relationship (Fig. 2). [Conclusion] The mitochondrial genome structure and characteristics of the three species of *Micromys* in this study are consistent with those of vertebrates. The analysis of the mitochondrial genome revealed that *M. minutus* and *M. pygmaeus* have a closer kinship, while *M. erythrotis* is distant from the other two species.

Key words: *Micromys*; *M. minutus*; *M. erythrotis*; *M. pygmaeus*; Mitochondrial genome

巢鼠属 (*Micromys*) 隶属于啮齿目 (Rodentia) 鼠科 (Muridae)，是鼠科早期进化的一个分支 (Jing et al. 2015)。该属动物体型小，擅长攀爬，以善于在植物的茎上筑巢而闻名 (Smith 等 2009)。其广泛分布于亚洲和欧洲 (Wilson et al. 2005, Abramov et al. 2009)。该属长期以来被认为是单型属，即巢鼠 (*M. minutus*)。Abramov 等 (2009) 通过形态学和分子生物学研究证实了红耳巢鼠 (*M. erythrotis*) 是一个独立的物种。刘铸等 (2023) 及 Chen 等 (2023) 研究发现，巢鼠川西亚种 (*M. m. pygmaeus*) 形态学特征及系统分化与巢鼠和红耳巢鼠均存在差异，建议将其提升为种，即川西巢鼠 (*M. pygmaeus*)。

传统的巢鼠属分子系统学研究主要基于线粒体 Cyt b 基因 (裴枭鑫等 2021, Chen et al. 2023, 刘铸等 2023)。线粒体基因组全序列比单一的基因序列包含更多的信息位点，单个基因较短的序列长度可能限制了其在种群遗传学和进化研究中的分辨率，全序列分析提供了更多的遗传标记，有助于更精细地解析种群结构和进化关系 (马晓婷等 2014)。Cai 等 (2021)

和 Wang 等 (2024) 分别对红耳巢鼠和巢鼠进行了线粒体基因组的测序及系统发育分析。Jing 等 (2015) 报道的巢鼠线粒体基因组实际上为红耳巢鼠的线粒体基因组 (Wang et al. 2024)。目前，缺少对川西巢鼠线粒体基因组的分析，且 3 种巢鼠的系统发育关系存在一定争议。为更精确地分析其系统发育关系，本研究对巢鼠、红耳巢鼠和川西巢鼠进行线粒体基因组的测序及分析，补充巢鼠属的线粒体基因组数据以及对巢鼠属的分子系统学研究提供数据支持。

1 研究方法

1.1 基因组 DNA 提取

本研究使用的巢鼠 (编号 2023HD80)、红耳巢鼠 (2020AS31) 和川西巢鼠 (2019BJ17) 样本保藏于牡丹江师范学院动物组实验室，采样地分别为黑龙江省横道河子地区 (44°48'44" N, 129°02'04" E)、贵州省安顺地区 (26°21'48" N, 105°55'35" E) 和贵州省毕节地区 (26°24'22" N, 105°44'04" E)。取样本的肌肉组织，用酚-氯仿法提取基因组 DNA，并通过琼脂糖凝胶电

泳检测其纯度，于 -20 °C保存备用。

1.2 线粒体基因组序列片段扩增以及测序

参照 GenBank 中已发布的巢鼠属近缘种线粒体基因组序列，使用软件 SnapGene 6.0.2 (www.snapgene.com) 设计覆盖线粒体基因组的多对引物（附录 1）。通过 PCR 对各片段进行扩增。反应体系为 50 μl，含 200 μmol/L 的 dNTP，1.5 mmol/L 的 MgCl₂，10 pmol/L 的引物，Taq DNA 聚合酶 2.5 U（大连宝生物工程有限公司），模板 DNA 250 ng。PCR 条件为：94 °C 预变性 4 min；94 °C 变性 45 s，52 ~ 56 °C 退火 1 min，72 °C 延伸 90 s，35 个循环；72 °C 复延伸 7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后送至哈尔滨博仕生物技术有限公司测序。

