

# 广西华珊瑚蛇线粒体基因组 全序列测定与分析

周圣博<sup>①②</sup> 孟佳瑶<sup>①</sup> 智歆然<sup>③</sup> 周滋航<sup>④</sup>

彭杰<sup>①</sup> 覃再林<sup>①</sup> 关萍<sup>①②\*</sup>

① 沈阳农业大学生物科学技术学院 沈阳 110866; ② 辽宁省全球变化与生物入侵重点实验室 沈阳 110866;

③ 沈阳农业大学动物科学与医学学院 沈阳 110866; ④ 沈阳农业大学园艺学院 沈阳 110866

**摘要:** 本研究对眼镜蛇科广西华珊瑚蛇 (*Sinomicrurus peinani*) 线粒体基因组序列进行测定与分析, 并探究其与近缘种的系统发育关系。结果表明, 广西华珊瑚蛇线粒体基因组是一条全长 19 477 bp 的环状 DNA, 基因组碱基构成为 A (33.4%)、T (28.1%)、C (26.6%) 和 G (11.9%)。共编码 38 个基因, 包含 2 个核糖体 RNA (rRNA) 基因、22 个转移 RNA (tRNA) 基因、13 个蛋白质编码基因及 1 个线粒体基因控制区 (D-loop)。13 个蛋白质编码基因均采用 AUG 作为起始密码子, UAA 和 UGA 作为终止密码子; 蛋白质编码基因编码频率较高的氨基酸分别为亮氨酸 (Leu)、异亮氨酸 (Ile)、苏氨酸 (Thr) 和丝氨酸 (Ser); 相对密码子使用度 (RSCU) 频率最高的 4 个密码子依次是 CGA、UGA、CUA 和 CCA。22 个 tRNA, 除 tRNA<sup>Ser</sup> (一臂两环) 外其他均可形成典型三叶草结构。基于眼镜蛇科线粒体基因组系统发育分析结果表明, 与广西华珊瑚蛇关系最密切的是中华珊瑚蛇 (*Sinomicrurus macclellandi*), 其次是孟加拉眼镜蛇 (*Naja kaouthia*) 与眼镜王蛇 (*Ophiophagus hannah*)。

**关键词:** 广西华珊瑚蛇; 线粒体基因组; 序列分析; 系统进化

**中图分类号:** Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2022) 04-481-12

## Mitochondrial Genome Sequencing of *Sinomicrurus peinani*

ZHOU Sheng-Bo<sup>①②</sup> MENG Jia-Yao<sup>①</sup> ZHI Xin-Ran<sup>③</sup> ZHOU Zi-Hang<sup>④</sup>

PENG Jie<sup>①</sup> QIN Zai-Lin<sup>①</sup> GUAN Ping<sup>①②\*</sup>

①College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866; ②Key Lab of Global

Changes and Biological Invasions, Liaoning Province, Shenyang 110866; ③College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang

Agricultural University, Shenyang 110866; ④Horticultural College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

**Abstract: [Objectives]** To determine the mitochondrial gene sequence of *Sinomicrurus peinani*, a new species of cobra family, and explore its phylogenetic relationship with related species. **[Methods]** We used the online software Feature Extract 1.2L server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/FeatureExtract>). The protein

**基金项目** 沈阳农业大学生创新创业训练计划项目 (2021);

\* 通讯作者, E-mail: 492508453@qq.com;

**第一作者介绍** 周圣博, 男, 本科生; 研究方向: 两栖爬行动物生态学与分类学; E-mail: shengbo122@163.com。

收稿日期: 2021-08-23, 修回日期: 2022-02-19 DOI: 10.13859/j.cjz.202204001

coding regions of mitochondrial genome of *S. peinani* were extracted, and the proportions of four bases and base deviation of different genes were calculated by bioedit (Donath 2012). The online software tRNAscan-SE 2.0 was used (<http://lowelab.ucsc.edu/Tnscan SE>) to predict the type and secondary structure of tRNA according to antisense codon and isotype model (Lowe et al. 1997), Conventional methods were used to analyze the base composition of triplet codon position, codon usage, the influence of base composition on codon preference and parity preference, and MEGA7.0 was used to construct phylogenetic tree. **[Results]** The results showed that the mitochondrial genome of *S. peinani* was a 19477 bp circular DNA molecule, and the genomic bases were A (33.4%), T (28.1%), C (26.6%) and G (11.9%), which encode 38 genes including 2 ribosomal RNA (rRNA) genes, 22 transfer RNA (tRNA) genes, 13 protein coding genes and 1 replication origin gene (D-loop). The 13 protein coding genes use AUG as the starting codon and UAA and UGA as the termination codon. The amino acids with high coding frequency of protein coding genes were Leu, Ile, Thr and Ser, respectively; The four codons with the highest frequency of Relative synonymous condon usage (RSCU) were CGA, UGA, CUA and CCA. All 22 tRNAs except tRNA<sup>Ser</sup> (with one arm and two rings) could form typical clover structure. **[Conclusion]** Phylogenetic analysis showed that *S. maccllelandi* was most closely related to the taxonomic status of *S. peinani*, followed by *Naja kaouthia* and *Ophiophagus hannah* (Fig. 2, 3, 6).

