

核糖体蛋白 rpl15 cDNA 序列在真骨鱼类系统进化研究中的价值

向 筑¹, 张竞男¹, 宋 平¹, 胡珈瑞², 钟 扬³

(1. 武汉大学生命科学学院教育部发育生物学重点实验室, 武汉 430072; 2. 武汉大学中南医院, 武汉 430071; 3. 复旦大学生命科学学院生物多样性与生态工程教育部重点实验室, 上海 200433)

摘要:应用 RT-PCR, 从真骨总目(Teleostei)5 目 15 种鱼类中首次克隆了核糖体大亚基蛋白 L15 (rpl15, ribosomal protein L15) 的完整 cDNA 序列。以海鲢形亚组(Elopomorpha)的鳗鲡作为外类群, 对这些真骨鱼类的核糖体蛋白 L15 cDNA 序列进行了系统发育分析, 结果表明: (1) rpl15 基因在真骨鱼类等许多真核生物进化中高度保守; (2) 系统树中各物种之间的关系与形态分类一致。rpl15 编码区适合于真骨鱼类目以上分类阶元的分子系统学研究。

关键词:核糖体蛋白 L15(rpl15); 分子系统学; 真骨鱼类

中图分类号: Q591.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)02-0171-08

The Study of Ribosomal Protein L15 cDNA Sequences as a Molecular Marker in the Teleostei Phylogenetic Analysis

XIANG Zhu¹, ZHANG Jing-Nan¹, SONG Ping¹, HU Jia-Rui², ZHONG Yang³

(1. Key Laboratory of the Ministry of Education for Developmental

Biology, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2. Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China; 3. Ministry of Education,

Key Laboratory for Biodiversity Science and Ecological Engineering, Shanghai 200433, China)

Abstract: In this study, the full-length cDNAs of rpl15 (ribosomal protein L15) gene were cloned and sequenced from fifteen fishes of five orders under Teleostei. The complete ORF sequences were analyzed for phylogenetic reconstruction for the first time to evaluate the potential of rpl15 gene as a novel marker in resolving teleostean phylogenetic relationships. The resultant NJ, MP and ML trees with *Anguilla japonica* as the outgroup were generally resolved and largely congruent with the morphology-based tree though some incongruities were observed. The incongruities were then analyzed for some explanations. The results suggested that: (1) rpl15 gene was highly conserved during eukaryotic evolution; (2) rpl15 ORF might be a good phylogenetic marker for resolving teleostean relationships. It might be especially appropriate for the higher-level relationships (such as interordinal), and it was possibly suitable for lower-

收稿日期: 2004-11-26; 修回日期: 2005-08-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 30150005 和 No. 30270675)和第三世界科学院研究基金项目(编号: 95-348RG/BIO/AS)资助[Supported by Chinese National Natural Science Foundation (No. 30150005 and No. 30270675) and the Third World Science Academy Fund (No. 95-348RG/BIO/AS)]

作者简介: 向 筑(1977—), 女, 硕士, 研究方向: 分子遗传学

张竞男(1979—), 女, 硕士, 研究方向: 分子遗传学

向 筑、张竞男同为第一作者。

通讯作者: 宋 平(1957—), 男, 博士, 研究方向: 分子遗传学。E-mail: pingsongps@yahoo.com.cn

钟 扬(1964—), 男, 博士, 研究方向: 分子进化与系统发育。E-mail: yangzhong@fudan.edu.cn

致 谢: 感谢龚午鸣、顾珊珊和蔡环在本文修改过程中所作的贡献。

level relationships as well. The same can be true for other eukaryotes.

Key words: rpl15 (ribosomal protein L15); phylogenetic analysis; Teleostei

核糖体是蛋白质生物合成过程中一种不可或缺的复杂细胞器^[1],对细胞活力与生存起关键性作用^[2]。迄今为止,在真核细胞核糖体中已发现大约 80 种核糖体蛋白^[1~3],它们主要在蛋白质合成中发挥作用,也通过参与复制、转录、RNA 加工、DNA 修复等过程在细胞增殖、凋亡、发育的多种调控和恶性转化等方面发挥作用^[4~8]。其中核糖体大亚基蛋白 L15 (rpl15) 的基因最先在龙虾 (*Orconectes limosus*)^[9] 和矮牵牛花 (*Petunia hybrida*)^[1] 中克隆、鉴定。还有研究表明,核糖体蛋白 L15 基因在植物的生长和发育过程中被协同调控^[1],也可能与人体内食道癌的发生有关^[3]。

真核生物的分子进化研究最先是基于核糖体小亚基 RNA (SSU rRNA) 序列^[10]。长期以来,分子系统学研究经常采用的分子标记是核糖体 RNA (rRNA) 和 DNA (rDNA),如 16S rRNA、18S rRNA^[11]、细胞色素 b 基因 (cytb) 等^[12]。近来,一些核糖体蛋白的序列开始被用于分子系统学研究^[13,14] 并取得了较好的结果,但这一类的数据还很少。

