

文章编号 : 1004 - 7271(2006) 04 - 0403 - 06

两种鲷属鱼类线粒体 *COI* 基因片段 序列的比较

张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 夏连军, 马春艳

(中国水产科学研究院东海水产研究所农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090)

摘 要 利用通用引物成功扩增了黄鳍鲷和黑鲷的线粒体细胞色素氧化酶 I 亚基(*COI*) 基因序列。通过序列测定, 得到 581 bp 的基因片段, 碱基 A、T、G、C 平均含量分别为 25.8%、32.6%、18.0% 和 23.6%, 序列中的 A + T 含量明显高于 G + C 含量, 与其他鱼类的 *COI* 基因片段研究结果相一致。通过序列分析发现黄鳍鲷和黑鲷两序列共存在 14 处碱基变异, 其中在第 19 ~ 139 bp 之间检测到 13 个变异位点, 是变异频率较高的区段, 可以考虑作为鲷属或者种群鉴别的分子标记。与黄鲷、真鲷、三长棘真鲷等鱼类比较, 无插入和缺失位点, 转换明显高于颠换。序列差异比较结果显示, 真鲷与黄鳍鲷的序列差异在这 5 种鱼类中最大, 达到了 18.2%, 黄鳍鲷和黑鲷的差异最小(2.4%)。两个序列已提交到 GenBank 数据库中, 序列登录号为 DQ185608 和 DQ185609。

关键词 鲷属 线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I 亚基基因 序列分析

中图分类号 S 917 文献标识码 : A

Studies on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I fragments of two genera of *Sparus* fish

ZHANG Feng-ying, MA Ling-bo, SHI Zhao-hong, XIA Lian-jun, MA Chun-yan

(Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, East China

Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Shanghai 200090, China)

Abstract Mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) fragments of *Sparus macrocephalus* and *Sparus latus* were amplified using universal primers. By sequencing, the sequence of 581 bp nucleotide was obtained, and the average contents of A, T, G and C were 25.8%, 32.6%, 18.0% and 23.6% respectively. The content of AT was higher than that of GC, which was similar to the results in other fish. The two sequences showed 14 substituted sites and 13 variable sites between the 19th and the 139th base pairs. The variation frequency of this fragment was relatively high so it was suggested to be a molecular marker to identify *Sparus* or its population. Comparing with *Taius tumifrons*, *Pagrus major* and *Pagrus auriga*, the transition times were more than transversion times. No insertion and deletion of sites were found. The result of sequence divergence analysis revealed that the discrepancy was from 2.4% to 18.2% between the 5 fishes. The highest was between *P. major* and *S. latus* and the lowest was between *S. latus* and *S. macrocephalus*. The two sequences were submitted to GenBank, and the accession numbers were DQ185608 and DQ185609.

收稿日期 2006-02-24

基金项目 : 中国水产科学研究院科研基金项目(2003 - 2 - 2) ; 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2004 第 8 - 3 号) 和农业部海洋与河口渔业重点开放实验室开放课题(开重 - 03 - 09 和开 - 1 - 04 - 12)

作者简介 : 张凤英(1976 -) , 女, 山东郓城人, 硕士, 研究实习员, 研究方向为水产动物遗传学。E-mail : zhangfy76@sohu.com

通讯作者 : 马凌波, Tel: 021 - 65688139, E-mail : malingbo@vip.sina.com

Key words : *Sparus* ; Mitochondrial DNA ; cytochrome oxidase subunit I gene (*COI*) ; sequence analysis