**Key words:** *Sinomicrurus peinani*; Mitochondrial genome; Sequence analysis; Systematic evolution

广西华珊瑚蛇 (*Sinomicrurus peinani*) 隶属于眼镜蛇科, 该科的分类和进化是本领域研究的热点问题。眼镜蛇科物种较多, 目前共划分为 24 属, 但种属划分尚存在较多争议, 尤其近年分子生物学手段的应用使许多类群得到了重新厘定。华珊瑚蛇属 (*Sinomicrurus*) 即属上述情况, 华珊瑚蛇属与丽纹蛇属 (*Calliophis*) 原为同一类群, 即原丽纹蛇属 (*Calliophis*), 研究者对原丽纹蛇属中亚洲物种与美洲物种的头部特征、半阴茎结构和下颌肌肉组织等形态学特征进行比较, 并应用细胞色素 *b* 基因 (Cyt *b*) 进行了分子系统发育分析, 将分布于亚洲的珊瑚蛇分出, 另立为一新属——华珊瑚蛇属, 其建立之初包括 5 个物种 (Slowinski et al. 2001), 由于近年在我国记录到了 1 新种广西华珊瑚蛇 (Liu et al. 2020), 使物种数增加至 6 个。华珊瑚蛇属进化地位及系统发育的澄清对于深入了解眼镜蛇科的下属关系具有较为重要的意义。广西华珊瑚蛇为华珊瑚蛇属最新记录的物种, 2020 年 3 月由我国学者在广西壮族自治区梧州市苍梧县发现并命名 (Liu et al. 2020), 后

于 2021 年在广东肇庆地区发现了新的分布记录 (彭丽芳等 2021)。该物种的发现为我国华珊瑚蛇属蛇类的分布及系统进化研究提供了较新的方向。

近年随基因组测序技术的快速发展, 线粒体全基因组测序及系统进化分析已成为辅助传统分类方法最有效的手段, 并在深入了解物种进化与遗传多样性领域取得了显著的成果 (Schuster 2008), 目前仅华珊瑚属的中华珊瑚蛇 (*S. maccllelandi*) 完成了线粒体全基因组测序 (Yao et al. 2020)。为保证眼镜蛇科华珊瑚蛇属系统进化及分类修订的顺利开展, 本研究完成了广西华珊瑚蛇的线粒体全基因组测序并对主要结构信息进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

广西华珊瑚蛇 (1 只) 于 2021 年 3 月 27 日采集自广西梧州市苍武县 (23°39'00" N, 111°34'12" E), 经鉴定为雌性成体 (采集号: SYAUA21015)。采用模拟野外生境法饲养并用

于后续实验。

### 1.2 线粒体 DNA 的提取、序列测定及注释

使用灭菌解剖器具切取蛇尾部的肌肉 5.0 g 放入冻存管，置于液氮超低温保存备用。使用动物组织 DNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司，DP121221），参考动物组织 DNA 常规提取方法并结合试剂盒操作提示提取肌肉组织 DNA。

委托深圳市惠通生物科技有限公司对广西华珊瑚蛇线粒体全基因组进行测序。基于 Illumina Miseq 2500 平台（Illumina, San Diego, CA）进行双向测序，未能测通的序列采用克隆测序或重新设计引物再测序，补全序列适配器和低质量的 Reads 使用 NGSQC 工具包进行删除，共获取了 7.5 G 原始测序数据。对测序结果进行人工校对和拼接，将高质量的 Reads 用 IDBA-UD 进行从头组装，得到广西华珊瑚蛇线粒体基因组全序列。使用在线软件 MITOS Web Server (<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/index.py>) 对基因组进行注释（Donath et al. 2012），并将序列提交至 GenBank 数据库（序列号：MZ230594）。

### 1.3 线粒体基因组碱基组成分析

使用在线软件 Feature Extract 1.2L Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/FeatureExtract>) 提取广西华珊瑚蛇线粒体基因组的蛋白编码区、tRNA 与 rRNA 序列，使用 Bioedit 计算不同基因 4 种碱基比例和碱基偏斜（Donath et al. 2012）。AT 偏斜即 A 与 T 之差与 A 与 T 之和的比值。

### 1.4 tRNA 结构预测

使用在线软件 tRNAscan-SE 2.0 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE>) 根据反义密码子和 Isotype Model 两种方法预测 tRNA 的类型和二级结构（Lowe et al. 1997），无法直接预测的基因通过人工校正完成。

### 1.5 密码子使用偏性分析

应用 Pere 等（2008）的方法进行密码子使用度的分析。应用 CAIcal 在线服务器对线粒体

基因组中蛋白质编码基因的同义密码子使用相对频率（relative synonymous codon usage, RSCU）进行分析。

应用 Sueoka（1988）的方法进行中性绘图分析。以密码子第 3 位 GC 含量（GC3）为横坐标，以密码子第 2 位 GC 含量（GC2）和第 1 位 GC 含量（GC1）的平均值为纵坐标（标为 GC12）绘制二维散点图，分析三联体密码子 3 个位置碱基组成的相关性。

应用 Wright（1990）的方法进行 Nc-plot 绘图分析。以同义密码子第 3 位核苷酸的平均 GC 含量（GC3s）为横坐标，有效密码子数（ $N_c$ ）为纵坐标，作散点图，探讨碱基组成对密码子偏好性的影响。标准曲线反映了在突变压力下的  $N_c$  和 GC3s 的函数关系。

理论有效密码子数（ $N_c$ ）值计算公式为：
$$N_c = 2 + N_{GC3s} + 29 / [N_{GC3s}^2 + (1 - N_{GC3s})^2]$$
，式中， $N_{GC3s}$  为同义密码子第 3 位核苷酸的平均 GC 含量。

应用 Sueoka（1999）的方法进行奇偶偏好分析。在计算第 3 位密码子核苷酸含量（A3s、T3s、C3s 和 G3s）基础上，分别计算 A3/（A3 + T3）与 G3/（G3 + C3）值，并以每个基因 A3/（A3 + T3）（A3 值占 A3 和 T3 之和的比例）值作为纵坐标，G3/（G3 + C3）（G3 值占 G3 与 C3 之和的比例）值作为横坐标，以平面散点图展示各基因碱基组成。中心点代表 C = G（C 和 G 含量相同）且 A = T（A 和 T 含量相同），由中心点向坐标点发出的矢量则表示倚倚程度和方向。

### 1.6 基因组微卫星序列分析

使用在线软件 IMEX (<http://43.227.129.132:8008/IMEX>) 提取广西华珊瑚蛇线粒体基因微卫星序列，并进行相对丰富度和密度的计算（Xia et al. 2001）。