1.3 序列的组装与注释

测序结果使用软件 Chromas 2.6.5 (technelysium.com.au/wp/) 进行分析核验，通过 DNASTar 软件包的 EditSeq 进行序列的组装。使用在线网站 Galaxy (usegalaxy.eu) 的工具 MITOS2 (Bernt et al. 2013) 注释线粒体基因组，Outputs 设置为“SEQ”，获得 TBL 文件并进行人工核对及代码格式修改。将注释好的序列上传至 GenBank。

1.4 生物信息学分析

使用软件 SnapGene 6.0.2 读取 GenBank 文件并绘制线粒体基因组结构图 (Liu et al. 2024)。通过在线网站 tRNAscan-SE (lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE) 绘制线粒体基因 tRNA 的二级结构图 (Lowe et al. 2016)。使用软件 PhyloSuite 1.2.2 (Zhang et al. 2020) 读取 GenBank 文件统计注释后的序列信息，联动软件 R 4.4.1 (www.r-project.org) 绘制相对同义密码子使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU) 图谱。使用软件 MEGA 11.0 (Tamura et al. 2021) 计算 3 种巢鼠线粒体基因组各区域的遗传距离。

1.5 系统发育分析

从 GenBank 下载 3 种巢鼠的线粒体基因组全序列，以大足鼠 (*Rattus nitidus*, KX058347)

为外群分别构建最大似然系统发生树和贝叶斯系统发生树。

使用软件 SnapGene 6.0.2 读取序列的 GenBank 文件后，根据序列的注释信息将序列剪切为 13 个蛋白质编码基因 (protein-coding genes, PCGs) 的串联序列，剪切后的序列保存于同一个文本文件中，并对每条序列命名，另存为一个 Fasta 文件，使用软件 MEGA 11.0 的 Clustal W 插件进行序列比对，将比对后的序列分别保存为 Meg 文件和 Nex 文件。

最大似然法系统发生树构建：使用软件 MEGA 11.0 读取 Meg 文件，确定最佳建树模型并构建最大似然系统发生树，建树模型设置为 GTR + G + I，重复次数 1 000。

贝叶斯系统发生树构建：使用软件 MrModeltest2 v2.4 (Nylander 2004) 读取 Nex 文件，确定替换模型参数 (Lset)，nst = 6，rates = invgamma。确定先验设置 (Prset)，statefreqpr = Dirichlet (1, 1, 1, 1)。使用软件 MrBayes v3.2.7 (Huelsenbeck et al. 2001) 构建贝叶斯系统发生树，其 MCMC 参数设置为 ngen = 2 000 000，samplefreq = 100，nchains = 4，burnin = 5 000。

2 结果

2.1 线粒体基因组结构

巢鼠、红耳巢鼠和川西巢鼠的线粒体基因组测序并注释后已上传至 GenBank，序列号分别为 PP503064、PQ568878 和 PQ526796，其序列长度相似，为 16 239 ~ 16 240 bp。3 种巢鼠线粒体基因组各基因及非编码区的排列顺序一致，均包含 22 个 tRNA 编码基因、13 个蛋白质编码基因、2 个 rRNA 编码基因、1 个 L 链复制起点 (O_L) 以及 1 个控制区 (D-loop)。

2.2 密码子使用情况

3 种巢鼠线粒体基因组中 13 个蛋白质编码基因的相对同义密码子使用度和氨基酸占比见图 1。3 种巢鼠线粒体 PCGs 编码的各氨基酸比例占比情况相似。占比最高的氨基酸均为亮氨酸 Leu1，由于亮氨酸 Leu1 和亮氨酸 Leu2、丝

