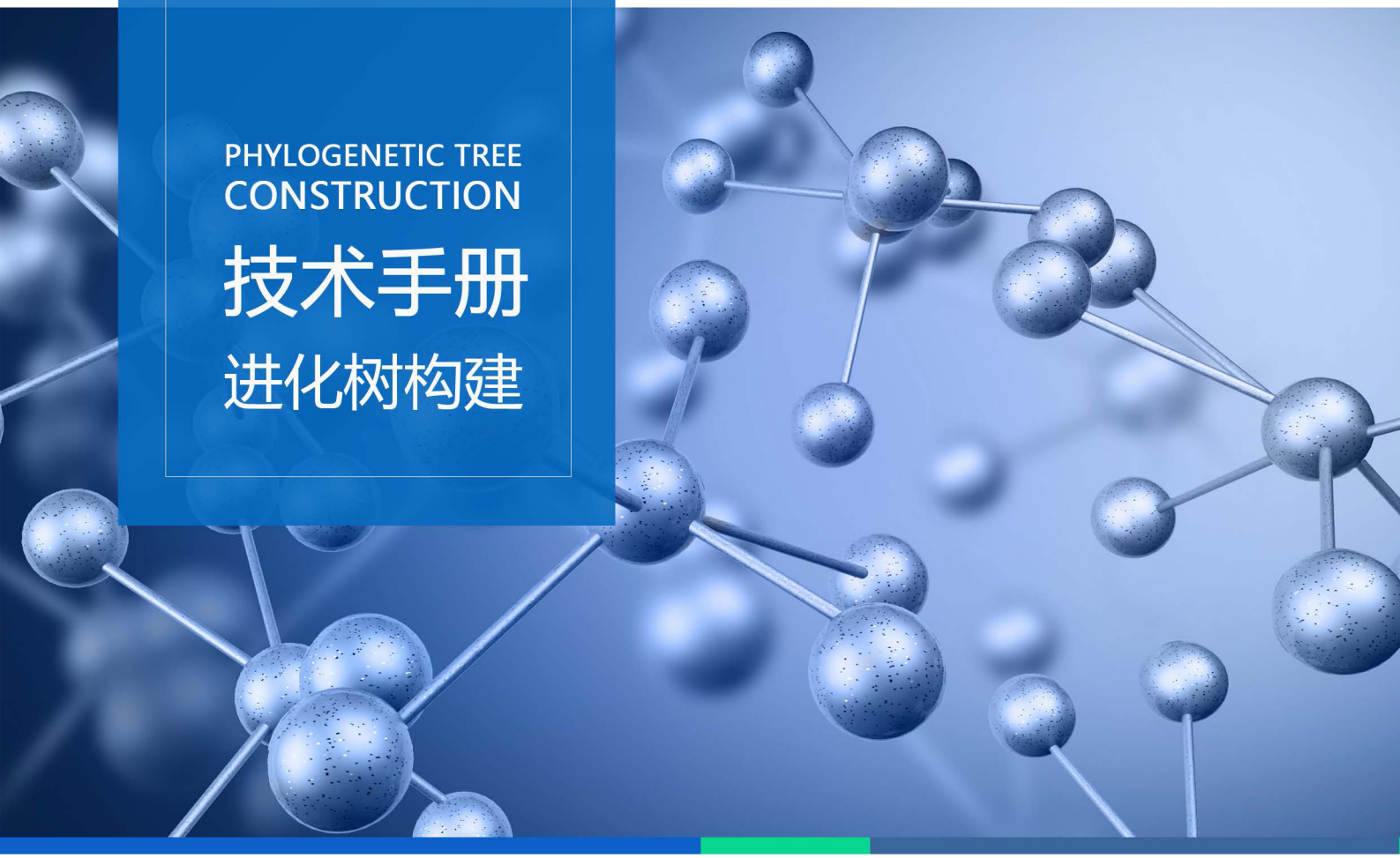
技术引领医学转化
专业创造行业口碑

吉康医学
GENECOME MEDICAL



PHYLOGENETIC TREE
CONSTRUCTION

技术手册

进化树构建

BEIJING
GENECOME CO.,LTD.
北京吉康医学科技有限公司

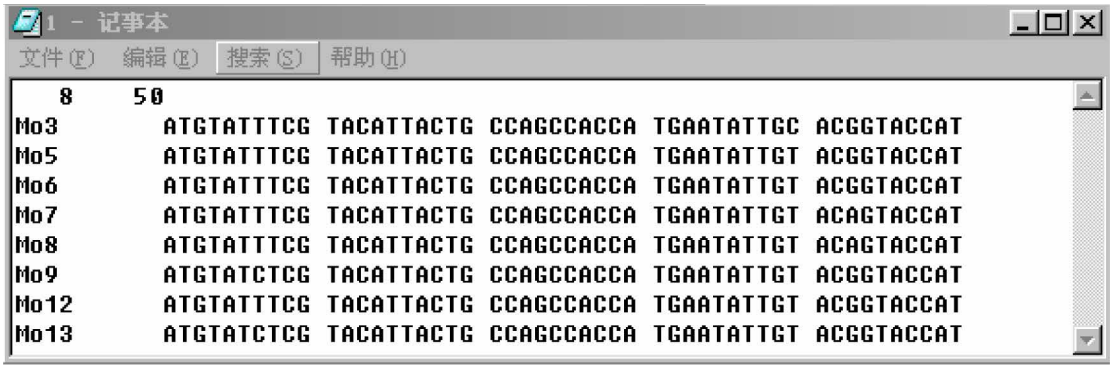
www.genecome.cn

下面介绍几个软件的使用。首先是 PHYLIP。其是多个软件的压缩包，下载后双击则自动解压。当你解压后就挥发现 PHYLIP 的功能极其强大，主要包括五个方面的功能软件：i，DNA 和蛋白质序列数据的分析软件。ii，序列数据转变成距离数据后，对距离数据分析的软件。 iii，对基因频率和连续的元素分析的软件。iv，把序列的每个碱基/氨基酸独立看待（碱基/氨基酸只有 0 和 1 的状态）时，对序列进行分析的软件。v，按照 DOLLO 简约性算法对序列进行分析的软件。vi，绘制和修改进化树的软件。在此，我主要对前两种功能软件进行说明。

我们现在有几个序列如下：

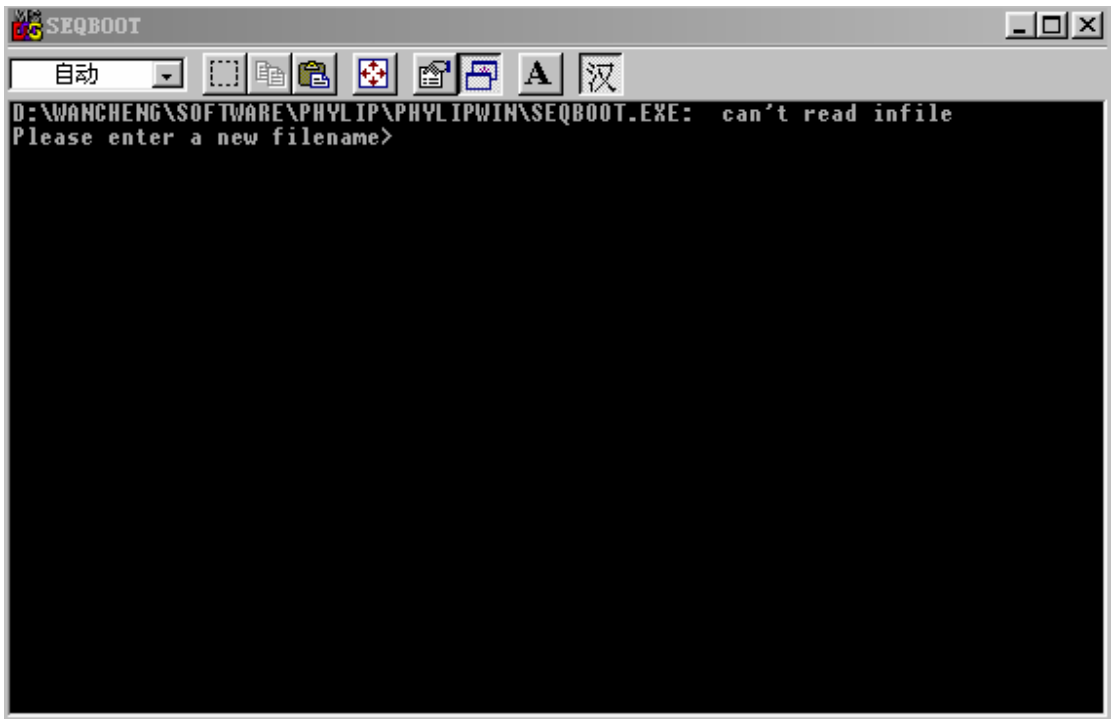
Mo3 ATGTATTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGCACGGTACCAT
Mo5 ATGTATTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCAT
Mo6 ATGTATTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCAT
Mo7 ATGTATTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACAGTACCAT
Mo8 ATGTATTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACAGTACCAT
Mo9 ATGTATCTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCAT
Mo12 ATGTATTTCGTACATTACTG CCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCAT
Mo13 ATGTATCTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCAT

要对这 8 个序列进行进化树分析，按照上面的步骤，首先用 CLUSTALX 排列序列，输出格式为 *.PHY。用记事本打开如下图：

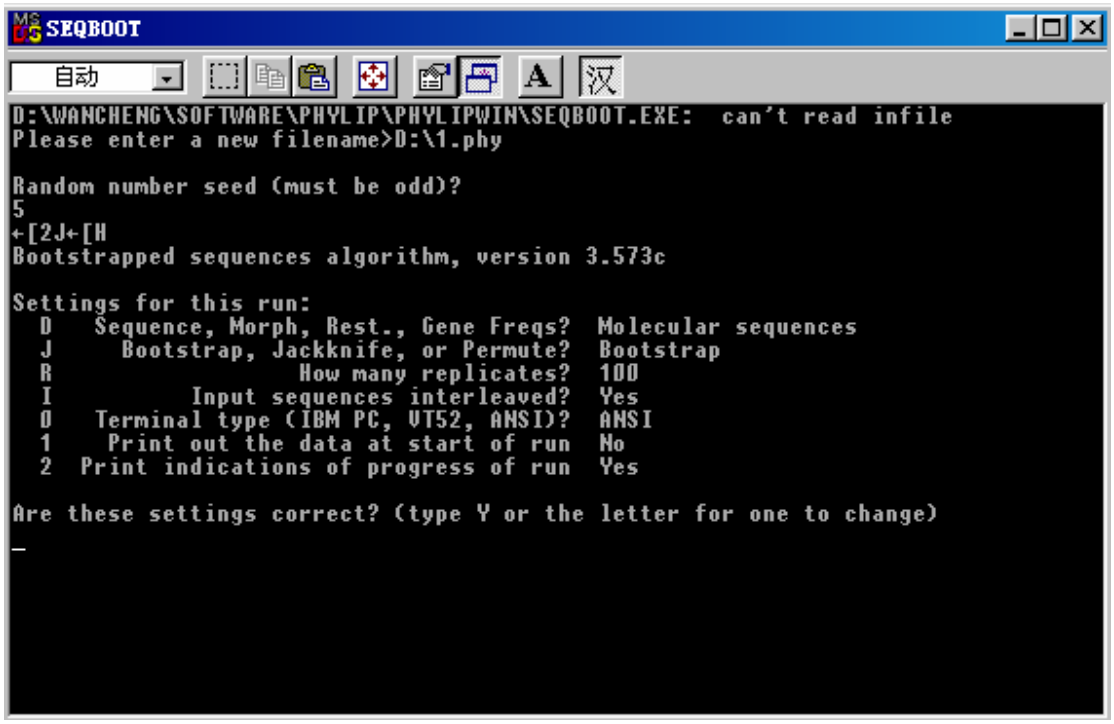


图中的 8 和 50 分别表示 8 个序列和每个序列有 50 个碱基。然后，打开软件

SEQBOOT，如下图：



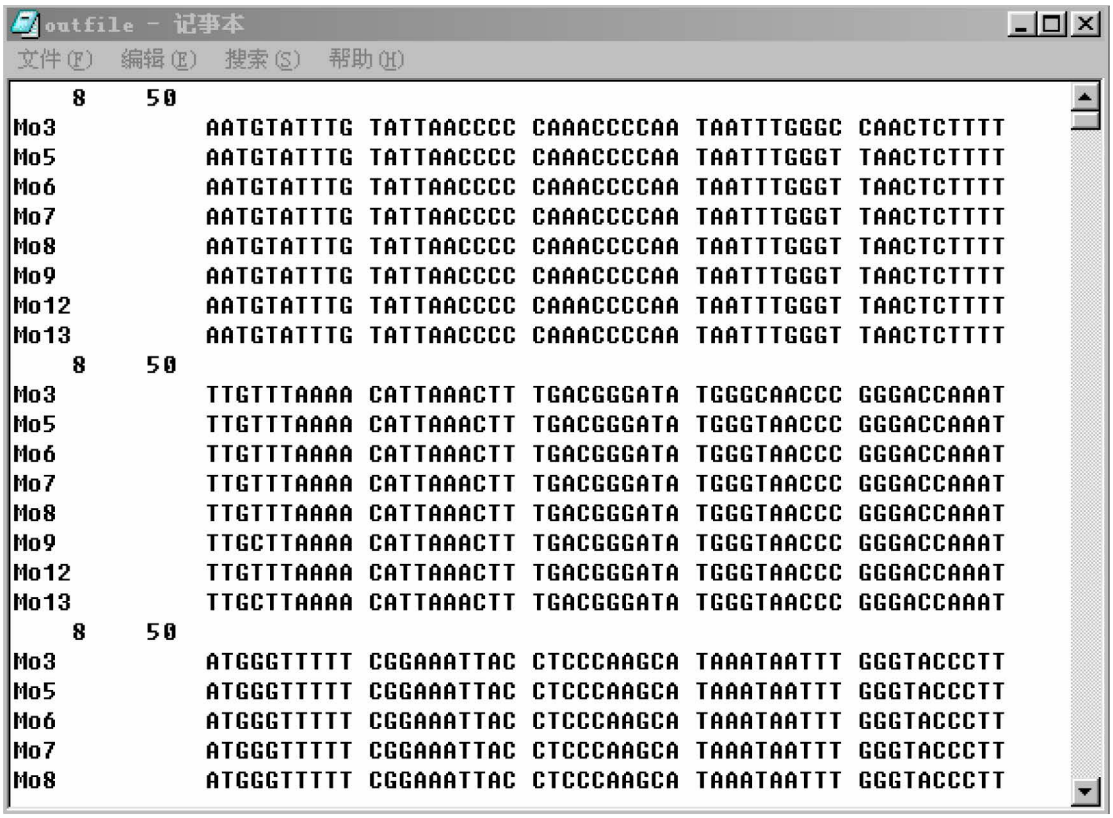
按路径输入刚才生成的 *.PHY 文件，并在 Random number seed (must be odd) ? 的下面输入一个 4N+1 的数字后，屏幕显示如下：



图中的 D、J、R、I、O、1、2 代表可选择的选项，键入这些字母，程序的条件就会发生改变。D 选项无须改变。J 选项有三种条件可以选择，分别是 Bootstrap、