### 1.7 系统发育分析

为研究广西华珊瑚蛇与近缘物种的关系，选取华珊瑚蛇属和眼镜蛇科其他属的 14 个代

表物种 (表 1), 用 Clustal X 进行多重序列比对, 采用 MEGA7.0 构建系统发育树 (Peng et al. 2017), 并分析物种之间的进化关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 线粒体基因组结构与特征

广西华珊瑚蛇线粒体基因组为一条全长 19 477 bp 的环状 DNA 分子, 由 2 个 rRNA 基因、22 个 tRNA 基因、13 个蛋白质编码基因、1 个 D-loop 和 2 个非编码控制区组成。ND6 基因和 8 个 tRNA 基因编码在 L 链上, 其余 29 个基因编码在 H 链上。2 个 rRNA 基因 (rrnL 和 rrnS) 位于 ND1 和 tRNF-GAA 之间, 并由 tRNV-TAC 分隔。22 个 tRNA 基因可携带 19 种不同氨基酸。13 个蛋白编码基因包含 7 个 NADH 脱氢酶亚基 (ND1 ~ ND6 和 ND4L)、3 个细胞色素基因 (COX1 ~ COX3)、2 个 ATP 合成酶基因 (ATP6 和 ATP8) 和 1 个细胞色素 *b* 基因 (Cyt *b*)。2 个非编码控制区域长度分别为 1 027 bp 和 2 347 bp (图 1, 表 2)。

### 2.2 线粒体基因组碱基组成

广西华珊瑚蛇线粒体全基因组碱基含量分别为, A 33.4%、G 28.1%、C 26.6%、T 11.9%, GC 总含量为 38.5%, AT 总含量为 61.5%, 具有显著的 A + T 偏向性。基因组中不同类型的基因均表现出对 A + T 碱基的显著偏向性。

AT 偏斜为负值的基因较少且均集中于蛋白编码基因 (ATP8、ND6、CYTB 和 COX1), 全基因组及其他各类基因的 AT 偏斜均为正值。GC 偏斜规律为, tRNA、ATP8 和 ND6 的 GC 偏斜为正值, 其余均为负值 (表 3)。

### 2.3 线粒体基因组 tRNA 基因

广西华珊瑚蛇基因组包括 22 个 tRNA 基因, 其二级结构除 tRNA<sup>Ser</sup>-GCT 外均包含氨基酸受体臂、双氢尿嘧啶臂 (DHU 臂) 和反密码子臂及 TΨC 臂, 可形成典型的三叶草结构。所有 tRNA 均无可变臂 (无可变环)。tRNA<sup>Ser</sup>-GCT 长度为 53 bp, 其余基因长度均在 61 ~ 73 bp 之间, 长度均匀。本次研究所涉及的 22 个 tRNA 中共出现 23 处碱基错配, 均属于 G-U 错配。

表 1 广西华珊瑚蛇及近缘物种基本信息

Table 1 Basic information on the *Sinomicrurus peinani* and its related species

属 Genus	物种 Species	NCBI 序列号 NCBI Serial number
眼镜蛇属 <i>Naja</i>	中华眼镜蛇 <i>N. atra</i>	EU921898
	印度眼镜蛇 <i>N. naja</i>	DQ343648
	孟加拉眼镜蛇 <i>N. kaouthia</i>	LC431744
眼镜王蛇属 <i>Ophiophagus</i>	眼镜王蛇 <i>O. hannah</i>	EU921899
华珊瑚蛇属 <i>Sinomicrurus</i>	广西华珊瑚蛇 <i>S. peinani</i>	MZ230594
	中华珊瑚蛇 <i>S. maclellandi</i>	MT547176
环蛇属 <i>Bungarus</i>	金环蛇 <i>B. fasciatus</i>	EU579523
	银环蛇 <i>B. multicinctus</i>	EU579522
龟头海蛇属 <i>Emydocephalus</i>	龟头海蛇 <i>E. ijimae</i>	MK775531
海蛇属 <i>Hydrophis</i>	黄海蛇 <i>H. curtus</i>	MT712129
	半环扁尾海蛇 <i>L. semifasciata</i>	KY496325
扁尾海蛇属 <i>Laticauda</i>	黄唇青斑海蛇 <i>L. colubrina</i>	KY496324
	黑唇青斑海蛇 <i>L. laticaudata</i>	KY496323
亚洲蝮属 <i>Gloydius</i>	短尾蝮 <i>G. blomhoffi</i> *	EU913477

\*为外群。\* This symbol represents an outgroup.



表 2 广西华珊瑚蛇线粒体基因组成及特征

Table 2 Mitochondrial gene composition of *Sinomicrurus peinani*

基因名称 Gene name	起始位置 Starting position	终止位置 End position	基因长度 (bp) Gene length	编码链 Coding chain	基因名称 Gene name	起始位置 Starting position	终止位置 End position	基因长度 (bp) Gene length	编码链 Coding chain
trnF-GAA	1	62	62	H	trnK-TTT	10 938	11 001	64	H
rrnS	63	988	926	H	ATP8	11 002	11 166	165	H
trnV-TAC	989	1 054	66	H	ATP6	11 157	11 837	681	H
rrnL	1 055	2 533	1 479	H	COX3	11 837	12 620	784	H
ND1	2 534	3 488	955	H	trnG-TCC	12 621	12 681	61	H
trnI-GAT	3 489	3 554	66	H	ND3	12 682	13 024	343	H
trnL-TAA	4 581	4 653	72	H	trnR-TCG	13 025	13 088	64	H
trnQ-TTG	4 654	4 724	71	L	ND4L	13 090	13 380	291	H
trnM-CAT	4 725	4 786	62	H	ND4	13 380	14 715	1 336	H
ND2	4 808	5 816	1 009	H	trnH-GTG	14 717	14 780	64	H
trnW-TCA	5 817	5 878	62	H	trnS-GCT	14 781	14 838	53	H
trnA-TGC	5 881	5 946	66	L	trnL-TAG	14 836	14 906	71	H
trnN-GTT	5 947	6 019	73	L	ND5	14 908	16 683	1 776	H
trnC-GCA	6 057	6 118	62	L	ND6	16 679	17 179	501	L
trnY-GTA	8 465	8 527	63	L	trnE-TTC	17 180	17 243	64	L
COX1	8 529	10 130	1 602	H	CYTB	17 244	18 357	1 114	H
trnS-TGA	10 121	10 188	68	L	trnT-TGT	18 358	18 422	65	H
trnD-GTC	10 189	10 251	63	H	trnP-TGG	18 423	18 483	61	L
COX2	10 253	10 937	685	H	D-loop	18 484	19 477	994	H