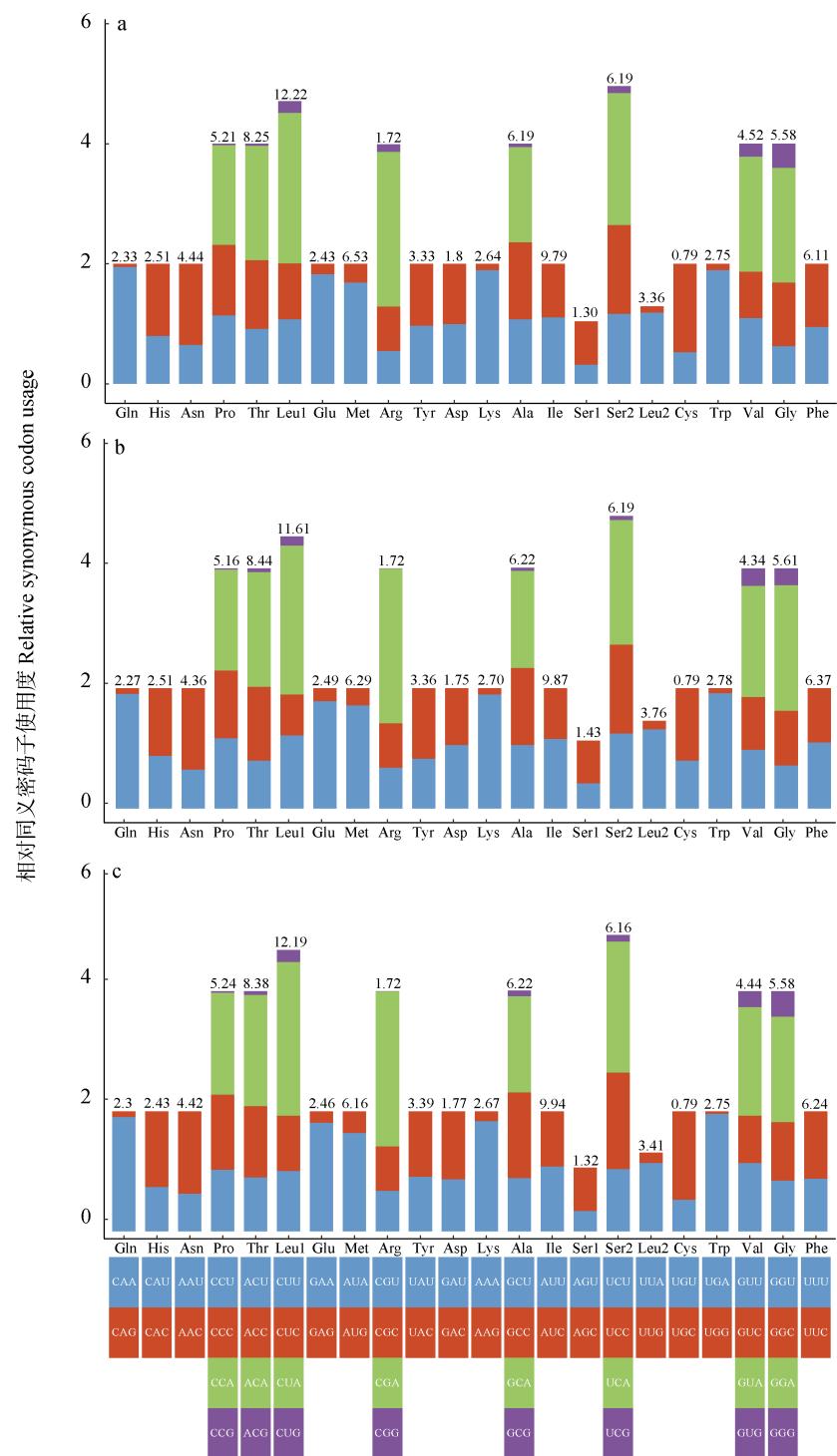


图 1 3 种巢鼠的相对同义密码子使用度图谱

Fig. 1 Relative synonymous codon usage (RSCU) spectra of three *Micromys* species

a. 巢鼠; b. 红耳巢鼠; c. 川西巢鼠。各颜色代表氨基酸不同的同义密码子, 柱形上方的数据是各个氨基酸占总氨基酸的百分比 (%).

a. *Micromys minutus*; b. *M. erythrotis*; c. *M. pygmaeus*. Different colors correspond to synonymous codons of various amino acids. The value above each bar represents the percentage of each amino acid relative to the total amino acid count (%).