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, 简称 mtDNA) 是分子生物学研究中的一个热门领域, 已成为鱼类进化生物学和群体遗传学研究的重要分子标记。目前, 随着 DNA 测序技术和分子信息学的快速发展, mtDNA 在鱼类系统学、种间杂交渐渗、分子群体遗传学等方面得到广泛应用^[1]。随着分子生物学技术的进步, 测定线粒体 DNA 全序列或部分基因片段序列可以直接反映碱基的置换、插入、缺失等实际情况, 比较不同物种或个体碱基序列的差异, 从而探讨进化关系, 比其他分析方法具有更大的优点。鲷属 (*Sparus*) 属鲷形目 (Percoiformes), 鲷亚目 (Percoide), 鲷科 (Sparidae), 为温带、热带及亚热带鱼类。鲷属在我国存在 3 种: 黑鲷 (*Sparus macrocephalus*), 黄鳍鲷 (*Sparus latus*), 灰鳍鲷 (*Spsrus berda*), 它们是名贵的海产经济鱼类, 也是我国海水鱼类养殖的重要对象。其中, 黑鲷和黄鳍鲷是颇受群众喜爱的食用鱼类, 也是近年来研究较多的鲷科鱼类。目前已有关于这两种鲷属鱼类繁殖生物学的研究, 基于 RAPD 技术和 mtDNA 水平的群体遗传变异研究也已有报道^[2-6]。本研究测定了黄鳍鲷和黑鲷的细胞色素氧化酶 I 亚基 (*COI*) 基因片段序列, 并结合黄鲷 (*Taius tumifrons*)^[7]以及 GenBank 中的真鲷 (*Pagrus major*) 和三长棘真鲷 (*Pagrus auriga*) 的相应序列进行比较, 以期对黄鳍鲷和黑鲷的种质资源研究、人工养殖和品种培育提供遗传背景资料, 并为鲷科鱼类分类和系统进化提供分子上的理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用鱼采自厦门火烧岛, 取尾部肌肉放入 85% 酒精中保存, 运回实验室后放在 4 °C 冰箱备用。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取

取约 200 mg 肌肉放入 1.5 mL 的离心管中, 剪碎, 加入 TE 缓冲液浸泡 2~3 h, 期间换缓冲液 3~4 次, 加入 500 μ L 的 TE 缓冲液, 再加入终浓度为 1% 的 SDS 和 200 μ g/mL 的蛋白酶 K, 于 55 °C 消化 3~4 h, 消化物经酚/氯仿、氯仿抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, 70% 的无水乙醇洗涤, 室温干燥后溶于 ddH₂O 中 4 °C 保存。

1.2.2 *COI* 基因片段的扩增

采用通用引物扩增 *COI* 基因, 引物为 COIa: AGTATAAGCGTCTGGGTAGTC 和 COIb: CCTGCAGGAGGAGAYCC^[8], 引物由上海生工生物工程有限公司合成; 用 PTC-200 PCR 仪扩增; PCR 反应总体积是 50 μ L, 反应体系为: 10 \times buffer 5.0 μ L, Mg²⁺ 终浓度为 2.0 mmol/L, 引物 (10 μ mol/L) 为 2 μ L, dNTP (各 2.5 mmol/L) 4 μ L, Taq 酶 (TaKaRa, 5 U/ μ L) 0.4 μ L, 模板 2.0 μ L, 用 ddH₂O 补足体积。反应程序为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环。最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1.5% 含 EB 的琼脂糖凝胶电泳分离。

1.2.3 PCR 产物克隆、测序

用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海生工) 纯化 PCR 产物, 将产物与 pMD18-T 载体 (TaKaRa) 连接, 连接反应液 10 μ L, 其中包含: 载体 1 μ L, Ligation Solution I 5 μ L, PCR 产物 1 μ L, ddH₂O 3 μ L, 16 °C 连接 1 h 或者 4 °C 过夜, 连接液转化到感受态大肠杆菌 DH5 α 中, 涂平板, 选阳性克隆, LB 液体培养基培养, 经 PCR 检测后, 穿刺培养, 送至上海生工生物工程有限公司测序。

1.2.4 序列测定和系统发育分析

测序结果用 Mega3.0^[9]软件中 CLUSTALX 程序进行对位排列, 并结合人工核查。在此基础上, 对所得序列的碱基组成和核苷酸位点的替换数进行统计, 并计算序列百分差异。采用双参数 (Kimura 2-parameter)^[10]作为距离参数, 邻接法 (neighbor-joining) 构建系统进化树, 与 GenBank 中鲷形目的其他鱼类线粒体 *COI* 相应序列一起进行分析 (其它鱼类有: 真鲷 *Pagrus major*; 三长棘真鲷 *P. auriga*; 夜豆娘鱼