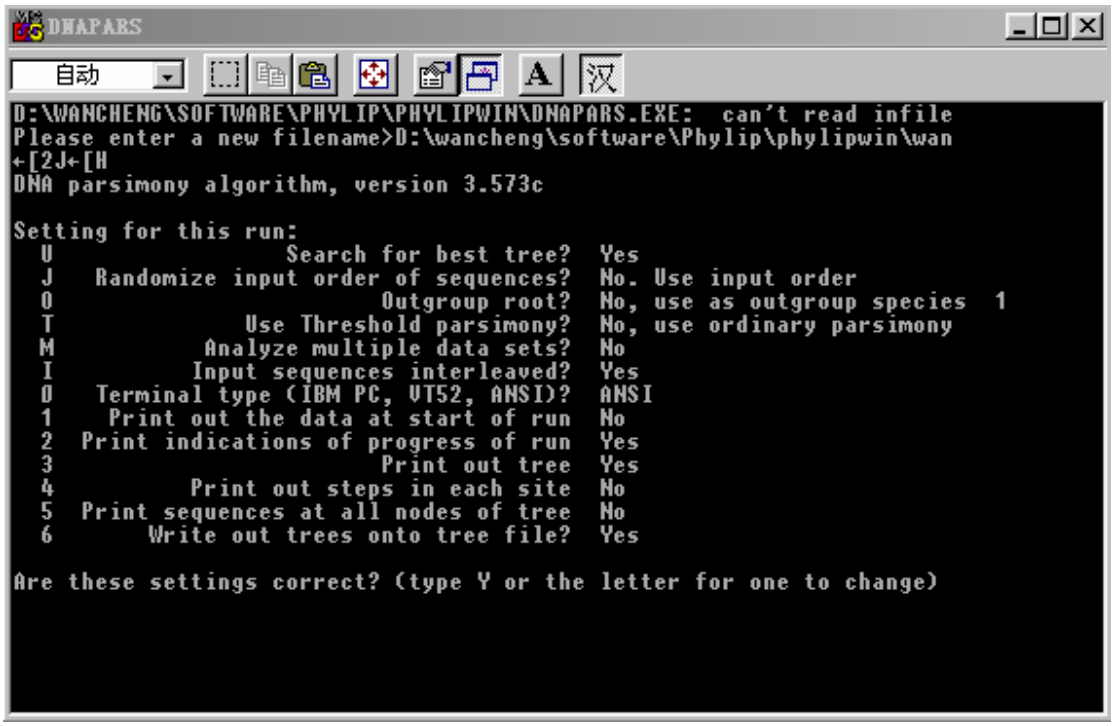
Jackknife 和 Permute。文章上面提到用 Bootstraping 法对进化树进行评估，所谓 Bootstraping 法就是从整个序列的碱基（氨基酸）中任意选取一半，剩下的一半序列随机补齐组成一个新的序列。这样，一个序列就可以变成了许多序列。一个多序列组也就可以变成许多个多序列组。根据某种算法（最大简约性法、最大可能性法、除权配对法或邻位相连法）每个多序列组都可以生成一个进化树。将生成的许多进化树进行比较，按照多数规则（majority-rule）我们就会得到一个最为逼真 的进化树。 Jackknife 则是另外一种随机选取序列的方法。它与 Bootstrap 法的区别是不将剩下的一半序列补齐，只生成一个缩短了一半的新序列。Permute 是另外一种取样方法，其目的与 Bootstrap 和 Jackknife 法不同，这里不再介绍。R 选项让使用者输入 republicate 的数目。所谓 republicate 就是用 Bootstrap 法生成的一个多序列组。根据多序列中所含的序列的数目的不同可以选取不同的 republicate。当我们设置好条件后，键入 Y 按回车。得到一个文件 outfile