氨酸 Ser1 和丝氨酸 Ser2 都由两种含有不同反密码子的 tRNA 转运，其前两位密码子不同，故分开讨论，其次为异亮氨酸 Ile。占比最低的氨基酸为半胱氨酸 Cys，其次为丝氨酸 Ser1。计算并对比各氨基酸的相对同义密码子使用度（relative synonymous codon usage, RSCU）后，发现 3 种巢鼠除了苯丙氨酸 Phe 和天冬氨酸 Asp 的各个氨基酸最偏向使用的密码子都相同，分别为亮氨酸 Leu2 (UUA)、亮氨酸 Leu1 (CUA)、异亮氨酸 Ile (AUU)、甲硫氨酸 Met (AUA)、缬氨酸 Val (GUA)、丝氨酸 Ser1 (UCA)、脯氨酸 Pro (CCA)、苏氨酸 Thr (ACA)、丙氨酸 Ala (GCA)、酪氨酸 Tyr (UAC)、组氨酸 His (CAC)、谷氨酰胺 Gln (CAA)、天冬酰胺 Asn (AAC)、赖氨酸 Lys (AAA)、谷氨酸 Glu (GAA)、半胱氨酸 Cys (UGC)、色氨酸 Trp (UGA)、精氨酸 Arg (CGA)、丝氨酸 Ser2 (AGC) 和甘氨酸 Gly (GGA)。巢鼠、红耳巢鼠和川西巢鼠苯丙氨酸 Phe 最偏向使用的密码子分别为 UUC, UUU 和 UUC，天冬氨酸 Asp 的则分别为 GAU/GAC（两者 RSCU 都等于 1，故巢鼠的天冬氨酸 Asp 有两个最偏向使用的密码子）、GAU 和 GAC。红耳巢鼠和川西巢鼠的精氨酸 Arg 未使用密码子 CGG。3 种巢鼠的密码子更倾向以 A/U 结尾。

2.3 tRNA 二级结构

3 种巢鼠线粒体的 22 个 tRNA 基因可运载 20 种氨基酸，包括 2 个 *trnL* (*trnL1*、*trnL2*) 和 2 个 *trnS* (*trnS1*、*trnS2*)。其各自对应的 tRNA 二级结构相似，20 个 tRNA 的二级结构为典型的三叶草结构，*trnK* 和 *trnS1* 由于缺少 D 环和二氢尿嘧啶臂无法折叠为三叶草结构。3 种巢鼠 tRNA 二级结构中出现的错配均为 U-G 错配，氨基酸接受臂、TΨC 臂、反义密码子臂和二氢尿嘧啶臂均出现错配现象。

2.4 线粒体基因组遗传距离

3 种巢鼠线粒体基因组各区域的遗传距离见表 1，各区域均为川西巢鼠与巢鼠的遗传距

离最小。13 个蛋白质编码基因的遗传距离最大，表明其序列保守性最低，与之相反，22 个 tRNA 基因的保守性最高。

表 1 基于线粒体基因组各部分的三种巢鼠间遗传距离

Table 1 Genetic distance among three *Micromys* based on different parts of mitochondrial genome

区域 Region	物种 Species	巢鼠 <i>Micromys</i> <i>minutus</i>	红耳巢鼠 <i>M. erythrotis</i>
全序列	巢鼠 <i>Micromys minutus</i>		
Complete sequence	红耳巢鼠 <i>M. erythrotis</i>	0.115	
	川西巢鼠 <i>M. pygmaeus</i>	0.088	0.114
	巢鼠 <i>M. minutus</i>		
PCGs	红耳巢鼠 <i>M. erythrotis</i>	0.139	
	川西巢鼠 <i>M. pygmaeus</i>	0.105	0.139
	巢鼠 <i>M. minutus</i>		
rRNAs	红耳巢鼠 <i>M. erythrotis</i>	0.056	
	川西巢鼠 <i>M. pygmaeus</i>	0.042	0.053
	巢鼠 <i>M. minutus</i>		
tRNAs	红耳巢鼠 <i>M. erythrotis</i>	0.052	
	川西巢鼠 <i>M. pygmaeus</i>	0.037	0.043
	巢鼠 <i>M. minutus</i>		
D-loop	红耳巢鼠 <i>M. erythrotis</i>	0.106	
	川西巢鼠 <i>M. pygmaeus</i>	0.096	0.113

