

doi: 10.7541/2017.35

## 尖毛虫属 *Actin I*、 $\alpha$ -TBP和DNA *pol* $\alpha$ 乱序基因的模式研究

杨然 陈天兵 黄俊 石文俊 区淑青 伊珍珍

(华南师范大学生命科学学院, 广州市亚热带生物多样性与环境生物监测重点实验室, 广州 510631)

**摘要:** 研究旨在对尖毛虫属内现有物种的3种乱序小核基因结构进行比较, 探讨其乱序模式。于湛江湖光红树林水域中采集到一个尖毛虫属物种 *Oxytricha* sp. (ZJ), 成功扩增了其肌动蛋白 I (Actin I)、端粒结合蛋白( $\alpha$ -TBP)、DNA聚合酶 $\alpha$  (DNA *pol*  $\alpha$ ) 3个乱序基因的完整大核基因序列和完整/部分小核基因序列, 并结合已有资料对比研究了尖毛虫属这3个乱序基因的进化。结果表明: (1) *Oxytricha* sp. (ZJ)与 *O. nova*的小核Actin I基因具有相同的乱序模式, 区别于其余的尖毛虫属物种; 在增加尖毛虫属物种的基础上, 对前人推测提出了质疑, 我们认为MDS-IES接合处移动现象在乱序MDSs之间并非比非乱序MDSs之间更保守。(2) *Oxytricha* sp. (ZJ)与 *O. nova*的小核 $\alpha$ -TBP基因具有相同乱序模式和相似长度的IESs。(3) *Oxytricha* sp. (ZJ)的小核DNA *pol*  $\alpha$ 基因乱序模式, 区别于任一已报道物种, 与属内 *O. trifallax*最为相近。基于序列分析, 在DNA *pol*  $\alpha$ 基因中发现了一例IES转换为MDS的痕迹, 以及由此导致原先MDS的丢失。研究发现在编码区内IES向MDS的转变, 使得本应删除的序列成为基因组永久保留的一部分。

**关键词:** 尖毛虫; 乱序基因; 大核命运序列; 内部删除序列; 肌动蛋白 I 型; 端粒结合蛋白; DNA聚合酶 $\alpha$

**中图分类号:** Q344<sup>+</sup>.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2017)02-0285-11

纤毛虫原生动物具有二型核, 小核基因通常被内部删除序列 (Internal eliminated sequences, IESs) 分隔成多个大核命运序列 (Macronucleus destined sequences, MDSs) 片段。在接合生殖过程中, 通过小核IESs的删除和MDSs的重组连接、端粒序列的生成和基因的高度扩增等过程形成具功能的大核基因<sup>[1-5]</sup>。染色体重排广泛存在于3种纤毛虫类群中: Armophorea、旋唇纲Spirotrichea、层咽纲Phyllopharyngea<sup>[6]</sup>, 许多小核基因MDSs的排列顺序会发生变化, 形成乱序基因。其中在旋唇纲腹毛类纤毛虫中该现象尤为明显, 例如尖毛虫 (*Oxytricha*) 和棘尾虫 (*Stylonychia*) 中分别有96%和98%的小核基因组序列在小核发育成大核的过程中被删除<sup>[7]</sup>。

在腹毛类纤毛虫中, 有3种乱序基因为人们熟知, 分别为肌动蛋白 I 型 (Actin I)<sup>[1]</sup>、端粒结合蛋白 ( $\alpha$ -TBP)<sup>[8]</sup> 及DNA聚合酶 $\alpha$  (DNA polymerase  $\alpha$ )<sup>[9]</sup>。目前已报道10个物种12个种群的小核Actin I基因

序列<sup>[4, 1, 10-14]</sup>、6个物种的小核 $\alpha$ -TBP基因<sup>[8, 15, 16]</sup>、7个物种的小核DNA *pol*  $\alpha$ 基因<sup>[9, 17-20]</sup>。Hogan等<sup>[12]</sup>推测了腹毛类纤毛虫小核Actin I基因的进化路线, 从共同的原始祖先到3个MDSs的 *Urostyla grandis*, 进化为拥有4个MDSs的 *Engelmanniella mobilis*, MDS2发生倒置, 再进化为拥有8个MDSs的 *Stylonychia lemnae*, 然后分化为两个分支, 一支为3个尖毛虫类群, 一支为 *S. pustulata* 和 *Oxytricha* sp. (Misty)。之后, Chen等<sup>[21]</sup>在成功扩增2种尾柱目纤毛虫大小核Actin I基因的基础上, 将腹毛类小核Actin I进化路线进一步修正, 提出腹毛类不同目之间可能存在不同的进化路线。Wong等<sup>[16]</sup>推测了 $\alpha$ -TBP基因可能的进化路线, 认为祖先类群为非乱序物种 (*Holosticha* sp.), 历经乱序排列的 *Uroleptus* sp.、*Paraurostyla weissei*, 进化为中间MDS发生易位的 *O. trifallax*, 再经历两个MDSs发生融合 (如 *O. nova*/*S. mytilus*)。DNA *pol*  $\alpha$ 的进化路线尚未有人给出。综上,

收稿日期: 2016-04-18; 修订日期: 2016-07-20

**基金项目:** 国家自然科学基金面上项目 (31471973); 广东省特支计划百千万工程青年拔尖人才项目; 2015年大学生创新创业训练计划华南师范大学校级项目资助 [Supported by the National Natural Science Foundation of China (31471973); Special Support Program of Guangdong Province; 2015 SCNU Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship]

**作者简介:** 杨然 (1991—), 女, 山东济南人; 硕士研究生; 主要从事水生生物分子系统与进化研究。E-mail: yyangan@163.com

**通信作者:** 伊珍珍 (1981—), 女, 山东淄博人; 副研究员, 硕导; 主要研究方向为纤毛虫原生动物分子系统与进化。E-mail: zyi@scnu.edu.cn

已报道的腹毛类3种乱序基因进化路线仅为较为粗略的大致框架, 细节部分依然亟待修订和补充。

本研究在湛江湖光红树林水域中采集得到一个腹毛类尖毛虫物种 *Oxytricha* sp. (ZJ)。通过测定 *O.* sp. (ZJ) 大、小核的 *Actin I*、 $\alpha$ -TBP 和 DNA *pol*  $\alpha$  基因序列, 并对尖毛虫属内现有物种3个乱序的小核基因结构进行比较, 探讨尖毛虫属基因乱序模式, 增加人们对相关基因进化的认识。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品与DNA提取

*Oxytricha* sp. (ZJ) 于2010年11月采自湛江湖光红树林水域(东经109°40'—110°35', 北纬20°14'—21°35'), 镜检后分离<sup>[22]</sup>。于5‰人工海水中投入米粒滋生细菌, 进行单克隆培养。至大量繁殖阶段, 筛绢过滤除去大的杂质后, 5000 r/min, 3min离心富集虫体。DNA提取按照伊珍珍等<sup>[23]</sup>改良的Qiagen Dneasy Blood & Tissue Kit试剂盒使用方法操作。电泳检测完整性, 微量核酸测量仪检测其浓度。

### 1.2 PCR扩增与测定

**大核 *Actin I* 基因序列的获得** 利用引物 Actin800F 和 Actin800R1<sup>[18]</sup>(表1) 获得约800 bp 的大核 *Actin I* 基因片段。PCR反应总体积为50  $\mu$ L, 包括去离子水36  $\mu$ L, 10 $\times$ Ex buffer 5  $\mu$ L, dNTP mix (2.5 mmol/L) 5  $\mu$ L, 模板2  $\mu$ L, 正向反向引物(25 mmol/L)