表 3 广西华珊瑚蛇线粒体基因组核苷酸组成

Table 3 Mitochondrial nucleotide composition of *Sinomicrurus Peinani*

序列 Sequence	长度 (bp) Length	A (%)	T (%)	C (%)	G (%)	A + T (%)	G + C (%)	AT 偏斜 AT skew	GC 偏斜 GC skew	
全基因组 Whole genome	19 477	33.39	28.11	26.59	11.91	61.50	38.50	0.086	- 0.381	
tRNA	1 429	31.21	28.27	20.01	20.50	59.48	40.52	0.049	0.012	
rRNA	2 405	36.51	21.33	25.32	16.84	57.84	42.16	0.262	- 0.201	
ATP8	165	23.64	43.64	3.64	29.09	67.27	32.73	- 0.297	0.778	
ND4L	291	34.71	30.93	24.40	9.97	65.64	34.36	0.058	- 0.420	
ND3	343	33.24	28.28	26.53	11.95	61.52	38.48	0.081	- 0.379	
ND6	501	15.37	47.50	7.78	29.34	62.87	37.13	- 0.511	0.581	
ATP6	681	34.95	27.61	28.05	9.40	62.56	37.44	0.112	- 0.498	
蛋白质 编码基因 Protein coding gene	COX2	685	35.47	23.94	26.28	14.31	59.42	40.58	0.194	- 0.295
COX3	784	29.85	27.93	26.66	15.56	57.78	42.22	0.033	- 0.263	
ND1	955	31.41	27.85	29.84	10.99	59.16	40.84	0.062	- 0.462	
ND2	1 009	39.25	24.98	28.34	7.43	64.22	35.78	0.222	- 0.584	
CYTB	1 114	30.79	31.15	27.83	10.23	61.94	38.06	- 0.006	- 0.462	
ND4	1 336	32.26	31.14	27.40	9.21	63.40	36.60	0.018	- 0.497	
COX1	1 602	28.65	30.09	26.40	14.86	58.74	41.26	- 0.024	- 0.280	
ND5	1 776	35.81	27.87	26.80	9.52	63.68	36.32	0.125	- 0.476	

表 4 广西华珊瑚蛇 tRNA 结构特征

Table 4 TRNA structure features of *Sinomicrurus peinani*

结构 Structure	长度 Length (bp)	tRNA 名称 tRNA name
氨基酸受体臂 Amino acid receptor arm	6	tRNA <sup>Asp</sup> -GTC、tRNA <sup>Arg</sup> -TCG、tRNA <sup>His</sup> -GTG
	7	tRNA <sup>Phe</sup> -GAA、tRNA <sup>Val</sup> -TAC、tRNA <sup>Ile</sup> -GAT、tRNA <sup>Leu</sup> -TAA、tRNA <sup>Leu</sup> -TAG、tRNA <sup>Met</sup> -CAT、tRNA <sup>Tyr</sup> -TCA、tRNA <sup>Lys</sup> -TTT、tRNA <sup>Thr</sup> -TGT、tRNA <sup>Gly</sup> -TCC、tRNA <sup>Pro</sup> -TGG、tRNA <sup>Glu</sup> -TTC、tRNA <sup>Ser</sup> -TGA、tRNA <sup>Tyr</sup> -GTA、tRNA <sup>Cys</sup> -GCA、tRNA <sup>Asn</sup> -GTT、tRNA <sup>Aln</sup> -TGC、tRNA <sup>Gln</sup> -TTG
反密码子臂 Anti codon arm	3	tRNA <sup>Leu</sup> -TAA
	4	tRNA <sup>Ile</sup> -GAT、tRNA <sup>Leu</sup> -TAG、tRNA <sup>Tyr</sup> -TCA、tRNA <sup>Asp</sup> -GTC、tRNA <sup>Lys</sup> -TTT、tRNA <sup>Thr</sup> -TGT、tRNA <sup>Glu</sup> -TTC
	5	tRNA <sup>Phe</sup> -GAA、tRNA <sup>Val</sup> -TAC、tRNA <sup>Met</sup> -CAT、tRNA <sup>Gly</sup> -TCC、tRNA <sup>Arg</sup> -TCG、tRNA <sup>His</sup> -GTG、tRNA <sup>Pro</sup> -TGG、tRNA <sup>Ser</sup> -TGA、tRNA <sup>Tyr</sup> -GTA、tRNA <sup>Cys</sup> -GCA、tRNA <sup>Asn</sup> -GTT、tRNA <sup>Aln</sup> -TGC、tRNA <sup>Gln</sup> -TTG
反密码子环 Anti codon ring	7	tRNA <sup>Phe</sup> -GAA、tRNA <sup>Val</sup> -TAC、tRNA <sup>Leu</sup> -TAA、tRNA <sup>Leu</sup> -TAG、tRNA <sup>Met</sup> -CAT、tRNA <sup>Tyr</sup> -TCA、tRNA <sup>Lys</sup> -TTT、tRNA <sup>Thr</sup> -TGT、tRNA <sup>Gly</sup> -TCC、tRNA <sup>Arg</sup> -TCG、tRNA <sup>His</sup> -GTG、tRNA <sup>Pro</sup> -TGG、tRNA <sup>Glu</sup> -TTC、tRNA <sup>Ser</sup> -TGA、tRNA <sup>Tyr</sup> -GTA、tRNA <sup>Cys</sup> -GCA、tRNA <sup>Asn</sup> -GTT、tRNA <sup>Aln</sup> -TGC、tRNA <sup>Gln</sup> -TTG
	9	tRNA <sup>Ile</sup> -GAT、tRNA <sup>Asp</sup> -GTC
TΨC 环 TΨC ring	2	tRNA <sup>Pro</sup> -TGG
	3	tRNA <sup>Asp</sup> -GTC
	4	tRNA <sup>Met</sup> -GAT、tRNA <sup>Thr</sup> -TGT、tRNA <sup>Gly</sup> -TCC、tRNA <sup>His</sup> -GTG
	5	tRNA <sup>Phe</sup> -GAA、tRNA <sup>Val</sup> -TAC、tRNA <sup>Lys</sup> -TTT、tRNA <sup>Arg</sup> -TCG、tRNA <sup>Tyr</sup> -GTA、tRNA <sup>Aln</sup> -TGC
	6	tRNA <sup>Tyr</sup> -TCA、tRNA <sup>Glu</sup> -TTC
	7	tRNA <sup>Leu</sup> -TAA、tRNA <sup>Leu</sup> -TAG、tRNA <sup>Ser</sup> -TGA、tRNA <sup>Tyr</sup> -GTA、tRNA <sup>Asn</sup> -GTT、tRNA <sup>Gln</sup> -TTG
	9	tRNA <sup>Ile</sup> -GAT