真骨总目是现存脊椎动物中物种多样性最为丰富的类群,约 38 目 426 科 4064 属 23,500 种,占现有鱼类总物种数的 96%^[15]。由于真骨鱼类物种的多样性^[16]、起源的古老(2 亿到 2.2 亿年前)^[17] 以及在形态、行为、生态、生理等各方面的差异^[18],用传统的比较解剖学方法研究其分类遇到了一系列困难。近年来,分子系统学在鱼类系统发育研究中的作用日益得到重视^[19],包括生长激素的氨基酸序列^[20]、28S rRNA^[21]、细胞色素 b 基因^[22],甚至整个线粒体基因组^[23] 等分子数据已用于鱼类系统发育重建,所获得到的系统树大多数与形态分类基本一致^[24]。然而,常用的分子标记线粒体 rDNA 虽然是解决亲缘关系较近的物种间关系(科内或属内)最好的分子标记之一,却并不适合探讨真骨鱼类间或科间的关系^[25]。由于不同的基因存在进化速率的差异,单以少数几种基因为分子标记难以客观地进行物种间系统进化分析。因此,有必要寻找新的分子标记。目前,已有成功地采用核糖体蛋白为分子标记进行物种系统进化分析的报道^[14,15],生物信息学分析后表明 rpl15 基因在矮牵牛花^[1]、龙虾^[9]、大

鼠 (GenBank Accession No. NM139114) 和人类^[3] 等物种间同源性非常高,其保守的 DNA 区域明显,特别有利于设计 PCR 引物进行其他物种中同源分子的克隆。为此,本研究选用 rpl15 基因为分子标记,通过对真骨总目 15 种鱼类的 rpl15 cDNA 全序列的测定,尝试将 rpl15 基因的编码序列应用于真骨鱼类的系统发育分析,探讨其作为一种新的分子标记来进行鱼类系统发育研究的可行性。

1 材料和方法

1.1 研究材料

研究样本是鱼纲真骨总目的 15 种鱼类,根据 Nelson 分类法^[16],除鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 属海鲢形亚组 (Elopomorpha) 的鳗鲡 (Anguilliformes),其他 14 种分属于正真骨亚组 (Euteleostei) 的 4 个目中。具体种类的分类地位^[26]、名称及 GenBank 序列号^[27] 见表 1。其中鳗鲡在本研究中作为其他 14 种正真骨亚组鱼类的外类群。

1.2 cDNA 的克隆和序列测定

采用异硫氰酸胍-苯酚-氯仿一步抽提法^[29] 从肝脏组织中提取总 RNA。采用 RT-PCR、3' 端和 5' 端 RACE (Rapid amplification of the cDNA ends) 依次扩增 rpl15 的部分片段、3' 端 (下游区域) 和 5' 端 (上游区域) 以获得完整的 cDNA 序列,具体实验方法见文献^[29],不同之处是 3' 端 RACE 进行 2 轮 PCR: 第一轮采用特异引物 GSP1 和锚定引物 AUAP,第二轮采用特异引物 GSP2 和 AUAP。RT-PCR 中所用引物 RPF (5'-TGCTGGCAGTACCGTTCAGC-3') 和 RPR (5'-GGCCACGCGTCTGACTAGTAC-3') 是根据已经公布的 rpl15 基因的保守区设计,RACE 中采用的特异引物是根据每种鱼类 RT-PCR 扩增的片段分别设计。RACE 中用到的通用引物 (3AP、AUAP 和 AAP) 序列详见参考文献^[30]; 特异引物 GSP1 和 GSP2 是根据 RT-PCR 克隆片段的序列所设计,其引物序列略。

PCR 产物经提纯后克隆到 pGEM-T Easy 载体 (Promega),由上海联合基因公司进行测序。将 RT-PCR 和 3' 端、5' 端 RACE 的测序结果用 DNASTar (V. 4.01)^[31] 进行拼接和初步分析,获得完整的 cDNA 序列。