L)各0.8  $\mu$ L, Ex *Taq* (5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L。PCR扩增程序如下: 95 $^{\circ}$ C 预变性5min; 95 $^{\circ}$ C 变性30s, 52 $^{\circ}$ C 退火30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸1min, 扩增35个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸10min。经1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶, 用Universal DNA Purification Kit试剂盒回收纯化, 购自天根生化科技(北京)有限公司, 连接至pMD18-T载体(TaKaRa, 日本), 转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 挑选5个阳性克隆后, 送美吉公司双向测序, 测序引物为M13F-47与M13R-48。

基于上述获得的序列设计引物J-F (1203)、J-M3F1、J-M3F2 (表1)。利用Chang等<sup>[19]</sup>建立的端粒抑制PCR (TSP-PCR) 扩增。分别以AP12 (表1)/Actin800R1、Actin800F/AP12、J-M3F1/AP12为上下游引物进行第一轮PCR, 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 2min, 72 $^{\circ}$ C 4min, 重复7个循环, 再94 $^{\circ}$ C 2min, 67 $^{\circ}$ C 4min, 重复32个循环, 然后67 $^{\circ}$ C 4min。再分别以AP1 (表1)/Actin800R1、Actin800F/AP1、J-M3F1/AP1为上下游引物做第二轮巢式PCR, AP2 (表1)/Actin800R1、J-F (1203)/AP2、J-M3F2/AP2为上下游引物做第三轮巢式PCR。扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 25s, 72 $^{\circ}$ C 4min, 重复5个循环, 再94 $^{\circ}$ C 25s, 67 $^{\circ}$ C 4min, 重复20个循环, 然后67 $^{\circ}$ C 4min。连续3轮PCR, 获得基因左端序列片段AP2/Actin800R1和右端序列J-F (1203)/AP2以及J-M3F2/AP2。扩增产物经切胶回收、转化、克隆测序, 拼接得到大核基因序列全长, 并提交至GenBank, 登录号为KX602204。

**小核 *Actin I* 基因序列的获得** 根据已报道 *Oxytricha* 属的小核 *Actin I* 基因乱序结构, 在推测出的乱序区MDS3/4和MDS1上分别设计上、下游引物, J-F (673)(表2)和J-(133RC)(表2), 使用巢式PCR和降落PCR扩增(95 $^{\circ}$ C 预变性5min, 95 $^{\circ}$ C 变性30s, 67 $^{\circ}$ C 退火30s, 之后退火温度依次降低1 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 延伸2min, 扩增15个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性30s, 52 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸2min, 扩增30个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸10min)。得到目的条带。切胶回收、转化、克隆测序, 获得小核部分基因片段。

在已获得的小核基因序列的基础上设计多条引物J-M9F、J-F (42)、J-M8R、J-I1F、J-I2F、J-R (1550)(表1)。再分别以J-M9F/J-M8R、J-M3F1/J-(133RC)、J-I1F/J-M8R为上下游引物进行首轮PCR, J-F (42)/J-M8R、J-M3F2/J-R (1550)、J-I2F/J-M8R进行巢式PCR, 扩增得到片段J-F (42)/J-M8R、J-M3F2/J-R (1550)、J-I2F/J-M8R。覆盖小核基因全长。拼接获得小核基因序列全长(图1), 并提交至GenBank, 登录号为KX602205。

表1 大、小核 *Actin I* 基因所用引物名称及序列

Tab. 1 The name and sequence of primers for macro- and micronuclear *Actin I* gene

引物名称Name	引物序列Sequence (5'-3')
Actin800F	AACTGGGAYGAYATGGARAAGAT
Actin800R1	ATCCACATKSHGGCGAAGGT
J-F(1203)	GGTTATTGCCAGCCAGACAGAA
J-M3F1	TTTCTCAGGTGAGGATGCTCC
J-M3F2	TCCCATCAATCGTCGGTAGACCC GTAATACGACTCTATAGGGCAGCGTGGT
AP12	CGACGGCCCCGGCTGGTCCCCAAAACCCC AAAACCCCAAAA
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCAGCGTGGT
J-F(673)	TGTGATGCTGGTGATGGTGTAC
J-(133RC)	CCCTACTAATCTCATTCTTGGCAT
J-M9F	TGCCCTATCAAAGTATTCCTA
J-F(42)	CCATCAGTAAATTTGACACTACTAT
J-M8R	CTCATTCAACCTGTCCGTAAC
J-I1F	CATTATGGATTTATGTTTATTGGTG
J-I2F	CCCAAGTCAATCAACAAAAGTATC
J-R(1550)	TTGAAACTAATCTGAATAAAAATG

表 2 大、小核  $\alpha$ -TBP 基因所用引物名称及序列Tab. 2 The name and sequence of primers for macro- and micronuclear  $\alpha$ -TBP gene

引物名称 Name	引物序列 Sequence (5'-3')
$\alpha$ TBP-R	GTGTCCTTRATGARRTAGAAWCC
J-R2	TTGAAGAAGTTAGCACCCGAGACCGT
J-R1	GTCGGAGGGTTCATCTTGGTTACG
J-M5F1	TCTACAACAGTTCATGGGCTCTC
J-M5F2	CACTTGAGGAAATCAGTGGTGCTG
J-M2R	TGAGTCACCAGTTCCTTTTAGC
J-M1F1	TTGAGATATGTGGCTGGATTG
J-M1F2	GGCTGGATTTGAAAATACGAGTAG
J-I4R	GTAGGTAAATTAAGATTGGC
J-M9F	TTAAGGATGGCTCAGGTCAAGT
J-M8F1	TTGTTGAGCCCACTTTCTGATG
J-M8F2	CGAAAACCTGGAGGATCTTAGCA
J-M11F	GGTGAGGTAGTAAGAATCAGATC
J-M10R	GTGGGAATTTAAGTTAAAGAGC
J-I9F	GAGAAGTCTATAAGTAAAAGTGCC
J-R(2133)	GATTATAAAATGATTAAGATCATG
J-I13R2	CTTATCATAAACATTATTCAC

大、小核  $\alpha$ -TBP 基因序列的获得 根据上文描述的方法测定 *Oxytricha* sp. (ZJ) 的  $\alpha$ -TBP 基因的完整大核序列。大核扩增所用引物为  $\alpha$ TBP-F、 $\alpha$ TBP-R、J-R2、J-R1、J-M5F1、J-M5F2 (表 2)。小核所用引物为 J-M2R、J-M1F1、J-M1F2、J-I4R、J-M9F、J-M8F1、J-M8F2、J-M11F、J-M10R、J-I9F、J-R (2133)、J-I13R2 (表 2、图 2)，并提交至 GenBank，大核基因登录号为 KX602208，小核基因为 KX602209。

大、小核 DNA *pol*  $\alpha$  基因序列的获得 基于上文描述的方式获得 *Oxytricha* sp. (ZJ) 的 DNA *pol*  $\alpha$  基因完整的大核序列。引物为 Pol  $\alpha$ -F、Pol  $\alpha$ -R、

J-R2 (DP $\alpha$ )、J-R1 (DP $\alpha$ )、J-F3 (DP $\alpha$ )、J-F4 (DP $\alpha$ ) (表 3)，得到 DNA *pol*  $\alpha$  基因完整的大核序列。