碱基的使用频率理论值相等, 即  $A = T$ 、 $C = G$ 。A 和 T 以及 G 和 C 的使用频率不均衡性, 表明密码子的使用偏好性由突变和选择等因素共同影响。

蛋白编码区共包含 3 745 个密码子, 对 A 和 U 碱基具有显著的偏向性, 使用次数最高的 4 个密码子依次是 CUA (Leu)、AUA (Ile)、ACA (Thr) 和 AUU (Ile), 使用次数依次为 252、230、194 和 169。蛋白质编码基因编码频率较高的氨基酸分别为 Leu (596)、Ile (555)、Thr (409) 和 Ser (267)。RSCU 频率最高的 4 个密码子依次是 CGA (3.33)、UGA (2.69)、CUA (2.54) 和 CCA (2.42) (图 4)。

### 2.5 线粒体基因组微卫星序列

广西华珊瑚蛇线粒体微卫星序列共 65 个, 其中编码蛋白基因 (protein coding gene, PCG) 40 个, 间隔区 (intergenic spacer region, IGS) 15 个。微卫星序列总长度为 752 bp, 约占基因

组全长的 3.9%。计算得到的相对丰度和相对密度分别为 3.34 和 38.61。IGS 和 PCG 及全基因组中各种类型核苷酸 (单核苷酸至六核苷酸) 的数量见图 5。

### 2.6 广西华珊瑚蛇与近缘种系统发育分析

基于线粒体基因组构建的广西华珊瑚蛇与近缘物种系统发育关系, 13 种蛇被划分为 4 个主要支系, 眼镜蛇属 (*Naja*) 的 3 个物种和眼镜王蛇 (*O. hannah*) 聚为一支, 广西华珊瑚蛇与中华珊瑚蛇聚为一支 (同源性达 87.03%), 分支①和②聚为一支后与分支③构成一个支系, 但自展值仅为 43。分支④内属内及属间自展值均为 100 (图 6)。