表 1 研究材料

Table 1 List and taxonomic positions of the fishes used in this study

分类阶元 Category			物种 Species	缩写 Species code	GenBank 序列号 Accession number
目 Order	科 Family	亚科 Subfamily			
鳗鲡目 Anguillif ormes	鳗鲡科 Anguillidae		鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	Ang_ja	AY249411
合鳃鱼目 Symbran chiformes	合鳃鱼科 Symbbranchidae		黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	Mon_al	AY249420
鲈形目 Percifor mes	鲈科 Serranidae		大眼鲈 <i>Siniperca kneri</i>	Sin_kn	AY249425
			花鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	Lat_ja	AY249417
鲇形目 Silurifor mes	鲇科 Siluridae		南方大口鲇 <i>Silurus meridionalis</i>	Sil_me	AY249424
		鲿科 Bagridae	黄颡鱼 <i>Pelteobagrus fulvidraco</i>	Pel_fu	AY249423
鲤形目 ^a Cyprinif ormes	鳅科 Cobitidae	花鳅亚科 Cobitinae	泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	Mis_an	AY249422
			大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	Par_da	AY249419
	鲤科 Cyprinidae	鲤亚科 Cyprininae	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	Cyp_ca	AY249415
			鲫 <i>Carassius auratus</i>	Car_au	AY249413
		雅罗鱼亚科 Leuciscinae	青鱼 <i>Mylopharyngodon piceus</i>	Myl_pi	AY249421
			草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	Cte_id	AY249414
		鲃亚科 Cultrinae	团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	Meg_am	AY249418
	鲢亚科 Hypophthalmi chthyinae	白鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	Hyp_mo	AY249416	
		鳊 <i>Aristichthys nobilis</i>	Ari_no	AY249412	

a: 据乐佩琦等 (According to Yue Peiqi *et al.*)^[28]

1.3 系统发育分析

分别采用 DNASTar 和 Clustal W^[32] 进行序列比对,找出起始和终止密码子,去掉两端序列,只对完整的编码区进行序列排定。使用 MEGA^[33] 分析这些序列的特征和它们之间的差异。应用 MEGA 的邻接法(NJ)和最大简约法(MP)以及 PHYLIP^[34] 的 DNAML 程序和 NEIGHBOR 分别构建系统发育树。在对 3 个密码子分别进行饱和度评估后,选择全部位点进行数据处理。在构建 NJ 树时,遗传距离模型选择 Kimura 两参数模型。在构建 MP 树时,采用

CNI(Close-Neighbor-Interchange) 搜索,100 次随机序列加入,所有核苷酸等权。用 DNAML 构建最大似然树(ML)时,转换/颠换比采用根据这些序列算出的实际值 1.7。NJ 树、MP 树以及 ML 树分支的可信度测试均采用 1 000 次重复抽样检验。用 NEIGHBOR 构建 UPGMA 树(The Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)时,首先根据 clustalw 的多序列比对的结果使用 PHYLIP 软件包中的 SEQBOOT 产生 1 000 个由 bootstrap 产生的随机样本,然后使用 PHYLIP 软件包中的 DNADIST 生

成距离矩阵(默认参数),再使用 PHYLIP 软件包中的 NEIGHBOR 生成 UPGMA 树(默认参数),最后使用 PHYLIP 软件包中的 CONSENSE 生成一致树(以鳗鲡 *Anguilla japonica* 为外类群,树型为有根树)。

2 结果与分析

2.1 序列分析

实验共得到分属于 5 个目下 7 个科的 15 种真骨鱼类的 *rpl15* 的完整 cDNA 序列,全长从 712 bp 到 793 bp 不等,但编码区长度均为 615 bp,经预测编码一个包含 204 个氨基酸的蛋白。这 15 种鱼类 *rpl15* 基因的编码序列经 Clustal W 进行排序后(图略),序列长度仍为 615 bp,没有碱基插入和缺失。其中变异位点数为 185 个,信息位点数为 134 个,分别占总位点数的 30% 和 22%。

在这 15 种 *rpl15* 编码区序列中,A、T、G、C 四种碱基的平均含量分别为 22.9%,18.2%,29.1%,29.7%。结果显示,G+C 含量(58.8%)明显高于 A+T 含量(41.1%)。在这些序列中,转换数为 43,颠换数为 26,转换/颠换比为 1.7。序列变异大多发生在第 3 个密码子上,第三个密码子上的转换数和颠换数分别为 35 和 22。

由 *rpl15* 编码区全部排列位点的序列计算出

Kimura 遗传距离,以确定这 15 种鱼类之间的遗传分化程度。结果显示,它们之间的遗传距离值为 0.008~0.207(表略)。

2.2 系统发育树

基于 *rpl15* 编码区的全部排列位点分别得到了反映这 15 种鱼类相互关系的 NJ 树(图 1)、MP 树以及 ML 树(图略)。其中 MP 树共有两棵,树长均为 376。