Outfile 用记事本打开如下：



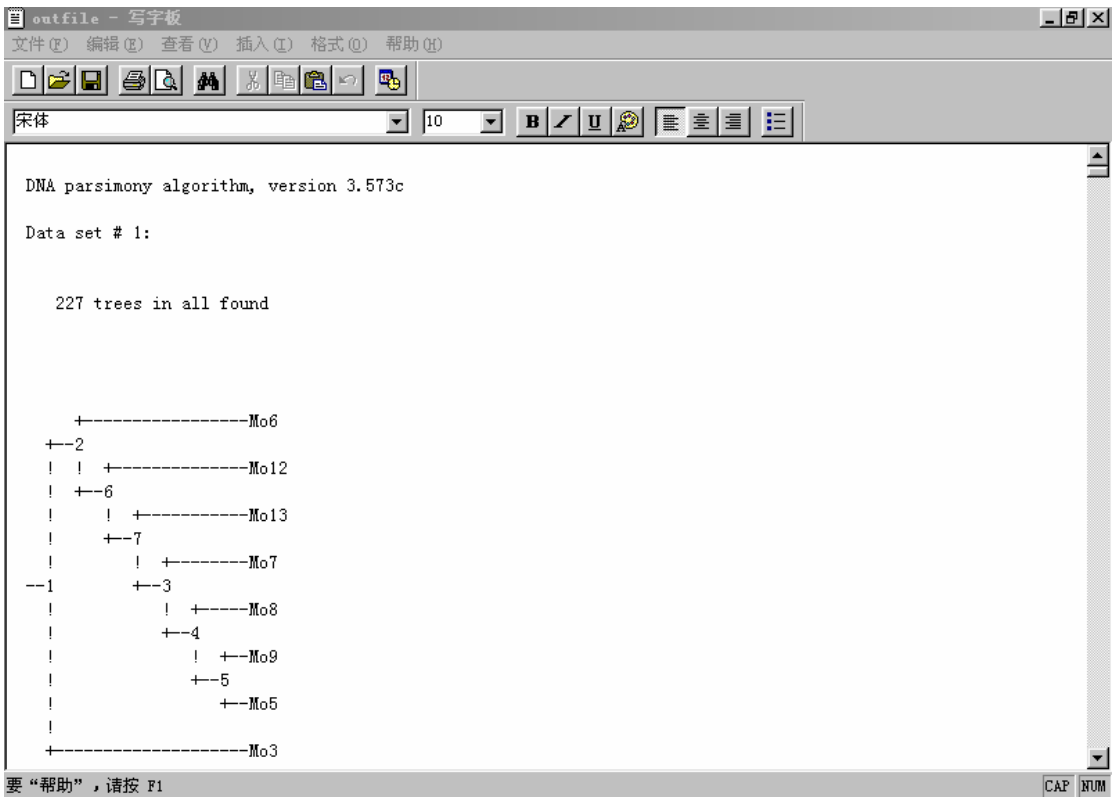
这个文件包括了 100 个 republicate。

打开 DNAPARS（最大简约性法）或 DNAML（最大可能性法）软件。将刚才生成的 outfile 文件更名后输入。如下图：



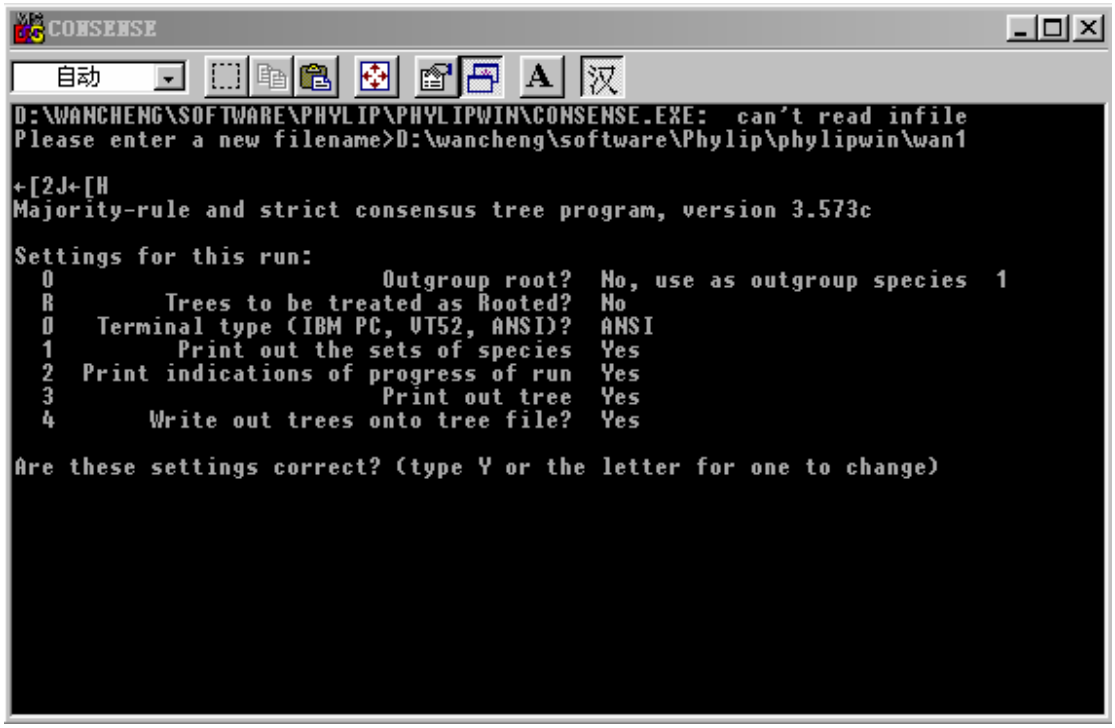
选项 O 是让使用者设定一个序列作为 outgroup。一般选择一个亲缘关系与所分析序列组很接近的序列作为 outgroup（本例子不选 outgroup），outgroup 选择的好坏将直接影响到最后的进化树的好坏。选项 M 是输入刚才设置的 republicate 的数目。设置好条件后，键入 Y 按回车。生成两个文件 outfile 和 treefile。