## 3 讨论

眼镜蛇科是蛇亚目第二大科, 分属及物种均较多, 近年分子生物学方法的应用使较多类群的分类地位和进化关系得以深入研究, 线粒

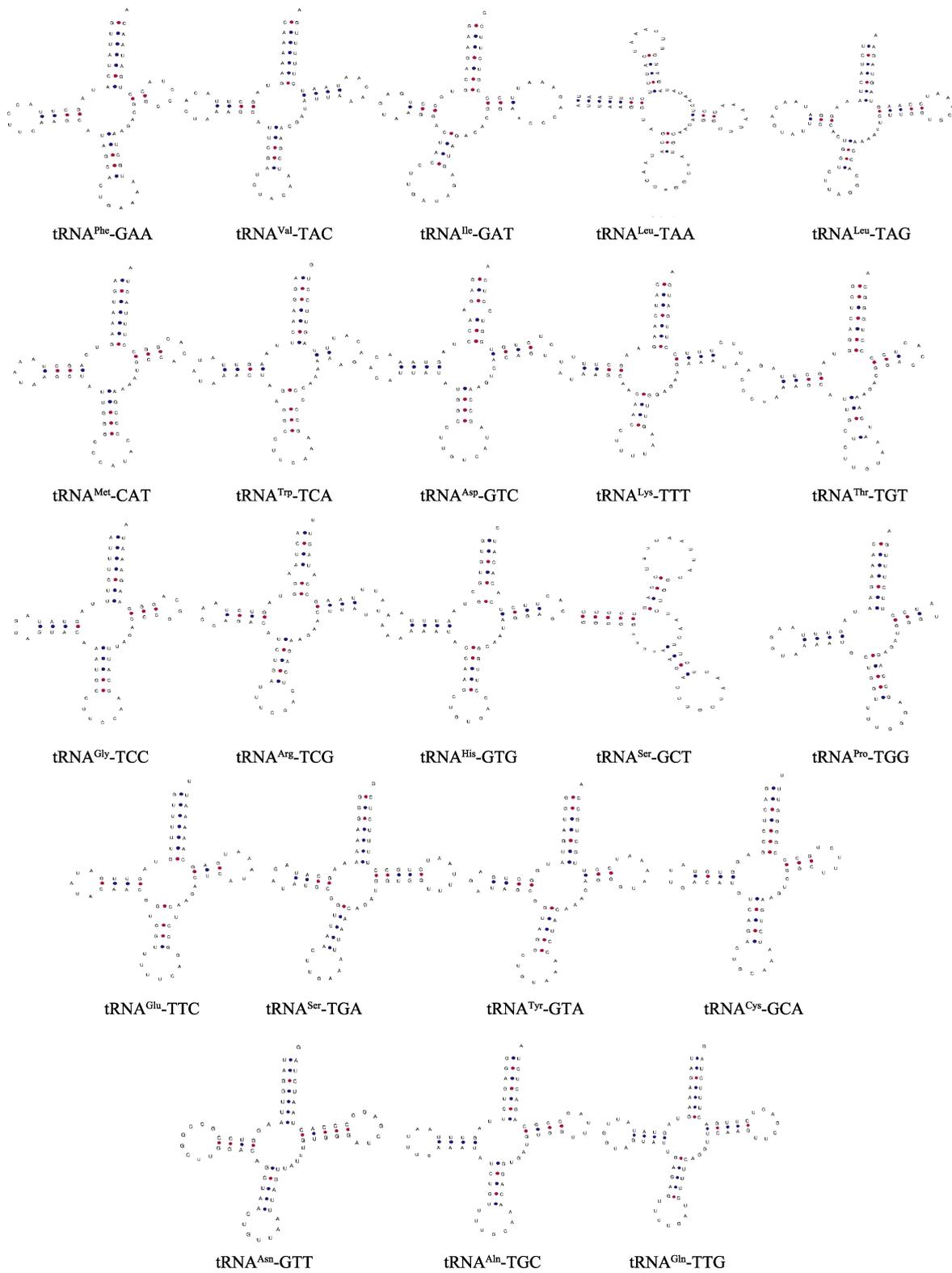


图 2 广西华珊瑚蛇线粒体基因组 tRNA 二级结构预测图

Fig. 2 Predicted secondary structures of tRNA genes in mitochondrial genome of *Sinomicrurus peinani*

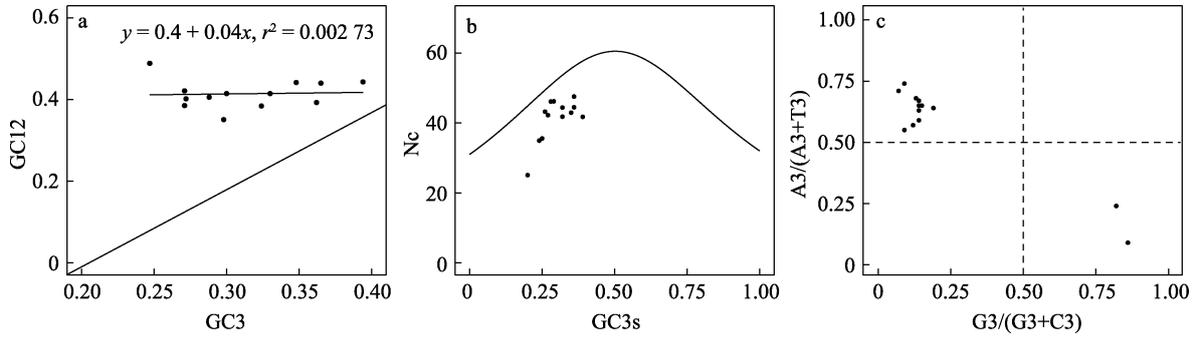


图 3 广西华珊瑚蛇密码子使用偏性分析

Fig. 3 Codon usage bias analysis of *Sinomicrurus peinani*

a. 碱基组成对密码子偏性影响的中性绘图分析。横坐标 GC3. 密码子第 3 位碱基 GC 含量；纵坐标 GC12. 密码子第 1 位、第 2 位碱基 GC 平均含量。b. 基因的 Nc-plot 分析。横坐标 GC3s. 同义密码子第 3 位核苷酸的平均 GC 含量；纵坐标 Nc. 有效密码子数。c. 基因的 PR2-plot 分析。横坐标 G3/(G3 + C3). G3 值在 G3 和 C3 值的和中所占比例；纵坐标 A3/(A3+T3). A3 值在 A3 和 T3 值的和中所占比例。Neutrality plot analysis of the effect of base composition on codon bias. Abscissa GC3: GC content of base 3 of codon; Ordinate GC12: average GC content of codon 1 and codon 2 bases. b. Nc-plot analysis of genes. Abscissa GC3s: Represents the average GC content of nucleotide at position 3 of synonymous codon; Ordinate Nc: Indicates the number of effective codons. c. PR2-plot analysis of genes. Abscissa G3 / (G3 + C3): The proportion of G3 value in the sum of G3 and C3 values; Ordinate A3 / (A3 + T3): The proportion of A3 value in the sum of A3 and T3 values.