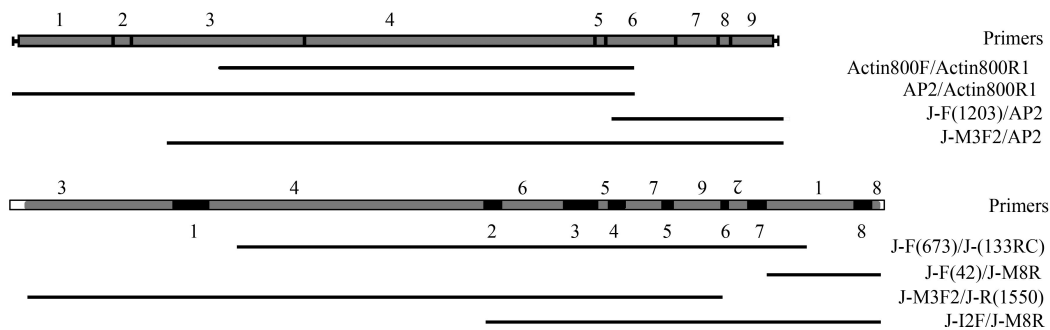
因在 DNA *pol*  $\alpha$  基因小核序列扩增时，扩增结果均为大、小核基因序列的嵌合体，故只获得部分序列。所用引物为 J-M32F、J-M1R1、J-M1R2、J-L1F、J-R5R、J-R6R、J-R9R、J-5000R、J-5100R (表 3、图 3)，并提交至 GenBank，大核基因登录号为 KX602206，小核基因为 KX602207。

大核 *Actin I* 基因系统树的构建 因为已完成大核  $\alpha$ -TBP 基因和 DNA *pol*  $\alpha$  基因测序的尖毛虫物种数目太少 (仅 3 种)，故而只依据 *Actin I* 基因序列构建系统树。除本工作测得序列 (序列号为: KX-602204) 外，另外 7 条序列源于 Genbank 数据库 (序列号为: U63567、AF508049、AF508050、AY044839、U18940、U63566、M22480)。使用 Bioedit 7.1.9.0<sup>[24]</sup> 内置 Clustal 进行多序列比对，序列末端截平，并手动调整删除空格或比对模糊序列。本工作使用 Mr-Modeltest 2<sup>[25]</sup> 进行核酸模型筛选 GTR+G+I，使用 MrBayes 3.1.2<sup>[26]</sup> 构建了贝叶斯树 (Bayesian inference, BI)。用马尔科夫链的蒙特卡洛方法 (MCMC) 设置为 4 条链，运行 1000000 代，每 100 代进行抽样，以后验概率来表示各分支的可信性。TreeView v5.1.2<sup>[27]</sup>、MEGA7<sup>[28]</sup> 等软件用于树形图的美化。

## 2 结果

### 2.1 *Oxytricha* sp. (ZJ) 的大、小核 *Actin I* 基因结构特征

*Oxytricha* sp. (ZJ) 的大核 *Actin I* 基因全长为 1546 bp (含端粒序列)。含有编码 375 个氨基酸的开放阅读框 (ORF)，其 AT 含量为 53.81%。5' 和 3' 非编码区的序列长度分别为 198 bp (含 20 bp 端粒序列) 和 226 bp (含 20 bp 端粒序列)，AT 含量分别为

图 1 *Oxytricha* sp. (ZJ) 大、小核 *Actin I* 基因结构、引物位置及获得的 PCR 产物示意图Fig. 1 Schematic illustration of macro- and micronuclear structures, PCR primer locations and products obtained in *Oxytricha* sp. (ZJ) *Actin I* gene

灰色方块代表 MDSs，黑色方块代表 IESs；其中 MDS2 倒置；白色方块代表未得到的基因区域，下同 MDSs are represented in grey, IESs are represented in black; MDS2 is inverted; white box represents unavailable gene region; the same applies below

表3 大、小核DNA *pol α*基因所用引物名称及序列

Tab. 3 The name and sequence of primers for macro- and micronuclear DNA *pol α* gene

引物名称Name	引物序列Sequence (5'-3')
Pol α-F	CTAYTGGATHGATGCWCATG
Pol α-R	CACCAVTCTCTWCKNACCATATC
J-R2(DPα)	CTAGTAACTGGCTTGCATCTCC
J-R1(DPα)	AGTGCCTCTAGCTTTGCCTTTC
J-F3(DPα)	CGATGGAGTGTTTAAGAGTTTAC
J-F4(DPα)	ATCACCAGATGCTAAAGTTGTGC
J-M32F	CGTTTCTGAACTAAATCTCT
J-M1R1	CCTCTCTCCTGACTATGTTGTA
J-M1R2	TTTAGTTCATCTTTACGCCAG
J-L1F	TCCACTCATCATTTTTTACTGC
J-R5R	CTAGTAACTGGCTTGCATCTCC
J-R6R	AATGTGTTTCCAGTGACWGTGCT
J-R9R	TCTTTCTCTGTCTGAGTTGCTA
J-5000R	CATGCTCACTCTCTTAATACCTC
J-5100R	GCTAAACCCCATGTAGAAAAGTTG

73.71%和62.87%。5个阳性菌斑测序累计检测到59个碱基变异位点,其中ORF含有38个碱基变异位点,涉及12个氨基酸的差异,未引起移码突变或无义突变。剩余的碱基变异位点,有5个位于5'非编码区,16个位于3'非编码区。推测多克隆间序列差异是由于基因重复现象引起<sup>[29]</sup>。

*Oxytricha* sp. (ZJ)的小核*Actin I*基因序列长度为1775 bp。通过与大核序列比对确定该小核基因由8个IESs和9个MDSs组成。IESs序列长度为11—79 bp, MDSs序列长度为19—583 bp。MDS/IES交接处有5—13 bp的指针重复序列。8个IESs均为富含AT的序列(68.00%—100.00%)(表4)。MDSs按照3-4-6-5-7-9-2-1-8的顺序排列,其中MDS2为倒置排列(图1)。

基于尖毛虫属内8个物种的大核*Actin I*基因序列建的贝叶斯树(图4a)中, *Oxytricha trifallax*、*O. fallax*与*O. granulifera*以最高置信值聚为一支,其余5个物种*O. longa*、*O. sp. (Misty)*、*O. nova*、*O. sp. (Aspen)*、*O. sp. (ZJ)*聚为一支。

2.2 *Oxytricha* sp. (ZJ)的大、小核*α-TBP*基因结构特征

*Oxytricha* sp. (ZJ)的大核*α-TBP*基因全长为2140 bp。含有编码495个氨基酸的ORF,其AT含量为53.56%。5'和3'非编码区的序列长度分别为170 bp(含20 bp端粒序列)和438 bp(含20 bp端粒序列),AT含量分别为74.83%和66.50%。通过与前人数据<sup>[22]</sup>比较,找到一个长度为53 bp、富含AT(77.36%)的内含子序列。5个阳性克隆测序累计检测到107个碱基变异位点,其中ORF含有49个碱基变异位点,

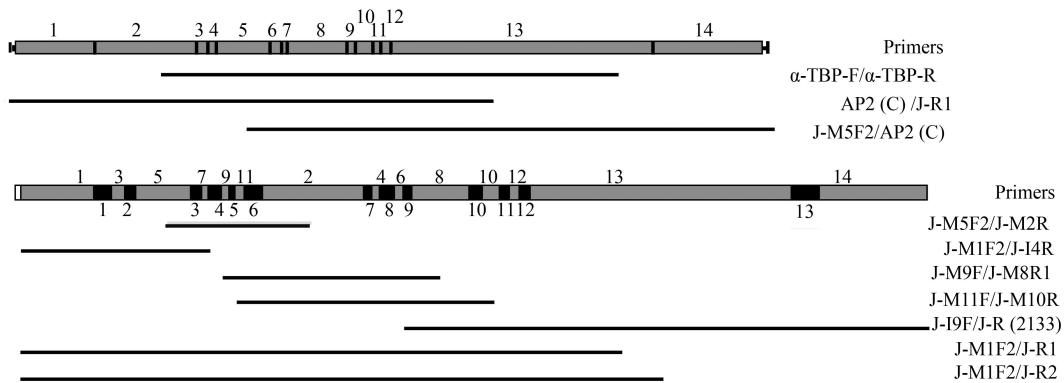


图2 *Oxytricha* sp. (ZJ)大、小核*α-TBP*基因结构、引物位置及获得的PCR产物示意图

Fig. 2 Schematic illustration of macro- and micronuclear structures, PCR primer locations and products obtained in *Oxytricha* sp. (ZJ) *α-TBP* gene

