

# 毛冠鹿与3种麂属动物的 GAPDH 基因序列的比较分析

戴君勇<sup>1</sup>, 曹祥荣<sup>1</sup>, 石磊<sup>1</sup>, 张锡然<sup>1</sup>, 徐春茂<sup>2</sup>, 王强<sup>3</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

(2. 安徽皖南野生动物救护中心, 安徽 休宁 245400)

(3. 成都动物园, 四川 成都 610081)

**[摘要]** 鹿亚科 (*Muntiacinae*) 动物包括麂属 (*Muntiacus*) 和毛冠鹿属 (*Elaphodus*), 分布于东南亚、中国及印度, 动物形态相似, 但具有令人瞩目的细胞遗传学特性。本文以赤鹿 (*Muntiacus muntjak*)、黑鹿 (*Muntiacus crinifrons*)、小麂 (*Muntiacus reevesi*) 和毛冠鹿 (*Elaphodus cephalophus*) 4 种鹿亚科动物为材料, 以 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH, 管家基因) 为靶基因, 对毛冠鹿在鹿亚科中分类地位进行分子鉴定。提取这 4 种动物的基因组 DNA, 根据人的 GAPDH 基因设计引物, 进行 PCR 扩增, 获得了约为 300 bp 的扩增产物。将纯化后的扩增产物克隆到质粒 pMD 18-T Vector 中, 转化 DH-5 $\alpha$  菌, 挑选阳性克隆, 用 M13-47/RV-M 通用引物进行测序。测序的结果经 clustal 软件进行了同源性比较。结果显示: 鹿属动物种间 GAPDH 基因间的 DNA 差异在 2.52% ~ 4.37% 之间, 毛冠鹿与鹿属 3 种动物的差异在 1.79% ~ 2.87% 之间。这些变异以碱基的转换为主。本文结果支持毛冠鹿为独立属 1 种的分类观念。

**[关键词]** 鹿亚科, 毛冠鹿, 3-磷酸甘油醛脱氢酶

**[中图分类号]** Q953 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2006)01-0075-05

## Analysis on the GAPDH Genes of *Muntiacus Muntjak*, *Muntiacus Crinifrons*, *Muntiacus Reevesi*, and *Elaphodus Cephalophus*

Dai Junyong<sup>1</sup>, Cao Xiangrong<sup>1</sup>, Shi Lei<sup>1</sup>, Zhang Xiran<sup>1</sup>, Xu Chunmao<sup>2</sup>, Wang Qiang<sup>3</sup>

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Anhui Wannan First-aid Centre of Wild Animal, Xiuning 245400, China)

(3. Chengdu Zoo, Chengdu 610081, China)

**Abstract:** Muntjac deer (*Muntiacinae*, *Cervidae*), include *Muntiacus* and *Elaphodus*, are distributed throughout Southeast Asia, China, and India. They are of great interest to evolutionary biologists and cytogeneticists because of the considerable diversity of their karyotypes, despite their morphological similarity. The GAPDH gene, a nuclear gene, is analyzed for identifying the taxonomy of the tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). The genomic DNAs are extracted from the four animals. The primers are designed and synthesized according to the human GAPDH gene. The fragments of GAPDH gene are amplified by using the genomic DNA of the four animals as templates. The fragment sizes of the PCR products (GAPDH) are about 300 bp. The target bands are recovered and purified. The fragments are ligated with the plasmid of pMD 18-T Vector by the method of direct T-A cloning. The mixtures of ligation were transformed into DH-5 $\alpha$ . The positive clones are screened by the white/blue colony, and identified by colony PCR and digested by restriction enzyme. The DNA sequences of the recombinant clones are determined by using M13-47/RV-M universal primers and are aligned by the software of clustal. The nucleotide divergence is 2.52% ~ 4.37% among three species of *Muntiacus*, 1.79% ~ 2.87% between *Elaphodus* and each species of *Muntiacus*. The majority of varieties are due to the transition of nucleotides. The results are agreeable with morphological taxonomy.

**Key words:** tufted deer, *Elaphodus Muntiacinae*, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

收稿日期: 2005-03-20.

基金项目: 国家自然科学基金(39970388)、江苏省教育厅自然科学基金资助项目(02KJD180006).