Abudefduf Taurus (L35221) 墨西哥豆娘鱼 *A. declivifrons* (L35211) 圆花鲳 *Auxis rochei* (AB105165) 扁花鲳 *Auxis thazard* (AB105447); 青弹涂鱼 *Scartelaos histophorus* (AF391346); 长身拟平牙鰕虎鱼 *Pseudapocryptes elongates* (AF391394) 蓝鳍金枪鱼 *Thunnus thynnus* (AY302574)) 系统树中各结点的置信度由自引导值 (Bootstrap value) 估计, 重复次数为 1 000。

2 结果

2.1 两种鲷属鱼类的线粒体 *COI* 序列及其与其他鲷科鱼类的差异

从黄鳍鲷和黑鲷总 DNA 中成功扩增出约 650 bp 的基因片段。PCR 产物通过序列测定, 去掉两端引物及部分序列共得到 581 bp 的碱基片段 (图 1), 进行 Blast 后与 GenBank 中的 mtDNA *COI* 序列进行比较, 结果表明与真鲷等其他鱼类相同基因片段的同源性达 80% 以上, 序列已经提交到 GenBank, 登录号为 DQ185608 (黑鲷) 和 DQ185609 (黄鳍鲷)。

经统计, 这两种鱼的 A、T、G、C 平均含量分别为 25.8%、32.6%、18.0% 和 23.6%, A+T 含量明显高于 G+C 含量, 与其它鱼类的 *COI* 基因序列研究结果一致 (表 1)。黄鳍鲷和黑鲷两序列共存在 14 处碱基变异, 在第 19~139 bp 之间检测到 13 个变异位点, 是变异频率较高的区段, 在 140~581 bp 只有 1 个变异位点, 是一段较长的保守序列。将这两个 *COI* 序列与黄鲷、真鲷、三长棘真鲷, 共 5 个同源序列进行比对分析, 发现存在 154 处碱基变异, 约占 26.5%, 其中包括 76 个简约信息位点, 无插入和缺失位点。序列中的转换明显高于颠换, 转换发生的频率是颠换发生频率的 2.1 倍。第 3 位碱基替换远远大于第 1、2 位。

表 1 2 种鲷属鱼与其他鲷科鱼类碱基组成的比较

Tab.1 Sequence composition of mitochondrial *COI* region of two *Sparus* fish and other Sparidae fish

种类	碱基含量(%)						序列来源
	A	T	G	C	A+T	G+C	
黄鳍鲷 <i>S. latus</i>	25.8	32.4	18.1	23.8	58.2	41.9	本文
黑鲷 <i>S. macrocephalus</i>	25.8	32.9	17.9	23.4	58.7	41.3	本文
黄鲷 <i>T. tumifrons</i>	24.4	32.2	19.4	23.9	56.6	43.3	张凤英等 ^[5]
真鲷 <i>P. major</i>	23.2	34.3	18.8	23.8	57.5	42.6	AF002949
三长棘真鲷 <i>P. auriga</i>	24.1	31.3	19.4	25.1	55.4	44.5	ABI24801

比较几种鲷科鱼类的 *COI* 序列差异结果可知, 属间的序列差异明显大于属内的序列差异。不同属间的序列差异为 13.8%~18.2%, 本文测序得到的黄鳍鲷和黑鲷的序列差异仅为 2.4%, 而同隶属于真鲷属的真鲷和三长棘真鲷的序列差异达 13.0%。黄鳍鲷与真鲷序列差异最大, 达到了 18.2%, 黄鲷和真鲷的差异最小, 为 13.8% (表 2)。