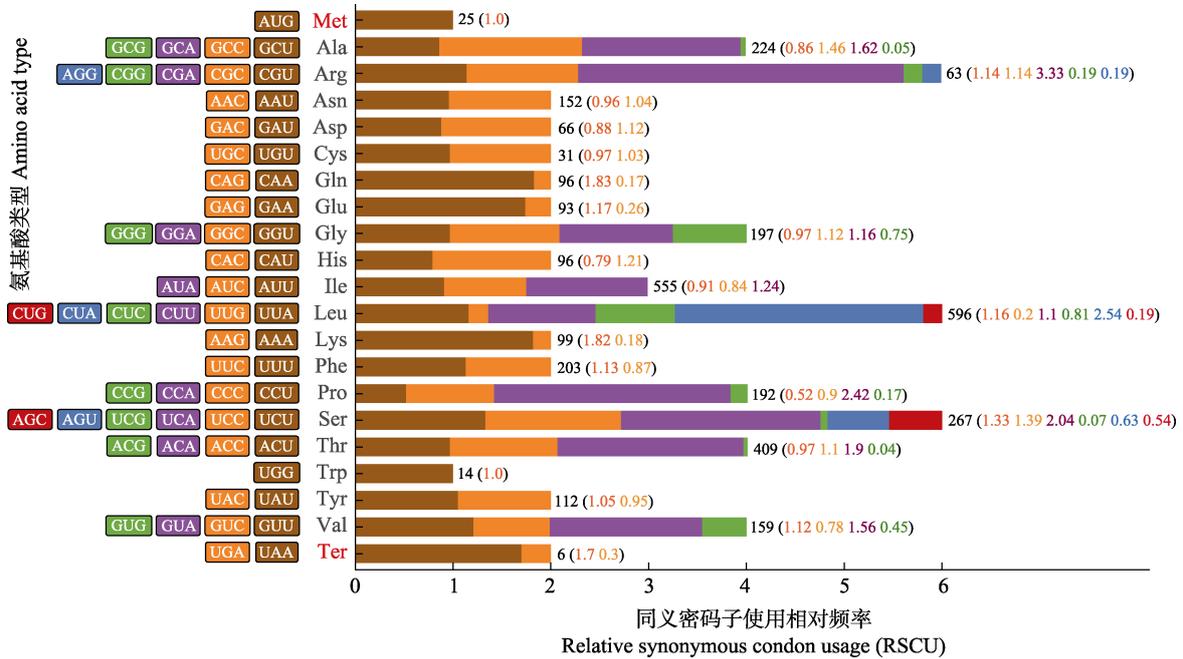


图 4 广西华珊瑚蛇线粒体基因组密码子使用情况

Fig. 4 Mitochondrial genome codon usage of *Sinomicrurus peinani*

每个氨基酸不同颜色的密码子柱长度和括号内数值均为同义密码子使用相对频率 (RSCU), 括号外数值为氨基酸数目。

The length of codon column with different colors of each amino acid and the value in the bracket are relative synonymous codon usage (RSCU), and the value outside the bracket is the number of amino acids.

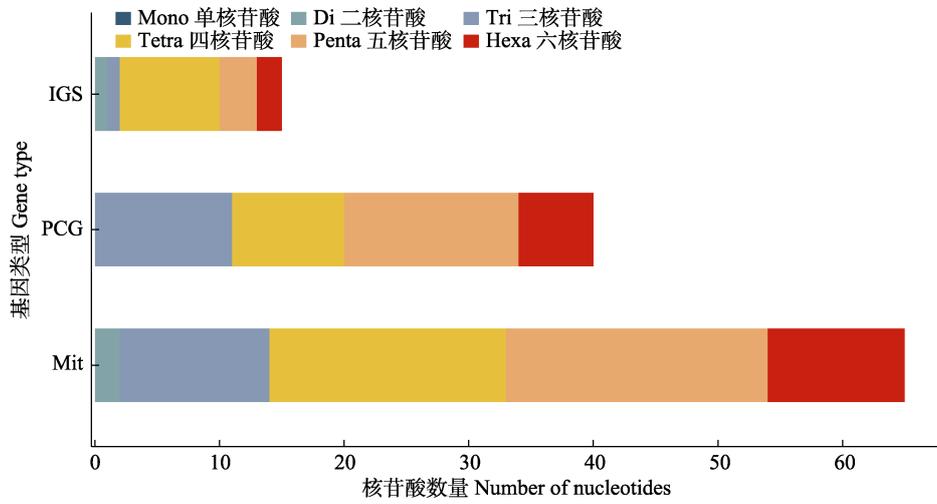


图 5 广西华珊瑚蛇线粒体微卫星序列组成

Fig. 5 Sequence composition of mitochondrial microsatellite of *Sinomicrurus peinani*

IGS. 间隔区; PCG. 编码蛋白基因; Mit. 线粒体全基因组

IGS. Intergenic spacer region; PCG. Protein coding gene; Mit. Mitochondrial genome

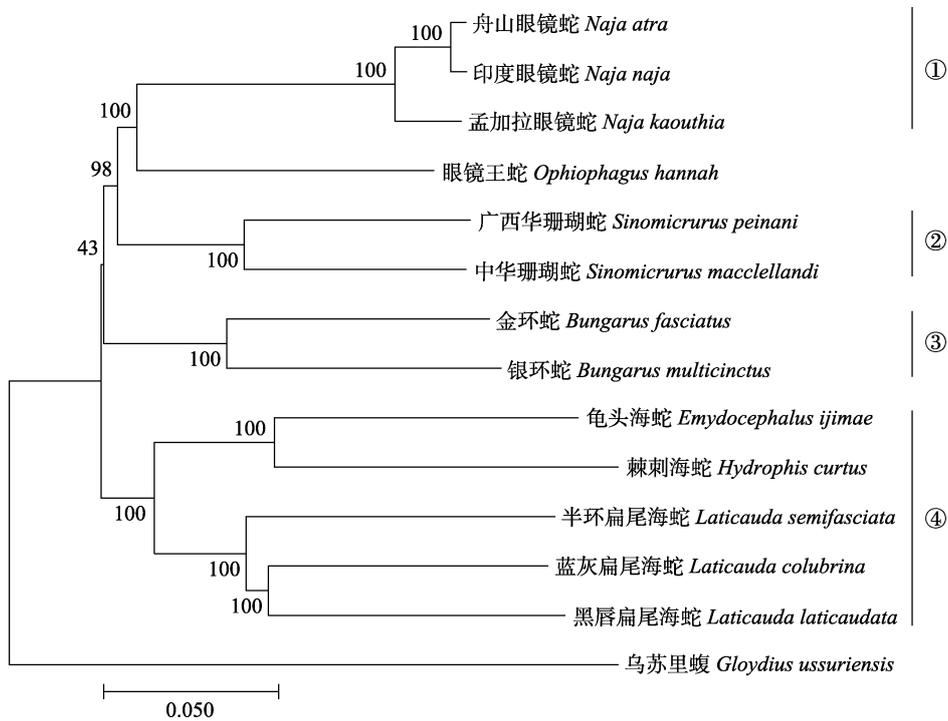


图 6 基于线粒体基因组全序列构建的系统进化树

Fig. 6 Molecular phylogenetic tree constructed based on mitochondrial genome by neighbor-joining method

结点数字. 自展值; 标尺. 进化分支长度的距离比例尺。

Node number. Bootstrap; Bar. Distance scale of evolutionary branch length.