作者简介: 戴君勇, 1972—, 讲师, 主要从事细胞及分子遗传学的学习与研究. E-mail: daijunyong@njnu.edu.cn

## 0 引言

3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)是糖酵解和卡尔文循环中的一个关键酶,与ATP的合成密切相关.它催化3-磷酸甘油醛和1,3-二磷酸甘油酸之间的可逆反应. GAPDH是由四个相同的亚基组成的四聚体,每个亚基的相对分子质量( $M_r$ )约为38 000.以往,常把它作为分析其他蛋白质结构和功能的标准或其他基因表达的内参照,很少引起人们的兴趣.近年来越来越多的研究发现, GAPDH不仅参与能量代谢,还有许多其他如膜的溶解、微管的装配、磷酸转移酶活性、RNA的输出、DNA的复制和DNA的修复等功能,这些新活性可能与亚细胞的定位、GAPDH的寡聚结构相关<sup>[1]</sup>.还有一些研究表明: GAPDH与凋亡<sup>[2-3]</sup>、神经退行性病变<sup>[4]</sup>、前列腺癌、病毒的发病机理等有关<sup>[5]</sup>.

GAPDH基因的研究在探讨系统发生和分子进化方面也取得了相当的进展. Figge<sup>[6]</sup>在蓝细菌等真细菌的研究中认为:真核生物的核基因是来自于内共生的线粒体和叶绿体祖先的基因.通过对螺旋藻的研究也认为:现在原核生物中的GAPDH基因可能是螺旋藻的后代<sup>[7]</sup>. Liaud<sup>[8]</sup>对硅藻属和红藻属的GAPDH和TPI基因进行了研究,结果表明:具光合作用的硅藻属真核生物,其质体是来自红藻属真核生物的次共生吞噬体.因此,他们也支持,真核生物中糖酵解所需酶的核基因是由线粒体基因中获得的.

本文通过对毛冠鹿及麂属中的黑麂、小麂和赤麂的GAPDH基因进行序列同源性的比较分析,探讨了麂亚科动物之间的亲缘关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 研究动物

毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*)皮肤组织块来自安徽黄山野生动物救护中心,赤麂(*Muntiacus muntjak*)和小麂(*Muntiacus reevesi*)细胞系购于昆明动物所,黑麂(*Muntiacus crinifrons*)肝组织由东南大学单祥年教授赠送.褐家鼠(*Rattus norvegicus*)的GAPDH序列来自Genbank,登录号为NM—017008.

#### 1.1.2 引物

所用引物是根据人的GAPDH基因序列设计而成,由上海生工生物工程公司合成.

引物1:5' GTGAAGGTCGGAGTCAAC3'.

引物2:5' GAGATGATGACCCTTTTGCC3'.

所设计的引物经OLIGA软件Version6.44分析,符合引物设计要求.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 总DNA提取

根据Frederick<sup>[9]</sup>的方法提取DNA,测定其 $OD_{260}$ 的值, -20℃保存.

#### 1.2.2 PCR扩增

反应体系:模板DNA 2 μL(50 ng), 10×Buffer 2.5 μL, 25 mmol/L  $Mg^{2+}$  2 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 5 μmol/L引物1和引物2各1.5 μL, Taq酶(5U/μL) 0.3 μL, 加无菌水至25 μL.

反应条件:95℃预变性5 min,然后94℃变性1 min,56℃复性50 s,72℃延伸50 s,反应共30个循环,最后在72℃延伸7 min.

#### 1.2.3 电泳、纯化、克隆及鉴定

PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,切割目的条带,3S DNA Gel Purification Kit V3.1(上海博彩生物科技有限公司)纯化PCR产物.

将目的片段克隆到pMD18-T载体中(TaKaRa),菌落PCR法鉴定重组克隆.

#### 1.2.4 DNA序列测定、同源性比较分析

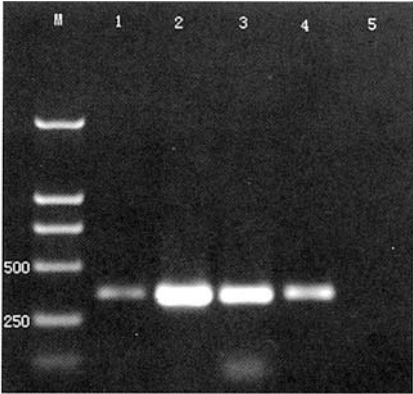
阳性重组克隆送到上海生工生物工程公司、上海申友生物技术有限责任公司和上海申能博彩生物科技有限公司进行测序.