Outfile 打开如下图：

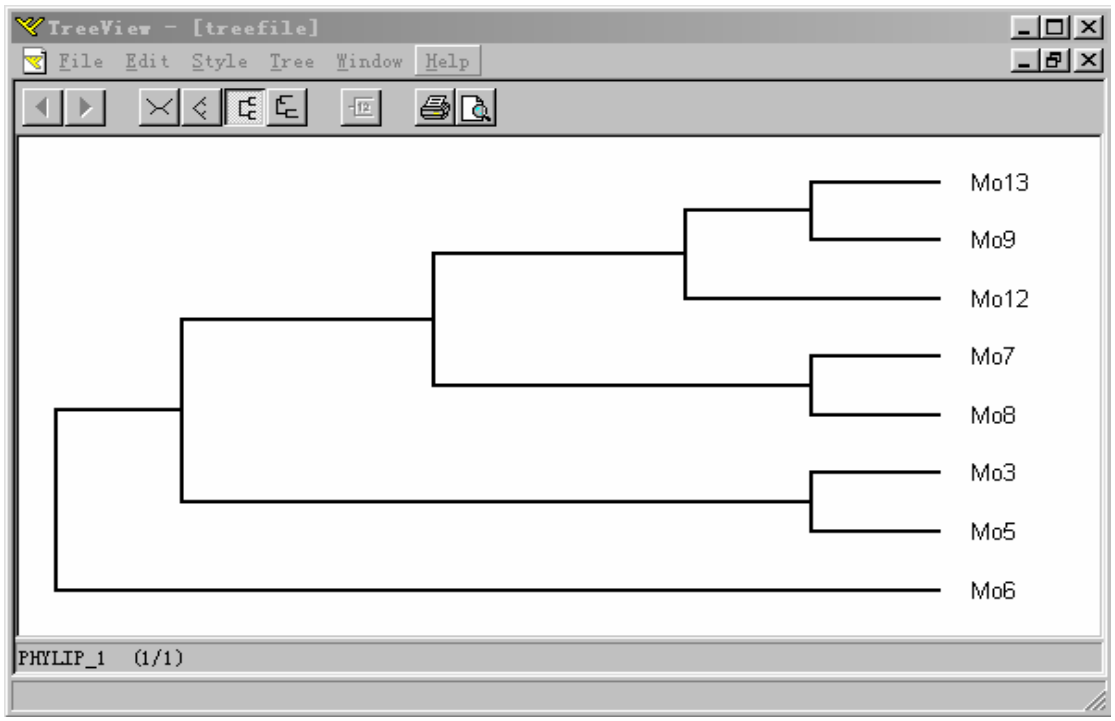


该文件包括了 227 个进化树。Treefile 可以用 TREEVIEW 软件打开同样包含了这 227 个进化树。

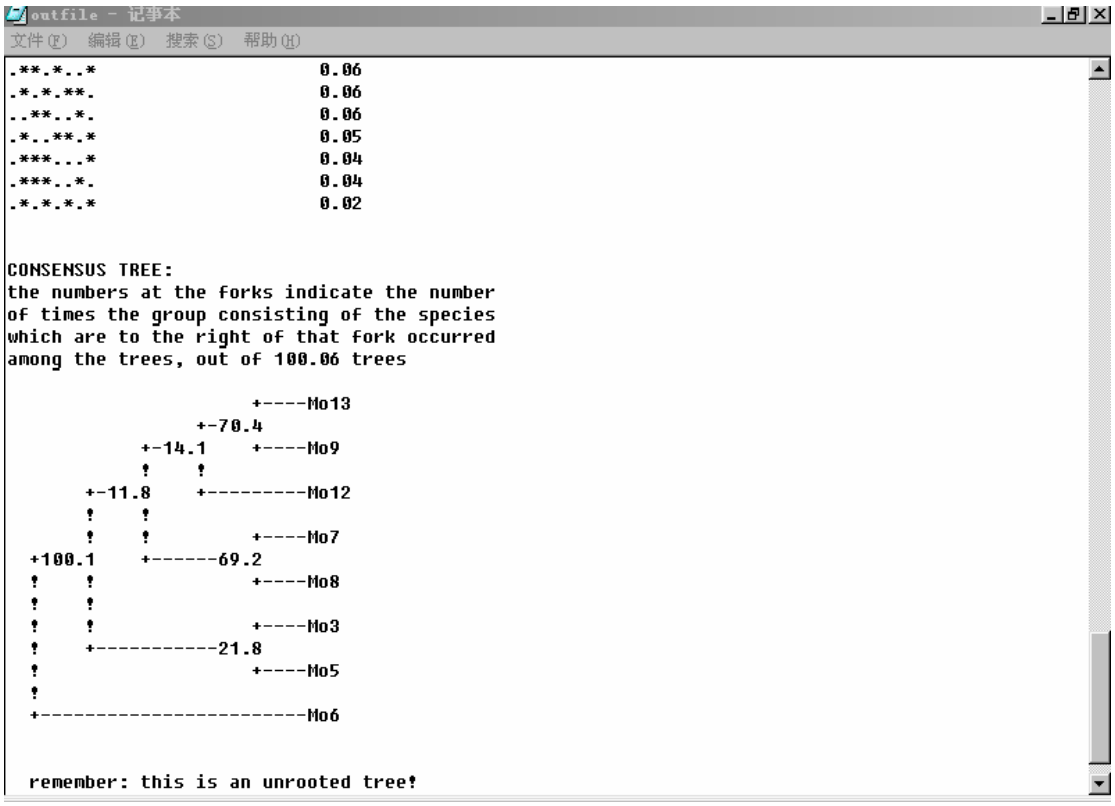
打开 CONSENSE 软件，将刚才生成的 treefile 文件更名后输入。如下图：