2.5 系统发育关系

基于 13 个 PCGs 串联序列构建了最大似然系统发生树和贝叶斯系统发生树（图 2）。两种系统发生树显示的系统发育关系一致，巢鼠与川西巢鼠在一个分支（支持度 100%），显示巢鼠与川西巢鼠的系统发育关系更近，红耳巢鼠与巢鼠、川西巢鼠的系统发育关系较远。

3 讨论

系统发生树显示，巢鼠与川西巢鼠的亲缘关系最近，红耳巢鼠与巢鼠、川西巢鼠的亲缘关系均较远，符合刘铸等（2023）利用核基因对 3 种巢鼠构建系统发育树所揭示的三者间系统发育关系。

在密码子的使用方面，巢鼠与川西巢鼠间的差异相较于巢鼠与红耳巢鼠间的更小。红耳

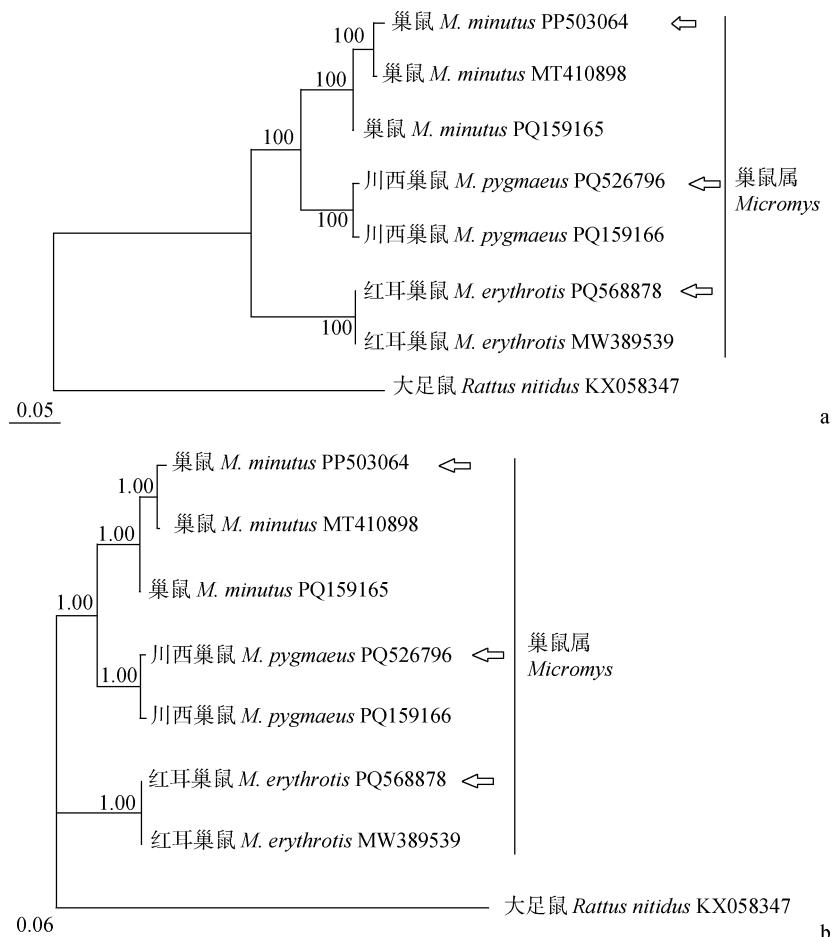


图2 基于13个PCGs串联序列构建的最大似然(a)和贝叶斯(b)系统发生树

Fig. 2 Maximum likelihood (a) and Bayesian (b) phylogenetic trees constructed on the basis of 13 tandem PCGs

箭头为本研究上传的序列，各支上的数字表示自展值支持率(a)及贝叶斯后验概率(b)，标尺表示分支长度。

Arrows represent the sequences uploaded in this study. The number on each branch represents the bootstrap value (a) and Bayesian posterior probability (b). The scale bar represents branch length.