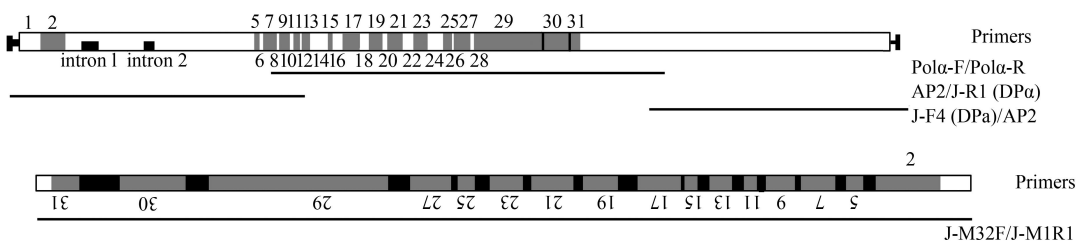


图3 *Oxytricha* sp. (ZJ)大、小核DNA *pol α*基因结构、引物位置及获得的PCR产物示意图

Fig. 3 Schematic illustration of macro- and micronuclear structures, PCR primer locations and products obtained in *Oxytricha* sp. (ZJ) DNA *pol α* gene



表 4 *Oxytricha* sp. (ZJ) 小核 *Actin I* 基因的 MDSs、IESs 及指针序列Tab. 4 Characteristics of MDSs, IESs, and pointer sequences in *Oxytricha* sp. (ZJ) *Actin I* gene

MDSn	MDSn 的长度 Length of MDSn	MDSn 和 (n+1) 间的指针序列 Pointer sequence between MDSn and (n+1)	MDSi 和 MDSj 间 IESs 的长度 Length of IESs between MDSi and MDSj	IESs AT 含量 IESs AT content (%)	
1	196	ACAACAAACTTGC	3—4	79	79.75
2	35	? ...GGCTGG	4—6	30	73.33
3	338	TCTCT	6—5	68	83.82
4	583	CCAAGTCAATCAA	5—7	30	80.00
5	19	TATTRCCAGC	7—9	11	100.00
6	139	CTGAGCAATCA	9—2	21	90.48
7	87	TTAACWATTTR	2—1	26	80.77
8	?	AGGTGG...?	1—8	25	68.00
9	99		6—8		

注: MDSs 和 IESs 的长度都包括了一拷贝的指针序列; 不同克隆间指针序列的差异用兼并碱基表示; 问号代表数值或序列无法确定

Note: Length of MDSs include pointers on both ends; IESs exclude pointer sequences; Use degenerate symbols reflects differences between clones; Question marks indicate undetermined information

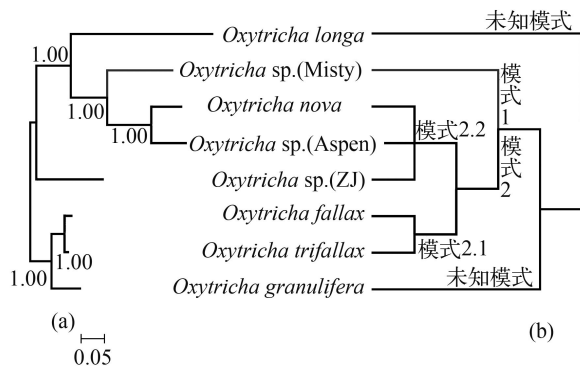


图 4 基于 *Actin I* 基因序列构建的贝叶斯树(a)与 *Actin I* 基因结构进化路线图(b)

Fig. 4 Bayesian trees based on the sequences of *Actin I* gene (a), and evolutionary route map of *Actin I* gene structure (b)

涉及 19 个氨基酸的差异, 未引起移码突变或无义突变。剩余的碱基变异位点, 有 2 个位于 5' 非编码区, 53 个位于 3' 非编码区, 3 个位于内含子。

*Oxytricha* sp. (ZJ) 小核  $\alpha$ -TBP 基因序列长度为 2562 bp。通过与大核序列比对确定该小核基因由 13 个 IESs 和 14 个 MDSs 组成。IESs 序列长度为 16—71 bp, MDSs 序列长度为 13—731 bp。在 MDS/IES 交接处有 5—11 bp 的指针重复序列。13 个 IESs 中, 除 MDS1/MDS3 间的 AT 含量较低外 (52.38%), 其他 12 个 IESs 均为富含 AT 序列 (62.50%—87.32%) (表 5)。MDSs 按照 1-3-5-7-9-11-2-4-6-8-10-12-13-14 的顺序排列, 标号为奇数的 MDSs 与标号为偶数的 MDSs 各自簇集在一起 (图 2)。

### 2.3 *Oxytricha* sp. (ZJ) 的大、小核 DNA *pol* $\alpha$ 基因结构特征

*Oxytricha* sp. (ZJ) 大核 DNA *pol*  $\alpha$  基因全长为

5118 bp。含有编码 1534 个氨基酸的 ORF, 其 AT 含量约为 62.15%。含两个长度分别为 96 bp (intron-1) 和 49 bp (intron-2) 的内含子, AT 含量分别为 71.88% 和 69.39%。5' 和 3' 非编码区的序列长度分别为 158 bp (含 20 bp 端粒序列) 和 216 bp (含 20 bp 端粒序列), AT 含量分别为 71.85% 和 74.09%。5 个阳性克隆测序累计检测到 205 个碱基变异位点, 其中 ORF 含有 184 个碱基变异位点, 涉及 39 个氨基酸的差异, 未引起移码突变或无义突变。剩余的碱基变异位点, 有 5 个位于 5' 非编码区, 5 个位于 3' 非编码区, 8 个位于 intron-1, 3 个位于 intron-2。

已获得 *Oxytricha* sp. (ZJ) 的小核 DNA *pol*  $\alpha$  基因片段长度为 2068 bp。包括 15 个富含 AT 序列 (62.50%—90.91%) 的 IESs, 14 个包含两端指针序列的完整 MDSs (5-7-9-11-13-15-17-19-21-23-25-27-29-30) (表 6), 以及 2 个 MDSs (2 和 32) 的部分区域。并由此确定了另 13 个 MDSs (1-6-8-10-12-14-16-18-20-22-24-26-28) 的位置 (不包含指针序列), 指针序列只能在相连的 3 个 MDSs (29-30-31) 间被确定出来 (图 3)。

## 3 讨论

### 3.1 尖毛虫属小核 *Actin I* 基因的乱序模式

*Actin I* 基因是腹毛类纤毛虫中最早发现的乱序基因<sup>[4]</sup>。目前尖毛虫属已知小核 *Actin I* 基因结构的物种共包括 5 个: *Oxytricha trifallax*、*O. nova*、*O. fallax*、*O. sp. (Aspen)*、*O. sp. (Misty)*。根据 Hogan 等<sup>[12]</sup>推测的腹毛类小核 *Actin I* 基因结构进化路线, 尖毛虫属内小核 *Actin I* 基因乱序模式分为两种情况: *O. sp. (Misty)* 与 *Stylonychia pustu-*