运用Clustal分析软件对所测序的4种麂亚科动物的GAPDH基因进行同源性比较,利用Mega分析软件包中Kimura<sup>[10]</sup>二参数模型估计彼此间的遗传距离.

2 结果

2.1 PCR 扩增

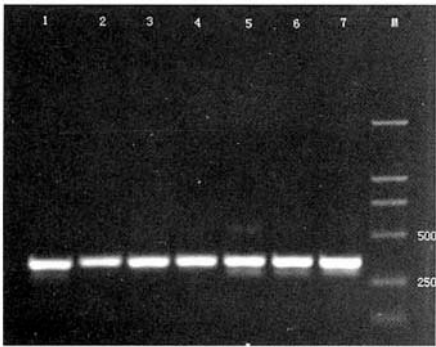
参照人 GAPDH 基因序列,设计引物,毛冠鹿、黑鹿、小鹿和赤鹿 DNA 为模板,PCR 扩增,电泳显示约 300bp 的 DNA 片段(图 1)。



M:Marker; 1:毛冠鹿(*Elaphodus cephalophus*); 2:黑鹿(*Muntiacus crinifrons*); 3:小鹿(*Muntiacus reevesi*); 4:赤鹿(*Muntiacus muntjak*); 5:空白对照  
图 1 GAPDH 基因 PCR 扩增结果(1.5%的琼脂糖凝胶)

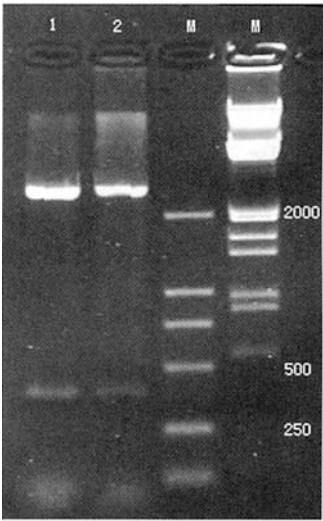
2.2 GAPDH 基因片段的克隆与鉴定

将扩增片段回收,克隆到载体中,PCR 和限制性内切酶鉴定(图 2,3),筛选重组克隆,作为测序的材料。



1、2、3、4:小鹿(*Muntiacus reevesi*);  
5、6、7:赤鹿(*Muntiacus muntjak*); M:Marker

图 2 GAPDH 基因 PCR 鉴定结果(1.5%的琼脂糖凝胶)



1:小鹿(*Muntiacus reevesi*); 2:赤鹿(*Muntiacus muntjak*); M:Marker

图 3 GAPDH 基因酶切鉴定结果(1.5%的琼脂糖凝胶)

2.3 GAPDH 基因的序列分析

对毛冠鹿(Ece)、黑鹿(Mcr)、小鹿(Mre)和赤鹿(Mmu)的 GAPDH 基因扩增片段进行测序,得到 304 bp 的可用序列.运用 Clustal 软件分析这些序列与褐家鼠(Rno,GenBank 登录号 NM\_017008)的 GAPDH 序列进行比较,结果如图 4 和表 1 所示:

Ece	CCG	CAT	CGG	GCG	CCT	GGT	CAC	CAG	GGC	TGC	TTT	TAA	TTC	TGG	CAA	AGT	GGA	CAT
Mmu	T..	...	...	...	.T.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mre	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mer	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.G.	...	...	...
Rno	...	T..	T..	C..	...	...	...	...	...	...	C..	CTC	..G	..A	...	...	...	...
Ece	CAT	CGC	CAT	CAA	TGA	TCC	CTT	CAT	TGA	CCT	TCA	CTA	CAT	GGT	CTA	CAT	GTT	CCA
Mmu	.G.	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mre	...	...	...	...	C..	...	...	...	...G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mer	.G.	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Rno	TG.	T..	...	...	C..	C..	...	...	...	...	CA.	...	...	...	...	...	...	...
Ece	GTA	TGA	TTC	CAC	CCA	CGG	CAA	GTT	CCA	CGG	CAC	AGT	CAA	GGC	GGA	GAA	CGG	GAA
Mmu	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mre	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.G.	...	...	...	...	T..	...	...
Mer	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Rno	...	...	...	T..	...	...	...	...	.A.	T..	...	...	...	...	T..	...	T..	...
Ece	GCT	CGT	CAT	CAA	TGG	AAA	GGC	CAT	CAC	CAT	CTT	CCA	GGA	GCG	AGA	TCC	CGC	CAA
Mmu	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mre	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	.G.
Mer	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...
Rno	...	G..	...	...	...	G..	AC.	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	T..
Ece	CAT	CAA	GTG	GGG	TGA	TGC	TGG	TGC	TGA	GTA	CGT	GGT	GGA	GTC	CAC	TGG	GGT	CTT
Mmu	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Mre	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...
Mer	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
Rno	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	...	T..	C..	...	...	T..	...	C..	...
Ece	CAC	TAC	CAT	GGA	GAA	G												
Mmu	...	...	...	...	...	.												
Mre	...	...	...	...	...	.												
Mer	...	...	...	..G	...	A												
Rno	...	C..	...	...	...	.												