表 2 几种鲷科鱼类线粒体 *COI* 序列差异百分比 (对角线以下) 和转换/颠换数 (对角线以上) 的比较

Tab.2 Percentage divergence (below diagonal) and number of transitions/transversions (above diagonal) for

mtDNA *COI* sequences of Sparidae fish

种类	黄鳍鲷	黑鲷	黄鲷	真鲷	三长棘真鲷
	<i>S. latus</i>	<i>S. macrocephalus</i>	<i>T. tumifrons</i>	<i>P. major</i>	<i>P. auriga</i>
黄鳍鲷 <i>S. latus</i>	—	5/9	56/40	69/37	59/40
黑鲷 <i>S. macrocephalus</i>	2.4	—	55/35	68/32	57/35
黄鲷 <i>T. tumifrons</i>	16.5	15.5	—	63/17	67/16
真鲷 <i>P. major</i>	18.2	17.2	13.8	—	60/15
三长棘真鲷 <i>P. auriga</i>	17.0	15.8	14.3	13.0	—

2.2 系统进化树的构建

从系统进化树可知,5种鲷科鱼类聚在一起,尔后分为独立的2支,黄鳍鲷和黑鲷聚为1支,置信度高达100%;真鲷、三长棘真鲷和黄鲷聚为另1支。鰕虎鱼科的鰕虎鱼和青弹涂鱼聚在一起,鲭科的扁花鲳、圆花鲳和金枪鱼聚为1支,雀鲷科的2种豆娘鱼聚在一起,置信度高达97%以上。

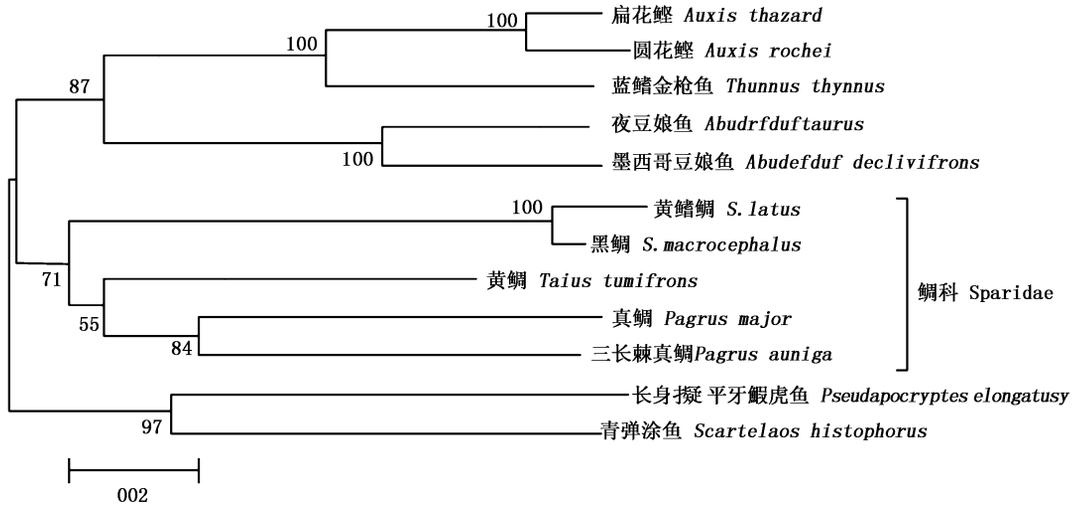


图2 NJ法构建的鲷属鱼类与其他鱼类的系统进化树

Fig.2 Molecular phylogenetic tree of *Sparus* fish and other fish constructed by NJ method

3 讨论

动物线粒体DNA是一种共价闭合、环状的双链DNA分子,其结构简单、呈母系遗传、进化速度快。mtDNA基因组内不同的区域进化速度存在差异,适合不同水平的进化研究。Zardoya和Meyer^[11]考察了脊椎动物的13个蛋白编码基因所包含的系统发育信息情况指出,ND4、ND5、Cyt b和*COI*含有良好的系统发育信息。*COI*基因由于进化速度快,故适合于种群水平差异的检测,也可用于种间分析,该基因近年来在昆虫、虾类、蟹类、贝类以及鱼类的群体遗传结构和系统进化方面有较多的研究^[12-16]。Vandewoestijne等^[12]利用线粒体*COI*基因序列对鳞翅类昆虫*Aglais urticae*的种群遗传结构和系统发育重建进行了研究,发现高基因流(high gene flow)是形成*Aglais urticae*群体遗传结构的主要原因。Burrige等^[15]利用*COI*和Cyt b基因对有着争议的鲷鱼科(Cirrhitidae)鱼类分类和地理种群进行了研究,较好的解决了该科鱼类的分类问题。