当以鳗鲡(Ang_ja)作为外类群时,不管是 NJ 树还是 MP 树、ML 树,它们的拓扑结构表现出高度的相似性:位于同一目下的鱼类序列基本上都聚类在一起,如同属鲈形目的黄颡鱼(Pel_fu)和南方大口鲈(Sil_me)聚为一个类群,而同属鲤形目的 9 种鱼类聚在一起。一个例外是黄鲢(Mon_al),在 MP 树和 ML 树中属于合鳃目的它和两种鲈形目的鱼类——花鲈(Lat_ja)和大眼鲷(Sin_kn)聚在一起,尽管它和鲈形目的鱼类在形态上差别相当大。另外,在系统发育树中,鲤形目的 9 种鱼类中同属鳅科花鳅亚科的泥鳅(Mis_an)和大鳞副泥鳅(Par_da)虽聚为一个类群,但分布于鲤科的鲤亚科[鲤(Cyp_ca)和鲫(Car_au)]和雅罗鱼亚科[青鱼(Myl_pi)和草鱼(Cte_id)]、鲢亚科[鲢(Ari_no)和白鲢(Hyp_mo)]、鲃亚科[团头鲂(Meg_am)]这 3 个亚科的鱼类之间。

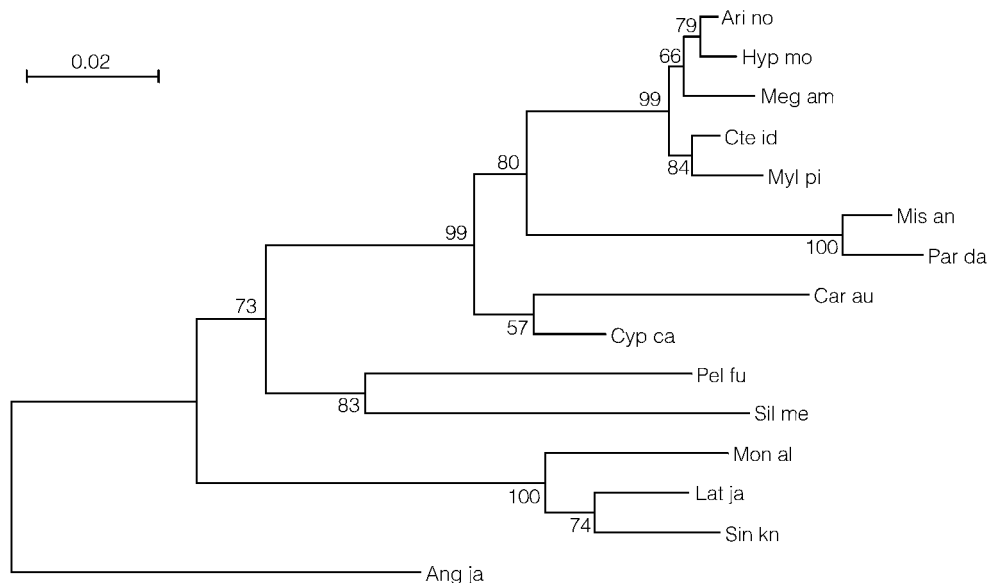


图 1 15 种真骨鱼类基于 *rpl15* 编码区序列的 NJ 树

节点显示 1 000 次重复抽样检验的自展率;分支的类名见表 1。

Fig. 1 The NJ tree for the 15 species of fishes in teleostei based on the coding sequences of *rpl15*

The number at each node is the bootstrap value based on 1 000 replication; see Table 1 for names of taxa on branches.

3 讨 论

从目前已克隆的序列来看, *rpl15* 基因在真核生物进化中相当保守:从低等的果蝇(*Drosophila melanogaster*)、龙虾到高等哺乳类人、小鼠这样大的进化跨度内,氨基酸序列同源性高达 70% 以上(结果略)。本研究中的 *rpl15* cDNA 序列虽然分别克隆自真骨总目下 5 个目的 15 种鱼类,但其完整的编码区长度均为 615 bp,没有碱基插入和缺失现象,目间核苷酸同源性超过 80%。通过比较这 15 种 *rpl15* 基因编码区的全部排列位点发现:在亲缘关系较近(同一目)的物种中, *rpl15* 编码序列具有高度相似性,一般大于 90%,最高可达 99%,Kimura 遗传距离大多小于 0.1,如鲤形目的 9 种鱼类之间遗传距离为 0.008~0.123;而亲缘关系较远(不同目)的物种间,除了合鳃目与鲈形目间的 Kimura 较小(0.056;0.047)外,同源性降至 90% 以下, Kimura 遗传距离平均大于 0.164,如外群鳗鲡和其他 14 种正真骨鱼类之间遗传距离为 0.154~0.207。这一差异表明 *rpl15* 基因的编码区可以为真骨鱼类的进化关系研究提供有用信息。

这 15 种编码序列的 G+C 含量都相当高(58.8%),这与基因编码区 G+C 含量高的特性是一致的^[35]。有研究认为,G+C 含量与序列的替代速率间存在着一定的相关关系:当序列的 G+C 含量低时,它的替代速率就高^[36]。因此,这里较高的 G+C 含量是否暗示 *rpl15* 基因的编码序列变异较慢,进化速率较低呢?对这一问题有待进一步研究。