图中的点表示与 Ece 相同的核苷酸序列,褐家鼠(Rno)

图 4 鹿亚科 4 种动物的 GAPDH 序列(304 bp)

表 1 鹿亚科 4 种动物及褐家鼠为外群的 GAPDH 序列差异百分比(对角线以上)和转换/颠换数(对角线下)

	Ece	Mmu	Mre	Mer	Rno
Ece		1. 79	2. 87	2. 14	12. 65
Mmu	5/0		4. 01	2. 52	12. 70
Mre	6/2	9/2		4. 37	12. 25
Mer	6/0	7/0	10/2		13. 09
Rno	21/12	21/12	19/13	22/12	

赤麂、黑麂、小麂、毛冠鹿及褐家鼠 GAPDH 的序列差异值和转换/颠换值如表 1,结果显示毛冠鹿与鹿属 3 种动物的差异在 1. 79% ~ 2. 87% 之间,鹿属动物种间的 DNA 差异在 2. 52% ~ 4. 37% 之间,毛冠鹿与褐家鼠的差异为 12. 65%。碱基的变异绝大多数是以转换的方式为主。

3 讨论

鹿亚科动物染色体进化是动物进化机制中的热点问题。研究者根据分类学、细胞遗传学、分子生物学的结果,提出不同的进化模式,现一般认为遵循染色体从多至少的进化原则,进化机制中着丝粒的断裂融合为主要方式。马昆等认为鹿类动物均来源于同一个祖先,赤麂和黑麂来源于小麂<sup>[11]</sup>。线粒体 DNA 系统进化研究显示,鹿亚科动物进化与染色体数目的变化有平行关系,染色体数目多的较原始<sup>[12,13]</sup>。古生物学研究显示,鹿亚科真正形成时间大致为中新世的后半期,即中新世的中期和晚期,这个时期又被认为是真正鹿科的形成时期<sup>[13]</sup>。鹿亚科现存种动物则被认为出现在更新世,小麂化石最早发现于更新世(距今约 300 万年),赤麂化石最早发现于晚更新世(距今约 50 万年),毛冠鹿被认为是与更新世在中国陕西蓝田、四川万县出现的鹿族的近缘鹿<sup>[14]</sup>。马世来等<sup>[15]</sup>应用分支分类学(Cladistics)方法对鹿属的种级分类进行了系统整理,他们也认为小麂比较原始,黑麂是小麂分支中的近缘种。但依据哺乳动物性染色体进化趋势,

小原良孝等认为,在整个哺乳类中,性染色体形式的进化似乎是从  $X_1X_1X_2X_2/X_1X_2Y$  到  $XX/XY_1Y_2$ ,最后到较高等哺乳动物的  $XX/XY$  形式,认为赤鹿和黑鹿均早于小鹿,即赤鹿、黑鹿比较原始的<sup>[16,17]</sup>。