通过本研究结果可知,黄鳍鲷和黑鲷的*COI*序列在第19~139 bp之间检测到13个变异位点,是变异频率较高的区段,可以考虑作为鲷属或者种群鉴别的分子标记。从序列差异结果来看,在不同属间,黄鲷和真鲷的序列差异最小,这与江世贵等^[17]利用Cyt b基因序列研究鲷科鱼类分类的结果是一致的;在同一属内,鲷属的两个种(黄鳍鲷和黑鲷)序列差异最小,仅为2.4%,而真鲷属的两个种(真鲷和三长棘真鲷)序列差异较大(13.0%),接近黄鲷和真鲷的序列差异(13.8%)。从系统进化关系来看,各科鱼类分别聚为独立分支,置信度在70%以上。鲷属的黄鳍鲷和黑鲷、鲭科的3种鱼以及雀鲷科的2种鱼,它们的置信度高达100%,这与形态学上的分类是一致的。这种结果提示该序列适合于鱼类种间系统进化关系研究。

黄鳍鲷和黑鲷由于其对环境适应性强、食性广等特点,它们的养殖前景十分看好。本文的研究结果为进一步研究鲷属鱼类的遗传变异、种群遗传结构和系统进化打下基础,同时为鲷科其它鱼类的进化研究积累资料。但是要想进一步了解其遗传背景还需其他分子生物学方面的资料,如线粒体其他基因、核

基因组 DNA 等。

参考文献：

- [1] 郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(9):983-1000.
- [2] 李加儿,区又君. 深圳湾沿岸池养黄鳍鲷的繁殖生物学[J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 2000, 19(2):139-143.
- [3] 李加儿,区又君. 黑鲷生物学及其种苗生产技术研究[J]. 南海水产研究, 1990, 2:36-44.
- [4] 杨慧荣,江世贵,苏天凤,等. 黄鳍鲷 2 个自然群体遗传变异的 RAPD 分析[J]. 热带海洋学报, 2004, 23(2):55-61.
- [5] 刘红艳,江世贵,苏天凤,等. 3 个水域黄鳍鲷线粒体 DNA D-loop 基因序列多态性研究[J]. 水产学报, 2004, 28(4):371-374.
- [6] 张静,白俊杰,叶星,等. 用线粒体 DNA D-loop 区序列探讨盘丽鱼属鱼类系统分类[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(1):17-20.
- [7] 张凤英,夏连军,马凌波,等. 黄鲷线粒体 COI 基因部分序列遗传变异研究[J]. 热带海洋学报, 2005, 24(5):83-89.
- [8] Palumbi S R, Kwasing B. Population biology of the Trans-arctic exchange: MtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins[J]. Evolution, 1991, 45:1790-1805.
- [9] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5:150-163.
- [10] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. Molecular Biology and Evolution, 1980, 16:111-120.
- [11] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates[J]. Molecular Biology and Evolution, 1996, 13(7):933-942.
- [12] Vandewoestijne S, Baguette M, Brakefield P M, et al. Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 31:630-646.
- [13] Hualkasin W, Sirimontaporn P, Chotigeat W, et al. Molecular phylogenetic analysis of white prawns species and the existence of two clades in *Penaeus merguensis*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2003, 296:1-11.
- [14] Mauro A, Arculeo M, Parrinello N. Morphological and molecular tools in identifying the Mediterranean limpets *Patella caerulea*, *Patella aspera* and *Patella rustica*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2003, 295:131-143.
- [15] Burrige C P, Smolenski A J. Molecular phylogeny of the Cheilodactylidae and Latridae (Perciformes: Cirrhitidae) with notes on taxonomy and biogeography[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2004, 30:118-127.
- [16] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29:309-316.
- [17] 江世贵,刘红艳,苏天凤,等. 4 种鲷科鱼类的线粒体细胞色素 b 基因序列及分子系统学分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(3):184-188.