从 *rpl15* 基因编码区提供的信息量来看,在 615 个核苷酸分析位点中,信息位点仅为 134 个,约占总分析位点数的 22%。与经典的分子标记 *cytb* 基因相比较:同样取 14 种鱼类(不包含大鳞副泥鳅,另外鳅属取样是鳅 *Siniperca chuatsi* 而非大眼鳅)的 *cytb* 编码序列,1 140 个排列位点中信息位点数为 428 个,占全长的 37.5%。在几乎同样的进化跨度内,*rpl15* 编码区的信息位点数所占比例仅为 *cytb* 编码区的 2/3。应用同样的遗传距离模型和各种参数,计算出这 14 种鱼类之间的遗传距离值为 0.081~0.412(结果略)。*rpl15* 编码区的进化速率大约是 *cytb* 编码区的 1/2。据此推测, *rpl15* 编码区可能适合于真骨鱼类目之间甚至目以上更高分类阶元的分子进化分析。我们也尝试了与 16S、18S、28S

rDNA 和 *cytc* 基因等其他分子标记相比较,但因为这些标记有关这 15 种鱼类的的数据太少(均不足 3/5),比较结果意义不大,因此在本文中略去。

基于这 15 种鱼类的 *rpl15* 编码区构建的 NJ 树、MP 树以及 ML 树都支持以上推论。它们的拓扑结构显示出与经典的形态分类基本一致,特别是不同目的鱼类间关系:(1)除在 MP 树和 ML 树中合鳃目的黄鳝和鲈形目的花鲈和大眼鳅聚在一起,其他都是各目鱼类分别聚类;(2)鲤形目和鲈形目较为接近。关于(1),考虑到鲈形目并不是一个单系类群^[37,38]以及以往分子系统学研究中鲈形目与真骨鱼类各目的相对位置,如在 Miya 等人基于完整的线粒体基因组序列所构建的系统发育树中,包括合鳃目、鲈形目、鲈形目等在内的若干目都散布在鲈形目的几个类群之间^[23],加上计算中可能存在误差,在系统发育树中黄鳝和这两种鲈形目鱼类关系密切甚至聚在一起是可能的。关于(2),依据传统的形态分类特征,真骨总目下同属骨鳔鱼类(Ostariophysi)的鲤形目和鲈形目鱼类亲缘关系较近,常常聚在一起,而这一点也被以生长激素的氨基酸序列为分子标记的系统发育研究所证实^[20]。因此,本研究中各物种之间的关系与已有的形态和分子系统学研究是一致的。而 *rpl15* 基因编码区用于系统发育研究的可靠性也被基于这 15 种编码序列建立的系统发育树中的分支节点普遍具有 >50% 的较高的支持率(图 1)这一结果所支持。

关于 *rpl15* 编码区是否适合于较小的分类阶元如科间的分子进化分析,我们以鲤形目的 9 种鱼类做了初步的探讨。虽然在基于这 15 种鱼类的 *rpl15* 编码区构建的 NJ 树、MP 树以及 ML 树中,泥鳅和大鳞副泥鳅聚成的鳅科类群都夹在鲤科的鲤亚科和雅罗鱼亚科、鲢亚科、鲂亚科之间,但这是由于系统发育树构建中随着其他相距较远的物种的加入而引入虚假的信息位点所致。当我们对这 9 种鲤形目鱼类的序列进行单独分析时,发现在 615 个核苷酸分析位点中,信息位点仅为 61 个,占总长的 10%,也即对这 15 种序列进行总的分析时引入了 1 倍以上的虚假信息位点,由此产生的误差可想而知。应用同样的遗传算法和各种参数,以鳗鲡(Ang_ja)为外类群对上述 10 种序列单独构建系统发育树(图 2,UP-GMA 有根树):鳅科和鲤科各自聚成一个类群,其中鲤科的 4 个亚科各自聚群。虽然 *rpl15* 编码区提供