根据 GAPDH 基因同源比较结果,可将赤鹿、黑鹿和小鹿分为一类,而毛冠鹿则为另一支。但毛冠鹿与鹿属3种动物的差异(1.79%~2.87%)要小于鹿属动物种间的DNA差异(2.52%~4.37%),这与二属动物演化的特殊性、地理分布变迁等因素有关:(1)鹿亚科动物种类较多,分布在中国、东南亚诸国及印度,范围广。进化演变过程中,势必经过生物地理学和遗传学的变化,产生现今的较多的差异。而毛冠鹿现存1种,分布仅限于中国南方和缅甸北部,较早从鹿科动物分歧出来,保留进化早期的序列特征。(2)有趣的是,这种现象在染色体形态结构方面也有反映,毛冠鹿核型中分别有与鹿亚科动物染色体有相似之处,4对较大染色体(尤其1~3对常染色体)与赤鹿和黑鹿的相似;其余的均为小的端着丝粒染色体与小鹿的相似<sup>[18]</sup>。产生这种现象的原因值得进一步深入研究。

碱基的替换分为转换和颠换两种,一般亲缘关系近的分类水平上转换对进化关系较为重要,而在亲缘关系较远的分类水平上颠换起重要作用。从表1看,转换与颠换数有较明显的差异。碱基变化绝大多数是以转换的方式发生的,转换数明显大于颠换数,也就说明,这些转换和颠换的数据可以用来作为近亲缘的鹿亚科动物的分子进化比较。曹祥荣等人<sup>[13]</sup>用细胞色素b基因在毛冠鹿与鹿属3种动物进化关系的构建中,碱基的转换数也显著大于颠换数,且整个细胞色素b基因的颠换与时间呈线性关系。

### [参考文献]

- [1] Michael A, Sirover. New insights into an old protein; the functional diversity of mammalian glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1999, 1432(2): 159—184.
- [2] Berry M D, Boulton A A. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and apoptosis[J]. *J Neurosci Res*, 2000, 60(2): 150—154.
- [3] Tajima H. Over-expression of GAPDH induces apoptosis in COS-7 cells transfected with cloned GAPDH cDNAs[J]. *Neuroreport*, 1999, 10(10): 2029—2033.
- [4] 皮荣标, 颜光美. 3-磷酸甘油醛脱氢酶与神经元凋亡[J]. *中国神经科学杂志*, 2000, 16(1): 73—75.
- [5] Chen R W, Saunders P A, Wei H, et al. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and p53 in neuronal apoptosis: evidence that GAPDH is upregulated by p53[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(21): 9654—9662.
- [6] Figge R M. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Gene Diversity in Eubacteria and Eukaryotes: Evidence for Intra-and Inter-Kingdom Gene Transfer[J]. *Mol Biol Evol*, 1999, 16(4): 429—440.
- [7] Figge R M, Cerff R. GAPDH gene diversity in spirochetes: A paradigm for genetic promiscuity[J]. *Mol Biol Evol*, 2001, 18(12): 2240—2249.
- [8] Liaud M F, Lichtle C, Apt K, et al. Compartment-Specific Isoforms of TPI and GAPDH are Imported into Diatom Mitochondria as a Fusion Protein: Evidence in Favor of a Mitochondrial Origin of the Eukaryotic Glycolytic Pathway[J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(2): 213—223.
- [9] 奥斯伯 F. 精编分子生物学试验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [10] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *J Mol Evol*, 1980, 16(1): 111—120.
- [11] 马昆, 施立明. 小鹿、黑鹿、赤鹿精母细胞联会复合体的比较研究[J]. *遗传学报*, 1988, 15(4): 282—289.
- [12] Wang W, Lan H. Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny[J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(9): 1326—1333.
- [13] 曹祥荣, 束峰珏. 毛冠鹿与3种鹿属动物的线粒体细胞色素b基因序列分析及进化关系[J]. *动物学报*, 2002, 48(1): 44—49.
- [14] 盛和林. 中国鹿类动物[M]. 上海: 华东师范大学出版社, 1992.
- [15] 马世来, 王应祥, 徐龙辉. 鹿属(*Muntiacus*)的分类及其系统发育研究[J]. *兽类学报*, 1986, 6(3): 191—209.
- [16] Flerov K K. Morphology and ecology of cervidae during its evolution[J]. *J Paleontology Translation*, 1957(1/2): 2—16.
- [17] 王宗仁. 鹿的核型与染色体进化[M]. 北京: 科学出版社, 1988.
- [18] Cao X, Jiang H, Zhang X. Polymorphic karyotypes and sex chromosomes in the tufted deer (*Elaphodus cephalophus*): cytogenetic studies and analyses of sex chromosome-linked genes[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2005, 109(4): 512—518.

[责任编辑:孙德泉]