体全基因组的测序和分析为进行这项工作的有效方法。线粒体基因的分子系统分析常用于物种的分类学修订，广西华珊瑚蛇新物种的确定即应用线粒体基因 *CO1* 进行了 5 个物种的系统分析 (Liu et al. 2020)。华珊瑚蛇属在眼镜蛇科中的地位十分重要，它们的科属关系及分布特征均表现出很大的特殊性：近年进行了较大的分类学修正，研究者将亚洲分布的物种从原丽纹蛇属中分出 (Slowinski et al. 2001)；华珊瑚蛇属属下物种很少且分布地域狭窄，目前报道的 6 个物种中有 5 种布于我国，1 种分布于日本，亚洲其他地区至今未见报道 (赵尔宓 2006, Liu et al. 2020)。对华珊瑚蛇属物种进行线粒体全基因组测序可进一步验证华珊瑚蛇属与丽纹蛇属的进化关系及分布规律。

本研究在完成了广西华珊瑚蛇线粒体全基因组测序的基础上，进行了基因组特征分析，并与近缘物种进行了进化关系分析。广西华珊瑚蛇线粒体全基因组表现出较高的进化保守性，线粒体全基因组特征与 Boore (1999) 和 Sorenson 等 (1999) 所报道的脊椎动物基因组特征基本保持一致。在基因长度、基因位置及碱基序列等方面与其他蛇类的相似性较高，仅少数基因表现出较小的差异性 (黄欣 2014)。碱基组成具有显著的 A + T 偏向性，根据 Weber 等 (2010) 的研究结果，A + T 偏斜与物种生活的地理位置及环境温度存在一定关联。钱立富 (2018) 对 6 种蝮蛇和 4 种链蛇进行了线粒体基因组特征分析，与本研究得出相似结论。广西华珊瑚蛇线粒体基因组不具有眼镜王蛇位于 CR 区 5'端的 tRNA-Ile 基因，表明这个基因存在种间特异性 (陈念等 2010)。

广西华珊瑚蛇与 13 种近缘种类进行的聚类分析与现有种属关系一致，系统树中出现自展值较低 (< 50) 的主要原因应为物种选择的跨度较大，两支系之间应存在较多的中间类群。2001 年 Slowinski 等主要依据细胞色素 *b* 基因的进化特征将原丽纹蛇属拆分为现丽纹蛇属和华珊瑚蛇属，从本研究基因相似度和系统树的

聚类特征中分析，广西华珊瑚蛇和中华珊瑚蛇基因相似度最高，进化关系最近，虽然本属没有其他测序物种可进行进一步比较分析，但可初步判断线粒体全基因组与细胞色素 *b* 基因 (Cyt *b*) 进化的一致性。利用较多物种线粒体基因组进行系统分析，一方面可对该结论进一步验证，另一方面线粒体基因组的演化速率快于核基因，可较好预测种群演化方向。但丽纹蛇属线粒体基因组测序及特征分析等未见报道，本研究将于后续工作中开展相关实验。

**封面动物** 广西华珊瑚蛇，朱滨清 2021 年 5 月 15 日摄于广西壮族自治区防城港市。

## 参 考 文 献

- Boore J L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, 27(8): 1767–1780.
- Donath A, Jühling F, Externbrink F, et al. 2012. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(2): 313–319.
- Lowe T M, Eddy S R. 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Research*, 25(5): 955–964.
- Liu Q, Yan J W, Hou S B, et al. 2020. A new species of the genus *Sinomicrourus* (Serpentes: Elapidae) from China and Vietnam. *Zoological Research*, 41(2): 194–198.
- Peng Y, Chen B, Li T J, et al. 2017. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Parapolybia crocea* (Hymenoptera: Vespidae). *Acta Entomologica Sinica*, 60(4): 464–474.
- Pere P B, Ignacio G B, Santiago G V, et al. 2008. CAIcal: a combined set of tools to assess codon usage adaptation. *Biology Direct*, 3: 38.
- Slowinski J B, Boundy J, Lawson R, et al. 2001. The phylogenetic relationships of Asian coral snakes (Elapidae: *Calliophis* and *Maticora*) based on morphological and molecular characters. *Herpetologica*, 57(2): 233–245.
- Schuster S C. 2008. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 5: 16–18.
- Sorenson M D, Ast J C, Dimcheff D E, et al. 1999. Primers for a

- PCR-based approach to mitochondrial genome sequencing in birds and other vertebrates. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 12(2): 105–114.
- Sueoka N. 1988. Directional mutation pressure and neutral molecular evolution. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America*, 85(8): 2653–2657.
- Sueoka N. 1999. Translation-coupled violation of Parity Rule 2 in human genes is not the cause of heterogeneity of the DNA G+C content of third codon position. *Gene*, 238(1): 53–58.
- Weber C C, Hurst L D. 2010. Intronic AT skew is a defensible proxy for germline transcription but does not predict crossing-over or protein evolution rates in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Molecular Evolution*, 71(5–6): 415–426.
- Wright F. 1990. The “effective number of codons” used in a gene. *Gene*, 87(1): 23–29.
- Xia X H, Xie Z. 2001. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity*, 92(4): 371–373.
- Yao L Z, Gong Y A, Tang X S, et al. 2020. Complete mitochondrial genome of the MacClelland’s Coral Snake *Sinomicrurus macclellandi* (Reinhardt, 1844) (Serpentes: Elapidae). *Mitochondrial DNA Part B: Resources*, 5(3): 2582–2584.
- 陈念, 赖小平. 2010. 眼镜王蛇线粒体基因组全序列分析. *遗传*, 32(7): 719–725.
- 黄欣. 2014. 大别山地区原矛头蝮属一新种的确定及原矛头蝮属线粒体基因组演化的初步研究. 合肥: 安徽大学硕士学位论文.
- 彭丽芳, 柳国雄, 柯培峰, 等. 2021. 广东肇庆鼎湖区发现广西华珊瑚蛇. *四川动物*, 40(3): 315.
- 钱立富. 2018. 蛇类线粒体基因组结构演化研究及原矛头蝮属生物地理学分析. 合肥: 安徽大学博士学位论文.
- 赵尔宓. 2006. 中国蛇类. 合肥: 安徽科学技术出版社, 297–298.