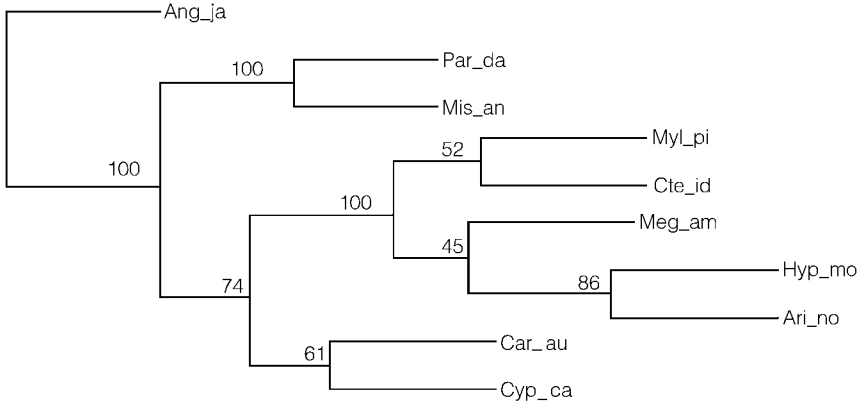


图 2 以鳗鲡为外类群, 鲤形目 9 种鱼类基于 *rpl15* 编码区序列的 UPMAG 一致树
节点显示 1000 次重复抽样检验的自展率。

Fig.2 The UPMAG consense tree for 9 species of fishes in Cypriniformes based on *rpl15* coding sequences with *Anguilla japonica* outgroup

The number at each node indicates the bootstrap value based on 1000 replications.

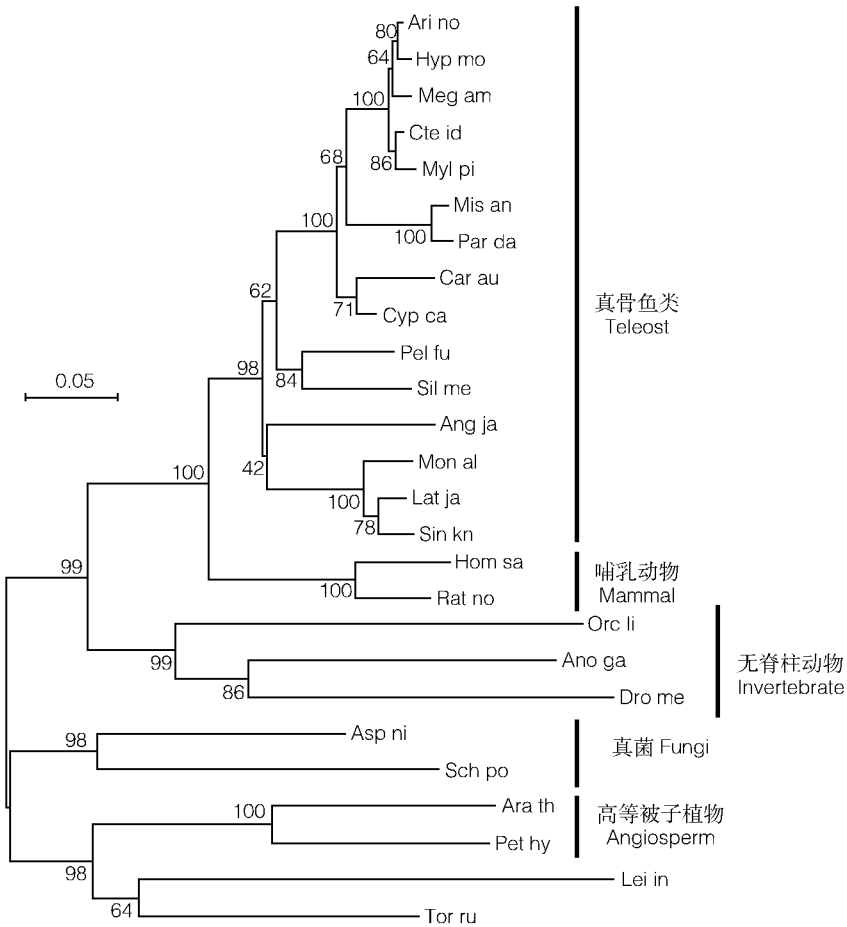


图 3 26 种真核生物的基于 *rpl15* 编码区序列的 NJ 树
节点显示 1 000 次重复抽样检验的自展率。

Fig.3 The NJ tree of 26 eukaryotes based on *rpl15* coding sequences

The number at each node indicates the bootstrap value based on 1 000 replications.

的信息位点不多,但是已经较好的反映了这 9 种鲤形目鱼类之间的关系。当然,由于鲤形目是现存硬骨鱼类中最大的一个类群,种类庞杂^[28],而我们的取样量较少,所以还不能肯定 *rpl15* 编码区能否提供足够的信息位点用于鲤形目科间、亚科间甚至更小分类阶元系统发育的重建。但是,至少 *rpl15* 基因编码区用于较小的分类阶元的分子系统学研究的可能性值得进一步探讨。关于鲤科鱼类的系统发育,基于 *cytb* 基因^[39]、核糖体蛋白基因 S7 内含子 1^[40]等序列的分子系统学研究已经提供了许多有价值的信息,应用 *rpl15* 基因编码区序列可能取得新的收获。