键入 Y 按回车。生成两个文件 outfile 和 treefile。Treefile 用 TREEVIEW 打开，如下图：

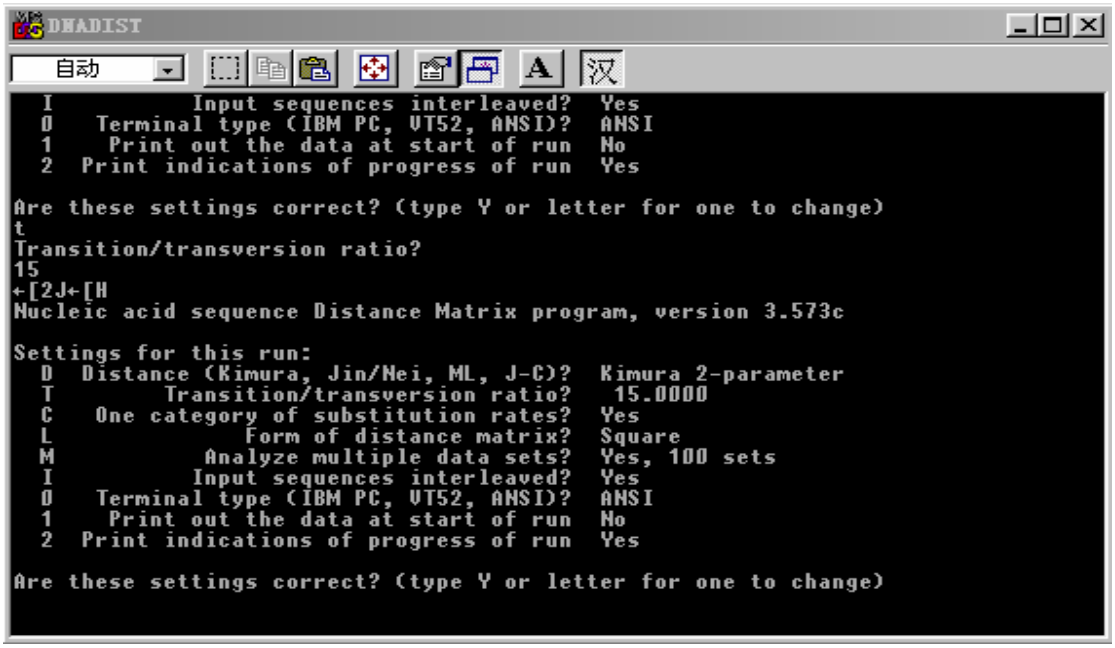


Outfile 打开如下图：

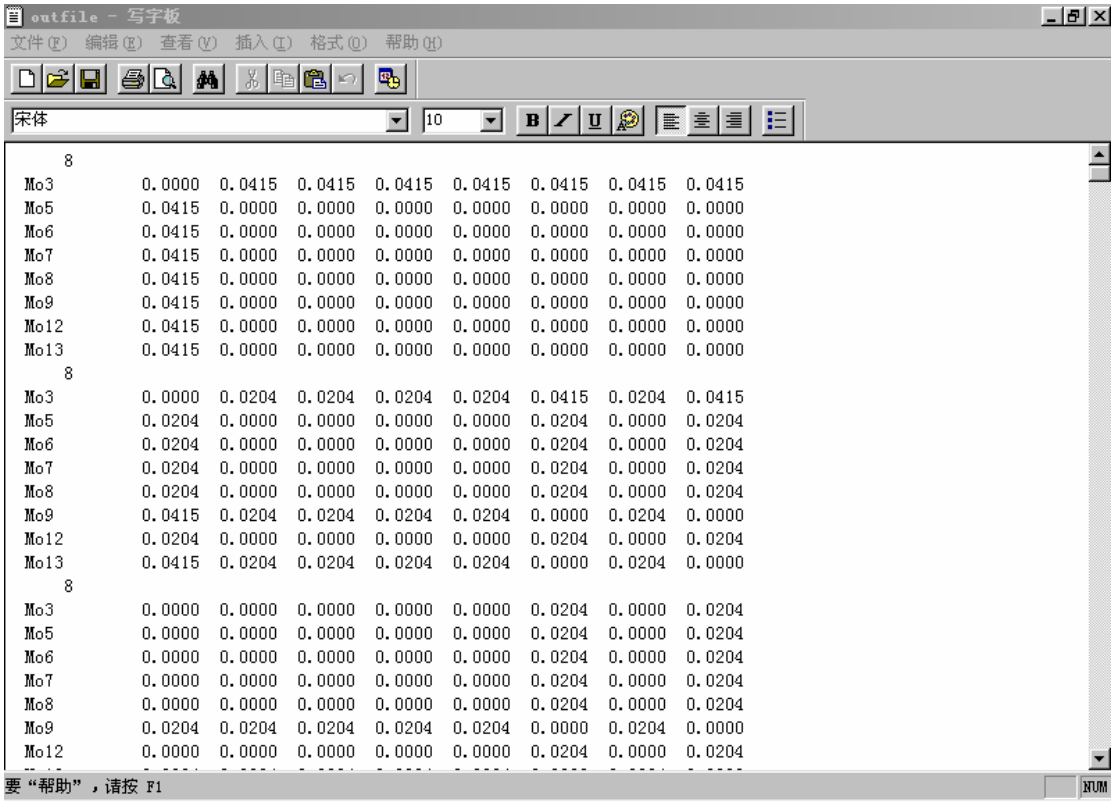


我们看出两个树是同样的。但在 outfile 的树上的数字表示该枝条的 Bootstrap 支持率（除以 100.6）。到现在，8 个序列的进化树分析（最大简约法）已经完成。