表 5 *Oxytricha* sp. (ZJ)小核 $\alpha$ -TBP基因的MDSs/IESs及指针序列Tab. 5 Characteristics of MDSs, IESs, and pointer sequences in *Oxytricha* sp. (ZJ)  $\alpha$ -TBP gene

MDSn	MDSn的长度 Length of MDSn	MDSn和(n+1)间的指针序列 Pointer sequence between MDSn and (n+1)	MDSi和MDSj间IES的长度 Length of IESs between MDSi and MDSj	IESs AT含量 IESs AT content (%)
1	223	GGTGCAC	1—3	21
2	282	GTCTYGTA	3—5	33
3	35	ATTCACA	5—7	29
4	22	ATTAGAGT	7—9	42
5	158	TCGCWCATTC	9—11	16
6	27	AGAAGTC	11—2	50
7	13	TGCCACT	2—4	20
8	173	TCAAGCTTAA	4—6	45
9	21	AGTTTT	6—8	19
10	48	CTGGTGA	8—10	30
11	26	ATCAGCTACTT	10—12	25
12	28	AAAGT	12—13	34
13	731	TAAGTRAT	13—14	71
14	312			

注: MDSs和IESs的长度都包括了一拷贝的指针序列; 不同克隆间指针序列的差异用兼并碱基表示

Note: Length of MDSs include pointers on both ends; IESs exclude pointer sequences; Use degenerate symbols reflects differences between clones

表 6 *Oxytricha* sp. (ZJ)小核DNA *pol a* 基因片段MDSs, IESs及指针序列Tab. 6 Characteristics of MDSs, IESs, and pointer sequences in *Oxytricha* sp. (ZJ) DNA *pol a* gene segment

MDSn	MDSn的长度 Length of MDSn	MDSn和(n+1)间的指针序列 Pointer sequence between MDSn and (n+1)	MDSi和MDSj间IES的长度 Length of IESs between MDSi and MDSj	IESs AT含量 IESs AT content (%)
2	?	?	2—5	24
5	39	?	5—7	22
7	85	?	7—9	11
9	70	?	9—11	17
11	39	?	11—13	20
13	55	?	13—15	26
15	32	?	15—17	5
17	101	?	17—19	42
19	86	?	19—21	17
21	100	?	21—23	14
23	82	?	23—25	31
25	40	?	25—27	14
27	97	?	27—29	50
29	418	AACAT	29—30	43
30	160	TGAAGAA	30—31	85
31	?			

注: MDSs的长度包括了两端的指针序列; IESs的长度不含指针序列; 问号代表数值无法确定

Note: Length of MDSs include pointers on both ends; IESs exclude pointer sequences; Question marks indicate undetermined information

*lata*拥有较为相似的模式(模式1); *O. trifallax*、*O. nova*、*O. sp.* (Aspen)模式(模式2)相近。而之后报道的*O. fallax*与我们新测序的*O. sp.* (ZJ)模式可归入模式2。

尖毛虫属内小核*Actin I* 基因乱序模式2所涉及的5个物种可以分为2种情况: (1) *Oxytricha fallax*与*O. trifallax*两个种群*Actin I* 的小核基因乱序模式均为3-4-6-5-7-9-10-2-1-8 (模式2.1)。DuBois和

Prescott等<sup>[12]</sup>将三者视为*O. trifallax*-*O. fallax*群组,代表了一个单一种。(2) *O. sp. (ZJ)*小核*Actin I*基因由8个IESs和9个MDSs组成,同属内的*O. nova*在组成数目上完全相同,且2个物种的MDSs排列顺序均为3-4-6-5-7-9-2-1-8(模式2.2)<sup>[1]</sup>,比模式2.1少了长的IES6与非常短的MDS10。*O. sp. (Aspen)*<sup>[11]</sup>仅有部分小核*Actin I*基因完成测序,Hogan等<sup>[12]</sup>推测其乱序模式与*O. nova*(模式2.2)相似,鉴于数据的不完整性,在此我们不做详细讨论。

对比基于大核*Actin I*基因序列构建的系统树(图4a)与小核*Actin I*基因结构进化路线(图4b)可以看出,二者存在一定的相似之处,但却不完全相同。在图4a中作为姐妹枝出现的*Oxytricha fallax*与*O. trifallax*的小核*Actin I*乱序模式均为2.1,拥有10个MDSs(图4b)。但是,在大核*Actin I*基因系统树中(图4a),同属于小核*Actin I*乱序模式2.2(图4b)的3个物种*O. nova*、*O. sp. (Aspen)*、*O. sp. (ZJ)*并未聚在一起。这表明,大小核*Actin I*基因进化路线并不完全一致。

模式2.1、2.2之间,在IESs的长度方面均具有较大差异。在模式2.1中,*Oxytricha trifallax*的IESs长度为19—276 bp<sup>[10]</sup>;而在模式2.2中,*O. sp. (ZJ)*和*O. nova*的IESs长度分别是11—79 bp(本研究)、11—109 bp<sup>[4]</sup>。这符合前人的推测:由于IESs的快速进化与易变性,在进化过程中其长度也发生了改变,而小核*Actin I*基因进化过程中,IESs的长度比其序列更为保守<sup>[15]</sup>。凭IESs的序列很难推断进化的图式。

在模式2.1中,*Oxytricha trifallax*的指针序列长度为2—14 bp<sup>[11]</sup>;而在模式2.2中,*O. nova*和*O. sp. (ZJ)*的指针序列长度范围较为接近,分别为5—13 bp<sup>[4]</sup>和4—13 bp(表4)。但相同乱序模式的物种指针序列并未发现具有更多序列相似性。

MDSs在进化的过程中存在MIJ(MDS-IES junctions)移动现象<sup>[10, 15, 16, 20]</sup>,这种移动通常在有限范围之内。DuBois等<sup>[10]</sup>提出,乱序MDSs之间的MIJ移动比非乱序MDSs之间的更保守,移动距离更短。在本研究中(图5),我们得出不同结论。对比模式2.2 *O. sp. (ZJ)*与*O. nova*发生的MIJ移动,乱序MDSs之间移动最大达79 bp(MDS7-MDS9),唯一的非乱序MDSs(MDS3-MDS4)之间为161 bp,符合前人推测,乱序MDSs之间的MIJ移动更为保守。而对比模式2.1的*O. trifallax*与模式2.2的*O. sp. (ZJ)*,乱序MDSs之间MIJ的移动范围为12—66 bp,非乱序MDS3/4的对应边缘却相对保守,仅相差23 bp,由此可见MIJ移动距离与MDSs是否乱序并无直接关系,

预示着DuBois等<sup>[10]</sup>的观点并不具有通用性。有意思的是,非乱序MDS3/MDS4之间的MIJ移动距离,同为模式2.2的*O. sp. (ZJ)*与*O. nova*之间移动距离为161 bp,不同模式的*O. trifallax*与*O. nova*之间移动距离为138 bp<sup>[15]</sup>,而不同模式的*O. trifallax*与*O. sp. (ZJ)*之间移动距离为23 bp。我们推测祖先种的小核*Actin I*基因在MDS3-4对应区域具有两个IESs和3个MDSs,在*O. nova*(模式2.2)进化过程中丢失了前一个IES,在*O. trifallax*(模式2.1)和*O. sp. (ZJ)*(模式2.2)分别的进化过程中丢失了后一个IES,最终3个物种均在该区域保留了2个MDSs和1个IES,造成了上述MIJ移动距离的差距。因此,我们赞成DuBois等<sup>[10]</sup>的观点,认为MDS3/4之间MIJ移动可能是由于IES的插入/缺失造成的。由于MIJ移动距离较大,我们不赞成是指针序列的突变<sup>[15, 16]</sup>造成此MIJ移动。同时我们注意到属于同一乱序模式2.2的两个物种[*O. nova*和*O. sp. (ZJ)*]并未按照同样模式保留或缺失IESs,该现象有待我们进一步研究。