而且, *rpl15* 基因的编码区可能适于更大进化阶元的系统发育研究。当我们尝试加入更多已克隆的 *rpl15* 编码序列构建系统发育树,我们发现:聚类结果(图 3, NJ 树和 MP 树拓扑结构高度一致; MP 树略)与公认的分类标准基本相符,所有这些物种聚为两个姐妹群,一个包括所有的动物,又分为两枝:脊椎动物和无脊椎动物,另一个类群也是两枝,一枝为真菌,另一枝包括植物和原生生物利什曼原虫 (*Leishmania infantum*, Lei_in)。考虑到原生动物的多源性^[41]和计算误差,利什曼原虫和低等植物土生墙藓 (*Tortula ruralis*, Tor_ru) 聚在一起也是可能的,而且在 MP 树中该节点仅获得 38% 的低支持率。

总之, *rpl15* 基因编码区可能是一种很好的分子遗传标记,尤其是可能适合于较高分类阶元的分子系统学研究。本研究将其初步用于真骨鱼类系统发育分析,取得了较好的结果。作为一种新的可能的分子标记,已经克隆的 *rpl15* 序列还很少。因此, *rpl15* 基因编码区在真骨鱼类分子系统学研究中的意义还有待进一步的探索。

参 考 文 献 (References):

- [1] Lee H S, Mun J H, Kim S G. Characterization of cDNA encoding cytoplasmic ribosomal protein L15 and L27a in petunia (*Petunia hybrida*): Primary structures and coordinate expression. *Gene*, 1999, 226(2): 155~163.
- [2] van Beekvelt C A, de Graaff-Vincent M, Faber A W, van't Riet J, Venema J, Raue H A. All three functional domains of the large ribosomal subunit protein L25 are required for both early and late pre-rRNA processing steps in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(24): 5001~5008.
- [3] Wang Q, Yang C, Zhou J, Wang X, Wu M, Liu Z. Cloning and characterization of full-length human ribosomal protein L15 cDNA which was overexpressed in esophageal cancer. *Gene*, 2001, 263(1~2): 205~209.
- [4] Wool IG. Extraribosomal functions of ribosomal proteins. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(5): 164~165.
- [5] Chen F W, Ioannou Y A. Ribosomal protein in cell proliferation and apoptosis. *Int Rev Immunol*, 1999, 18(5-6): 429~448.
- [6] Naora H, Takai I, Adachi M, Naora H. Altered cellular responses by varying expression of a ribosomal protein gene: sequential coordination of enhancement and suppression of ribosomal protein S3a gene expression induce apoptosis. *J Cell Biol*, 1998, 141(3): 735~741.
- [7] Naora H. Involvement of ribosomal protein in regulating cell growth and apoptosis: translational modulation or recruitment for extraribosomal activity. *Immunol Cell Biol*, 1999, 77(3): 197~205.
- [8] SHANG Xuan, HE Yan, ZHANF Lei, HE Chun-Jiang, XIA Lai-Xin, GAO Shang, GUO Yi-Qing, CHENG Han-Hua, ZHOU Rong-Jia. Ribosomal protein genes highly expressed in swamp eel gonads. *Hereditas* (Beijing), 2005, 27(2): 227~230.
商璇,何炎,张雷,何春江,夏来新,高尚,郭一清,程汉华,周荣家.黄鳝性腺高表达的核糖体蛋白基因. *遗传*, 2005, 27(2): 227~230.
- [9] Tom M, Waterman M R, Bocking D, Dauphin-Villemant C. Cloning and characterization of the L15 ribosomal protein gene homologue from the crayfish *Orconectes limosus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 256(2): 313~316.
- [10] Sogin M L. Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev*, 1991, 1(4): 457~463.
- [11] Philippe H, Germot A. Phylogeny of eukaryotes based on ribosomal RNA: long-branch attraction and models of sequence evolution. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(5): 830~834.
- [12] Izeni P Farias, Guillermo Orti', Iracilda Sampaio, Horacio Schneider, Axel Meyer. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *J Mol Evol*, 2001, 53(2): 89~103.
- [13] Lipscomb D L. Support, ribosomal sequences and the phylogeny of the eukaryotes. *Cladistics*, 1998, 14(4): 303~338.
- [14] Müller E C, Wittmann-Liebold B. Phylogenetic relationship of organisms obtained by ribosomal protein comparison. *Cell Mol Life Sci*, 1997, 53(1): 34~50.
- [15] Oriane Matte-Tailliez1, Céline Brochier1, Patrick Forterre, Hervé Philippe. Archaeal phylogeny based on ribosomal proteins. *Molecular Biology and Evolution*, 2002, 19(5): 631~639.
- [16] Nelson J S. *Fishes of the World*. 3rd edition. New York: Wiley, 1994.
- [17] Kumazawa Y. Mitochondrial molecular clocks and the origin of euteleostean biodiversity: Familial radiation of perciforms may have predated the Cretaceous/Tertiary boundary. In: *The Biolo-*