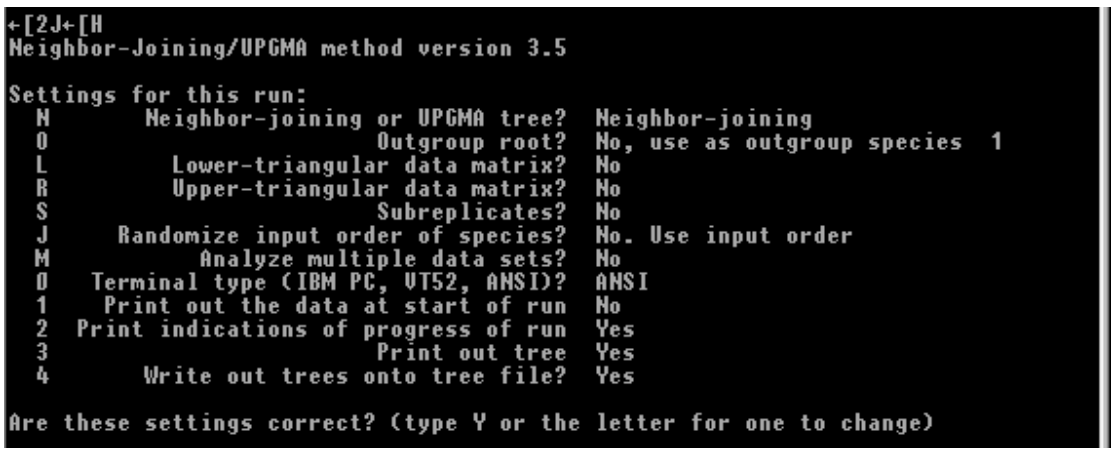
如果要用邻位相连法对这 8 个序列进行分析的话，也首先执行 SEQBOOT 软件将这 8 个序列变成 100 个 republicate。然后，打开 DNADIST 软件，把 SEQBOOT 生成的文件输入，如下图：



选项 D 有四种距离模式可以选择，分别是 Kimura 2-parameter、Jin/Nei、Maximum-likelihood 和 Jukes-Cantor。选项 T 一般键入一个 15-30 之间的数字。选项 M 键入 100。运行后生成文件如下图：



这个文件包含了与输入文件相同的 100 个 republicate，只不过每个 republicate 是以两两序列的进化距离来表示。文件中的每个 republicate 都省略了第一排的 Mo3 Mo5 Mo6 Mo7 Mo8 Mo9 Mo12 Mo13。以这个输出文件为输入文件，执行 NEIGHBOR 软件。如下图：

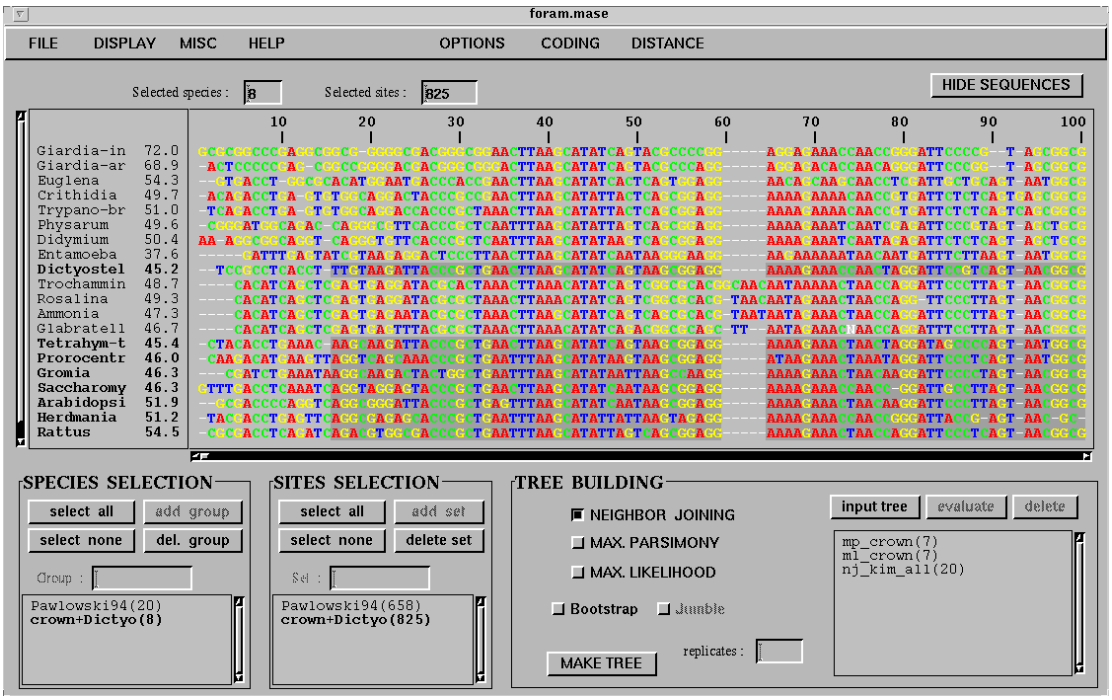


选项 M 键入 100。生成两个文件 outfile 和 treefile 用记事本和 TREEVIEW 打开后，发现这两个文件都含有 100 个进化树。再将 treefile 文件更名后输入

CONSENSE 软件，又得到两个文件 outfile 和 treefile，这就是最后的结果。以上是对 DNA 序列的分析，如果要对蛋白质序列进行分析，PROTDIST、PROTPARS 等软件。其他软件的用法可以参照 PHYLIP 的 documents。

下面介绍 PUZZLE 软件。它是用最大可能性的方法来构建进化树的一个软件，并且对树进行 bootstrap 评估。该软件搜寻进化树时用的算法是 quartet puzzling，这个算法相对较快，但如要分析的序列较多时，也相当耗时。另有 LINUX 版，运行起来相对较快。PUZZLE 的输入格式为 PHYLIP INTERLEAVED。CLUSTAL 可以生成此格式文件。PUZZLE 的界面与 PHYLIP 类似，也是 MS-DOS 下的软件。

PHYLO-WIN 是 LINUX 下的一个软件。界面友好，极易操作。该界面如下图：



Puzzle: http//:www.tree-puzzle.de

Phylo-win: http//:www.evolution.bmc.uu.se

Phylip、Treeview and Clustalx: http//:biosoft.yeah.net