### 3.2 尖毛虫属小核 $\alpha$ -TBP基因的乱序模式

目前尖毛虫属已知小核 $\alpha$ -TBP基因结构的物种共包括2个:*Oxytricha trifallax*、*O. nova*。我们的研究表明,*O. sp. (ZJ)*小核 $\alpha$ -TBP基因由13个IESs和14个MDSs组成,与同属的*O. nova*一致<sup>[8]</sup>,说明在这两个种分化过程中该小核基因没有发生新的MDS片段的重组或易位。与之相对比,*O. trifallax*多了位于非乱序区的3个MDSs和3个IESs<sup>[15]</sup>(图2)。猜测这两种不同的模式是由于IES的插入/丢失造成。*O. sp. (ZJ)*与*O. nova*的MDSs排列模式为1-3-5-7-9-11-2-4-6-8-10-12-13-14<sup>[8]</sup>;而*O. trifallax*排列模式为1-3-5-7-10-12-2-4-6-8-9-11-13-14-15-16-17<sup>[15]</sup>。*O. sp. (ZJ)*、*O. nova*中的MDS8、MDS13-14分别与*O. trifallax*中的MDS8-9、MDS14-17同源(图6)。

*Oxytricha sp. (ZJ)*、*O. nova*的IESs数目均为13个,二者的长度差别不大,分别为16—71 bp、11—55 bp;而*O. trifallax*的IESs数目为16个,长度为5—108 bp<sup>[15]</sup>。*O. sp. (ZJ)*和*O. nova*中的IESs10, 11, 12与*O. trifallax*中的IESs11, 12, 13相对应。与小核*Actin I*的结果相似,*O. sp. (ZJ)*与*O. nova*具有同样 $\alpha$ -TBP基因乱序模式,且IESs的长度较为一致,*O. sp. (ZJ)*、*O. nova*、*O. trifallax*的IES平均长度分别为33、26和35 bp。*O. sp. (ZJ)*(16 bp)和*O. nova*(8 bp)最短的IES是IES5,而*O. trifallax*最短的为IES9(5 bp)<sup>[8, 15]</sup>。由此可见,IESs的长度、数目具有物种特异性。

模式2.1的*Oxytricha trifallax*指针序列长度为

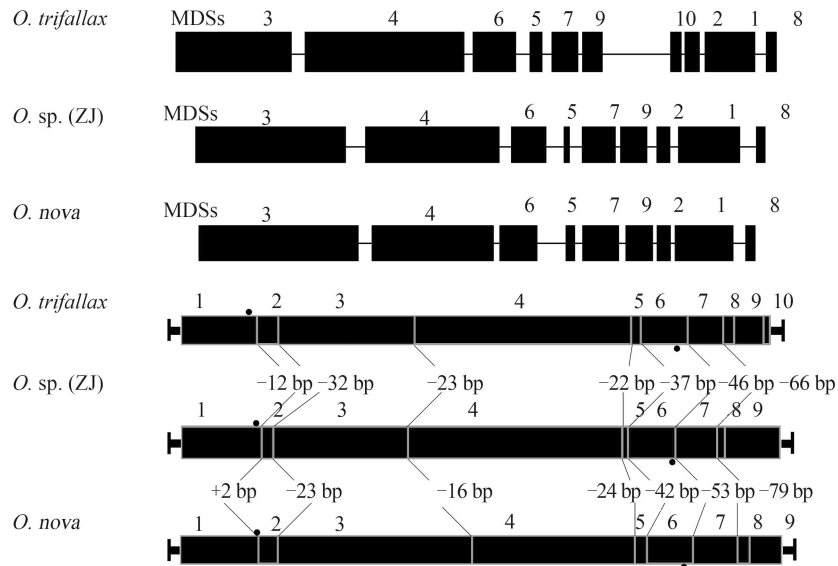


图 5 *Oxytricha* sp. (ZJ)、*O. nova*和*O. trifallax*大、小核Actin I 基因结构模式图(参照DuBois 等, 1995<sup>[10]</sup>)

Fig. 5 Schematic illustration of macro- and micronuclear Actin I gene structures of *Oxytricha* sp. (ZJ), *O. nova* and *O. trifallax* (reference DuBois, et al., 1995<sup>[10]</sup>)

梯形代表端粒, 黑色圆点代表起始密码子与终止密码子

Ladder represent telomeres, black dots mark the pointer of start and stop codons

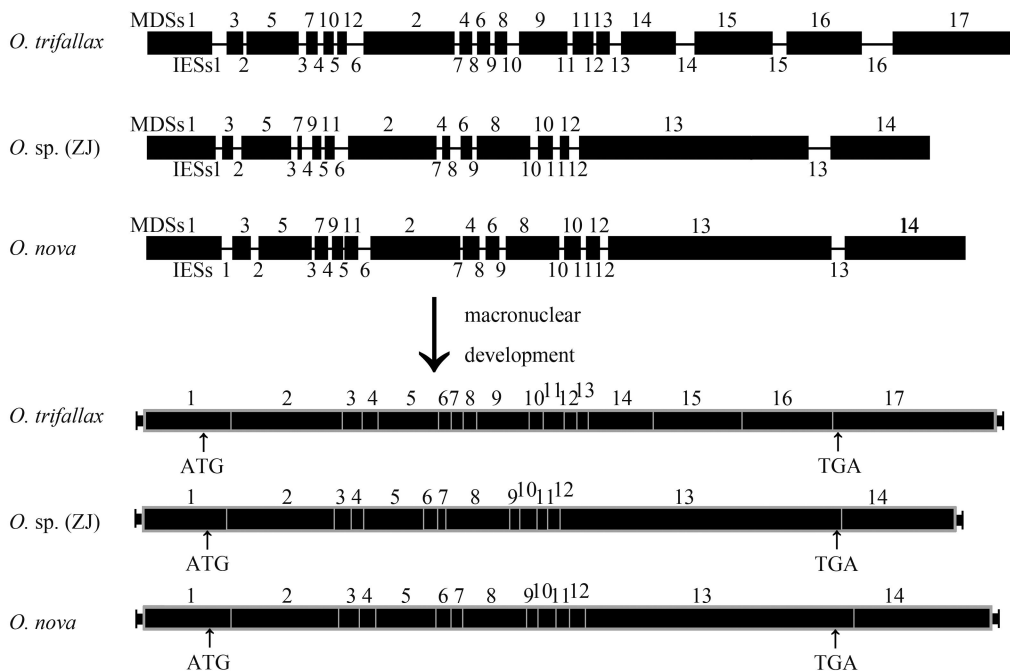


图 6 *Oxytricha* sp. (ZJ)、*O. nova*和*O. trifallax*大、小核 $\alpha$ -TBP基因结构模式图(参照Prescott 等, 1998<sup>[15]</sup>)

Fig. 6 Schematic illustration of macro- and micronuclear  $\alpha$ -TBP gene structures of *Oxytricha* sp. (ZJ), *O. nova* and *O. trifallax* (reference Prescott, et al., 1998<sup>[15]</sup>)

7—17 bp<sup>[15]</sup>, 模式2.2的*O. nova*和*O. sp. (ZJ)*的指针序列长度分别为为3—19 bp<sup>[8]</sup>、5—11 bp (表 5), 长度范围差异大。相同乱序模式的物种指针序列并未发现具有更多序列相似性。