- gy of Biodiversity (Kato M, Eds.). Tokyo: Springer-Verlag, 1999. 35~52.
- [18] Helfman G S. The Diversity of Fishes. Massachusetts: Blackwell Science, 1997.
- [19] Nelson G. Phylogeny of major fish groups. In: The Hierarchy of Life (Fernholm B *et al*, eds.). Amsterdam: Elsevier, 1989. 325~336.
- [20] Rubin D A, Dores R M. Obtaining a more resolute teleost growth hormone phylogeny by the introduction of gaps in sequence alignment. *Mol Phylogenet Evol*, 1995, 4(2): 129~138.
- [21] Le H L, Lecointre G, Perasso R. A 28S rRNA-based phylogeny of the gnathostomes: first steps in the analysis of conflict and congruence with morphologically based cladograms. *Mol Phylogenet Evol*, 1993, 2(1): 31~51.
- [22] Lydeard C, Roe K J. The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome b gene for inferring relationships among actinopterygian fishes. In: Molecular Systematics of Fishes (Kocher T D, Stepien C A, eds.). San Diego: Academic Press, 1996. 285~303.
- [23] Miya M. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 26(1): 121~138.
- [24] Stepien C A, Kocher T D. Molecules and morphology in studies of fish evolution. In: Molecular Systematics of Fishes (Kocher T D, Stepien C A, eds.). San Diego: Academic Press, 1997. 1~11.
- [25] Orti G, Meyer A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Syst Biol*, 1997, 46(1): 75~100.
- [26] CHENG Qing-Tai. China Systematic Index of Fish Species. Beijing: Science Press, 1987.
成庆泰. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 1987.
- [27] Smith D G. Elopiformes, Notacanthiformes and Anguilliformes: Relationships. In "Ontogeny and Systematics of Fishes" (Moser H G, eds.). Herpetol; Amer Soc Ichthyol, 1984. 94~103.
- [28] LE Pei-Qi. China Fauna Sinica: Osteichthyes Cyprinomorpha. Beijing: Science Press, 2000.
乐佩琦. 中国动物志: 硬骨鱼纲鲤形目. 北京: 科学出版社, 2000.
- [29] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 1987, 162(1): 156~159.
- [30] SONG Ping, HU Yin-Chang, XIANG Zhu, HU Jia-Rui, PAN Yun-Feng. Cloning and sequencing of full length cDNA in *Silurus meridionalis* growth hormone. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26(3): 272~280.
- 宋平, 胡隐昌, 向筑, 胡珈瑞, 潘云峰. 南方鲇生长激素完整 cDNA 的克隆及其 DNA 序列分析. 水生生物学报, 2002, 26(3): 272~280.
- [31] Higgins D G, Sharp P M. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput Appl Biosci*, 1989, 5(2): 151~153.
- [32] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673~4680.
- [33] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, Nei M. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*, 2001, 17(12): 1244~1245.
- [34] Felsenstein J. PHILIP (phylogenetic Inference Package), version 3.5c. University of Washington, Washington, USA, 1993.
- [35] Li W H, Graur D. Fundamentals of molecular evolution. Massachusetts: IAC publishers, 1991.
- [36] WANG Ning, CHEN Run-Sheng. Comparison of intron and exon based phylogenetic analysis. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44(19): 2095~2102.
王宁, 陈润生. 基于内含子和外显子的系统发育分析的比较. 科学通报, 1999, 44(19): 2095~2102.
- [37] Lauder G V, Liem K F. The evolution and interrelationships of the actinopterygian fishes. *Bull Mus Comp Zool*, 1983, 150(1): 95~197.
- [38] Johnson G D. Percomorph phylogeny: progress and problems. *Bull Mar Sci*, 1993, 52: 3~28.
- [39] HE Shun-Ping, LIU Huan-Zhang, CHEN Yi-Yu, Nakajima T. Sequencing and phylogenetic studies on cytochrome b in East Asia low cyprinidae. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(21): 2297~2302.
何舜平, 刘焕章, 陈宜瑜, Nakajima T. 东亚低等鲤科鱼类细胞色素 b 基因序列测定及系统发育研究. 科学通报, 2000, 45(21): 2297~2302.
- [40] WANG Xu-Zhen, HE Shun-Ping, CHEN Yi-Yu. Mutation in S7 ribosomal protein gene sequence and its significance in the phylogenetic study on low cyprinidae. *Chinese Science Bulletin*, 2002, 47(14): 1089~1094.
王绪桢, 何舜平, 陈宜瑜. S7 核糖体蛋白基因序列变异及其在低等鲤科鱼类中的系统发育意义. 科学通报, 2002, 47(14): 1089~1094.
- [41] Coombs G, Vickerman K, Sleigh M, Warren A. Evolutionary Relationships Among Protozoa. London: Chapman & Hall, 1998.