巢鼠与巢鼠及川西巢鼠间的差异均较大。例如，红耳巢鼠nad6的终止密码子和其他2种巢鼠不同，其苯丙氨酸Phe、精氨酸Asp最偏向使用的密码子也与其他2种巢鼠不同。3种巢鼠的密码子更倾向以A/U结尾，对整个线粒体基因组的AT偏好性起着一定作用(Wang et al. 2019)。此外，巢鼠与川西巢鼠OL的序列以及茎环二级结构一致，红耳巢鼠则存在区别。

参 考 文 献

Abramov A V, Meschersky I G, Rozhnov V V. 2009. On the

taxonomic status of the harvest mouse *Micromys minutus* (Rodentia: Muridae) from Vietnam. Zootaxa, 2199(1): 58–68.

Bernt M, Donath A, Jühling F, et al. 2013. MITOS: Improved *de novo* metazoan mitochondrial genome annotation. Molecular Phylogenetics and Evolution, 69(2): 313–319.

Cai H, Wang Q Q, Zhao X X, et al. 2021. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Micromys erythrotis* from China and its phylogenetic analysis. Mitochondrial DNA Part B, 6(5): 1617–1620.

Chen Z Z, Pei X X, Song J L, et al. 2023. Systematics and evolutionary history of the genus *Micromys* (Mammalia:

附录1 PCR引物序列	
Appendix 1 PCR primer sequences	
引物 Primer	序列 Sequence (5' - 3')
CS1-1	AAAGCAAAGCACTGAAAATGC
CS1-2	AGGTAGCTCGTTGGTTTCG
CS2-1	TACCGCAAGGAAAGATGAAA
CS2-2	TAGGGTAACTTGGTCCGTTGA
CS3-1	AATTCTGGTTGGGTGACCTC
CS3-2	GTGTAATGGGTAGCACGGAGAA
CS4-1	AGCCCTATGTATATGACACGT
CS4-2	GAGAAGTAGATTGAAGGCCAGT
CS5-1	ACCCAAGCAACCGCCTCCAT
CS5-2	AGCTCCTGCTTCTACTATGGAT
CS6-1	GGAAACTGACTTGTCCATTAA
CS6-2	ACCTAGGGCTCATAGTATAGC
CS7-1	CGAGCCTACTTACATCTGC
CS7-2	AAGGTTAACGCTCTAACGCTTC
CS8-1	ACAGTAACCTCAAATCGTCCA
CS8-2	TGGAGCCATAAATTCCATCTGA
CS9-1	TACGTCCGTCCTATTAGCCTC
CS9-2	GGGATCGGAATATTAAGTTCC
CS10-1	CAAAAAGGACTAGAACAGA
CS10-2	GACTAGGGCTATRTGGCTTAC (R = G or A)
CS11-1	GCCTAACAAATGTGAATATAG
CS11-2	ATCATCAACCAATAAGGAGGAA
CS11-3	TGTCCACACACATAGCCTAC
CS11-4	GTTAGCAGTTCTCGCTTCT
CS12-1	TTCTCTTCATGATATACACTC
CS12-2	TTAWTAGGGCTCAGGCGTT (W = A or T)
CS13-1	CATCTGCCTTACTATCGGCA
CS13-2	AATGTTGATGGAGCTGGGAG
CS14-1	TATCATTATCGGCCAACTAGC
CS14-2	GATGCCTGATAAAGTTCCATG
CS15-1	CTACCATCCTCCGTGAAACC
CS15-2	CTACCTCCAATTAATTATAAGGC
L	GGACTTATGACATGAAAAATCATCGTT
H	GATTCCCCATTCTGGTTACAAGAC