### 3.3 尖毛虫属小核DNA pol $\alpha$ 基因的乱序模式

与小核Actin I 和 $\alpha$ -TBP基因相比, DNA pol

$\alpha$ 基因乱序程度更为复杂, 基因序列更长, 乱序模式为非随机排列<sup>[9]</sup>。目前, 尖毛虫属已知小核DNA pol  $\alpha$ 基因结构的物种共包括2个: *Oxytricha trifallax*、*O. nova*。我们的研究未能获取*O. sp. (ZJ)*的小核DNA pol  $\alpha$ 基因全长。根据扩增出的*O. sp. (ZJ)*小核DNA pol  $\alpha$ 基因部分序列, 我们确定出14个完整



MDSs (排列模式为5-7-9-11-13-15-17-19-21-23-25-27-29-30), 并推测出未扩增成功的16个MDSs (MDSs1-2、偶数MDSs6-28、MDSs31-32)的位置, 同时推测MDS3与MDS4可能丢失。 *O. trifallax* 包含至少51个MDSs和50个IESs<sup>[17]</sup>, *O. nova* 包含至少45个MDSs和44个IESs<sup>[9]</sup>。通过比对分析(图7), 我们发现 *O. sp. (ZJ)* 含有3个非乱序排列的MDSs, 分别是MDS29、MDS30、MDS31, 而在 *O. trifallax* 和 *O. nova* 中分别是9个和7个非乱序排列的MDSs<sup>[17]</sup>。

模式2.1的 *Oxytricha trifallax* 指针序列长度为2—15 bp<sup>[17]</sup>, 模式2.2的 *O. nova* 指针序列长度为2—16 bp<sup>[9]</sup>。本研究中未获得 *O. sp. (ZJ)* 的DNA *pol*  $\alpha$  基因序列全长, 很多指针序列无法推测(表6), 故而本研究未对该基因不同物种间指针序列进行对比。

我们确定出的 *Oxytricha sp. (ZJ)* 小核DNA *pol*  $\alpha$  基因的14个完整MDSs位于倒置区域。 *O. sp. (ZJ)* 的MDS7对应 *O. nova* 的MDS6, 与 *O. trifallax* 的MDS7-8-9同源, 并且MDS8在 *O. trifallax* 的小核基因主体部分中是缺失的<sup>[17]</sup>。据此合理推断是: (1) 此区域由3个MDSs组成, 且中间MDS的缺失代表了祖先种的基因结构特征。 *O. trifallax* 从祖先种分离时

保留了该结构特征。而在 *O. sp. (ZJ)* 和 *O. nova* 分化前的进化过程中将3个MDSs融合成了一个MDS。(2) 为第一种可能的反向进程, 即祖先种在此区域为一个MDS结构, 而在 *O. trifallax* 从祖先种分化时, 独立的发生了一次重组将中间的部分转离了小核基因的主体部分, 类似移位现象, 使得一个MDS变成了3个MDSs。之前Wong等<sup>[16]</sup>的研究表明, 在种系分离自共同祖先后, 独立发生编码区域的重新划分和融合。

因 *Oxytricha sp. (ZJ)* 的MDS7与 *O. trifallax* 的MDS7-8-9同源, 且 *O. trifallax* 在此处的IES与 *O. sp. (ZJ)* 的MDS7对应区域的序列完全一致(图8), 表明在 *O. sp. (ZJ)* 的进化过程中可能将该IES同化成了MDS的一部分, 即发生IES向MDS的转换, 伴随此种转换, 使得原先3个MDSs融合成了一个MDS, 而原先位于中间的MDS被丢弃。这个转换过程呈现出腹毛类纤毛虫小核基因在进化过程中方式的多样性。这支持了上述第一种解释, 即在 *O. sp. (ZJ)* 和 *O. nova* 分化前的进化过程中将3个MDSs融合成了一个MDS。Duharcourt等<sup>[30]</sup>在 *Paramecium* 中与Chalker与Yao<sup>[31]</sup>在 *Tetrahymena* 中都发现了旧大核的IESs在新大核中的保留现象。而Mollenbeck

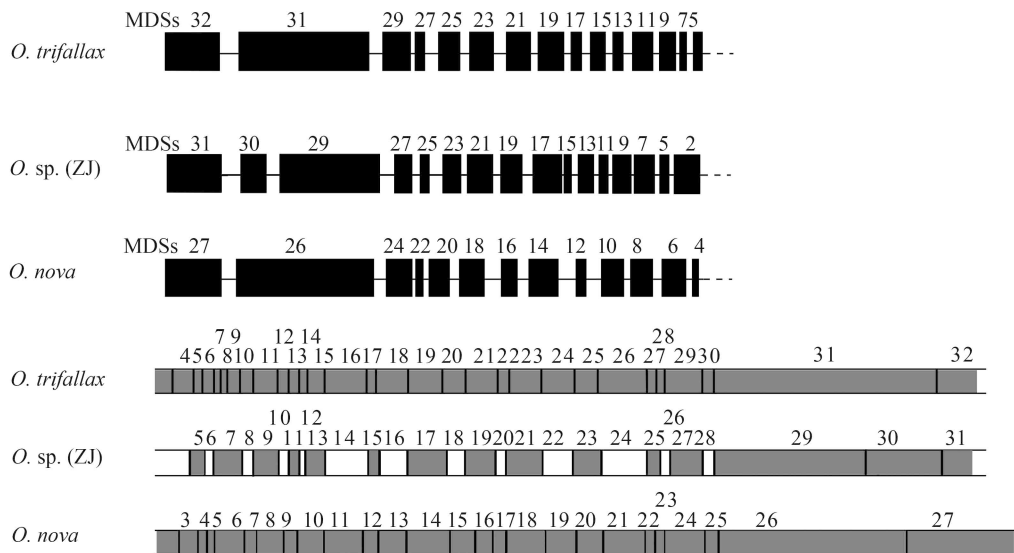


图7 *Oxytricha sp. (ZJ)*、*O. nova* 和 *O. trifallax* 大、小核DNA *pol*  $\alpha$  基因片段结构示意图(参照Hoffman等, 1997<sup>[17]</sup>)

Fig. 7 Schematic illustration of macro- and micronuclear DNA *pol*  $\alpha$  gene structures of *Oxytricha sp. (ZJ)*, *O. nova* and *O. trifallax* (reference Hoffman, et al., 1997<sup>[17]</sup>)

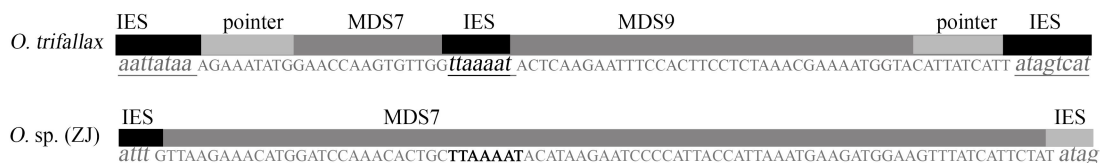


图8 *Oxytricha sp. (ZJ)* 进化过程中IES向MDS的转变

Fig. 8 IES to MDS transformation during *Oxytricha sp. (ZJ)* evolution

等<sup>[19]</sup>通过比较*Stylonychia lemnae*两种群的小核 *Actin I* 基因发现,发现IES向MDS转变的迹象,但这种转变发生在非编码区,未对基因的开放阅读框造成影响。本实验则发现编码区内IES向MDS的转变,使得本应删除的序列成为基因组永久保留的一部分。

#### 参考文献:

- [1] Prescott D M, Greslin A F. Scrambled *Actin I* gene in the micronucleus of *Oxytricha nova* [J]. *Developmental Genetics*, 1992, **13**(1): 66—74
- [2] Curtis E A, Landweber L F. Evolution of gene scrambling in ciliate micronuclear genes [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1999, **870**: 349—350
- [3] Nowacki M, Landweber L F. Epigenetic inheritance in ciliates [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2009, **12**(6): 638—643
- [4] Greslin A F, Prescott D M, Oka Y, *et al.* Reordering of nine exons is necessary to form a functional actin gene in *Oxytricha nova* [J]. *Genetics*, 1989, **86**(16): 6264—6268
- [5] Prescott D M. Genome gymnastics: unique modes of DNA evolution and processing in ciliates [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2000, **1**(3): 191—198
- [6] Katz L A, Kovner A M. Alternative processing of scrambled genes generates protein diversity in the ciliate *Chilodonella uncinata* [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution*, 2010, **314**(6): 480—488
- [7] Lauth M R, Spear B B, Heumann J, *et al.* DNA of ciliated protozoa: DNA sequence diminution during macronuclear development of *Oxytricha* [J]. *Cell*, 1976, **7**(1): 67—74
- [8] Mitcham J L, Lynn A J, Prescott D M. Analysis of a scrambled gene: the gene encoding  $\alpha$ -telomere-binding protein in *Oxytricha nova* [J]. *Genes & Development*, 1992, **6**(5): 788—800
- [9] Hoffman D C, Prescott D M. The germline gene encoding DNA polymerase  $\alpha$  in the hypotrichous ciliate *Oxytricha nova* is extremely scrambled [J]. *Nucleic Acids Research*, 1996, **24**(17): 3337—3340
- [10] DuBois M L, Prescott D M. Scrambling of the *Actin I* gene in two *Oxytricha* species [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, **92**(9): 3888—3892
- [11] DuBois M L, Prescott D M. Volatility of internal eliminated segments in germ line genes of hypotrichous ciliates [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, **17**(1): 326—337
- [12] Hogan D J, Hewitt E A, Orr K E, *et al.* Evolution of IESs and scrambling in the *Actin I* gene in hypotrichous ciliates [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, **98**(26): 15101—15106
- [13] Dalby A B, Prescott D M. The scrambled *Actin I* gene in *Uroleptus pisces* [J]. *Chromosoma*, 2004, **112**(5): 247—254
- [14] Möllenbeck M, Cavalcanti A R, Jönsson F, *et al.* Interconversion of germline-limited and somatic DNA in a scrambled gene [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 2006, **63**(1): 69—73
- [15] Prescott J D, DuBois M L, Prescott D M. Evolution of the scrambled germline gene encoding a-telomere binding protein in three hypotrichous ciliates [J]. *Chromosoma*, 1998, **107**(5): 293—303
- [16] Wong L C, Landweber L F. Evolution of programmed DNA rearrangements in a scrambled gene [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2006, **23**(4): 756—763
- [17] Hoffman D C, Prescott D M. Evolution of internal eliminated segments and scrambling in the micronuclear gene encoding DNA polymerase alpha in two *Oxytricha* species [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(10): 1883—1889
- [18] Landweber L F, Kuo T C, Curtis E A. Evolution and assembly of an extremely scrambled gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(7): 3298—3303
- [19] Chang W J, Stover N A, Addis V M, *et al.* A micronuclear locus containing three protein-coding genes remains linked during macronuclear development in the spirotrichous ciliate *Holosticha* [J]. *Protist*, 2004, **155**(2): 245—255
- [20] Chang W J, Bryson P D, Liang H, *et al.* The evolutionary origin of a complex scrambled gene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(42): 15149—15154
- [21] Chen T B, Yi Z Z, Huang J, *et al.* Evolution of the germline *Actin* gene in hypotrichous ciliates: multiple non-scrambled IESs at extremely conserved locations in two *Urostylids* [J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2014, **62**(2): 188—195
- [22] Swart E C, Bracht J R, Magrini V, *et al.* The *Oxytricha trifallax* macronuclear genome: a complex eukaryotic genome with 16,000 tiny chromosomes [J]. *PLoS Biology*, 2013, **11**(1): e1001473
- [23] Prescott D M. The evolutionary scrambling and developmental unscrambling of germline genes in hypotrichous ciliates [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(5): 1243—1250
- [24] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, **41**: 95—98
- [25] Nylander J A. MrModel test v2. Uppsala University. 2004
- [26] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes3: Bayesian phylo-

- genetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**(12): 1572—1574
- [27] Page R M. TreeView: An application to view phylogenetic trees on personal computers [J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, **12**(4): 357—358
- [28] Tamura B K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596—1599
- [29] Yi Z Z, Huang L J, Yang R, *et al.* Actin evolution in ciliates (Protist, Alveolata) is characterized by high diversity and three duplication events [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2016, **96**: 45—54
- [30] Duharcourt S, Lepère G, Meyer E. Developmental genome rearrangements in ciliates: a natural genomic subtraction mediated by non-coding transcripts [J]. *Trends in Genetics*, 2009, **25**(8): 344—350
- [31] Chalker D L, Yao M C. DNA elimination in ciliates: transposon domestication and genome surveillance [J]. *Annual Review of Genetics*, 2011, **45**: 227—246

## EVOLUTION OF THE SCRAMBLED PATTERN OF THE *ACTIN I*, $\alpha$ -TBP AND DNA *POL A* GENE WITHIN THE GENUS *OXYTRICHA* (PROTOZOA, CILIATES)

YANG Ran, CHEN Tian-Bing, HUANG Jun, SHI Wen-Jun, OU Shu-Qing and YI Zhen-Zhen

(Guangzhou Key Laboratory of Subtropical Biodiversity and Biomonitoring, School of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** Genes in the germline (micronuclear) genome of protozoan ciliates are interrupted by multiple, non-coding sequences called internal eliminated segments (IESs) and macronuclear destined segments (MDSs). In the micronucleus, the MDSs are not arranged sequentially but scrambled for some genes. Studying scrambled gene structures will provide a better understanding of the molecular mechanisms of its evolution. In this study, we compared the complete macronuclear gene sequences and complete/incomplete micronuclear gene sequences of *Actin I*,  $\alpha$ -telomere-binding protein ( $\alpha$ -TBP), and DNA polymerase  $\alpha$  (DNA *pol a*) of *Oxytricha* species (*Oxytricha* sp. (ZJ)) collected from water samples of Huguang mangrove in Zhanjiang with those of other *Oxytricha* species, and had 3 major findings. The scrambled patterns of the micronuclear *Actin I* gene in *O.* sp. (ZJ) were similar with those of *O. nova*, but shown significant differences with other species in genus *Oxytricha*. We revealed that the shifts of MDS-IES junctions between scrambled MDSs are not more conservative than those between non-scrambled MDSs, which is inconsistent with a previous study. The scrambled pattern of micronuclear  $\alpha$ -TBP gene in *O.* sp. (ZJ) is same with that of *O. nova*, and the lengths of their IESs of these two species are also similar. The scrambled pattern of micronuclear DNA *pol a* gene in *O.* sp. (ZJ) is different from any of the previously reported species, and it is only somewhat similar to *O. trifallax*. Moreover, an IES transitioned to MDS was observed in DNA *pol a* gene, which caused the missing of its original MDS.

**Key words:** *Oxytricha*; Scramble gene; Macronuclear destined sequences (MDSs); Internal eliminated sequences (IESs); *Actin I*;  $\alpha$ -telomere-binding protein ( $\alpha$ -TBP); DNA polymerase  $\alpha$  (DNA *pol a*)