

文章编号: 1674-5566(2011)02-0173-06

长江华溪蟹 β -actin 基因 cDNA 扩增及分子系统发育初步分析

高爱保^{1,2}, 王 兰¹, 袁 慧¹

(1. 山西大学 生命科学院, 山西 太原 030006; 2. 晋中学院, 山西 晋中 030600)

摘 要: 利用 RT-PCR 技术, 扩增了长江华溪蟹 (*Sinopotamon yangtsekiense*) β -actin 基因片段, 测序并结合 GenBank 数据库中蓝蟹 (*Callinectes sapidus*)、中华绒螯蟹 (*E. sinensis*)、黑背地蟹 (*Gecarcinus lateralis*)、张口蟹 (*Neohelice granulata*)、远海梭子蟹 (*Portunus pelagicus*)、锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 6 种蟹的同源序列进行比较。结果显示: 在长为 338 bp 的 β -actin 同源序列中有 115 个变异位点, 57 个单碱基变化位点。7 种蟹的种间核苷酸变异值从 1.6% 到 25.3%, 碱基替换比值从 0.740 到 4.050, 其中锯缘青蟹和远海梭子蟹亲缘关系很近, 长江华溪蟹和地蟹、张口蟹亲缘关系较远, 而中华绒螯蟹和远海梭子蟹关系较远。用 NJ 法和 ML 法构建了分子系统树, 得到了相同的拓扑结构。系统发育分析表明长江华溪蟹单独形成一支, 与其它海洋蟹的亲缘关系远, 支持溪蟹单独划分总科。锯缘青蟹和远海梭子蟹先聚在一起, 然后和黑背地蟹聚在一起, 再和弓蟹科的张口蟹聚在一起, 与传统形态学分类系统稍有不同。

研究亮点: 首次研究了长江华溪蟹的 β -actin 基因, 利用反转录 PCR 技术获得此基因 cDNA 序列, 并测序提交到 GenBank 数据库中, 登录号为 GQ415418。充实了蟹类的 β -actin 基因序列, 并对 7 种蟹进行系统发育分析, 初步构建了基于 β -actin 基因序列的蟹类系统树。

关键词: 长江华溪蟹; β -肌动蛋白; 反转录 PCR; 分子系统发育
中图分类号: S 917
文献标识码: A

长江华溪蟹 (*Sinopotamon yangtsekiense*) 属节肢动物门 (Arthropoda)、甲壳纲 (Crustaceae)、十足目 (Decapoda)、溪蟹科 (Potamidae)、华溪蟹属 (*Sinopotamon*)。由于溪蟹长期生活在山溪的石块下, 互相隔绝而衍生出许多不同的属种, 虽不如淡水虾有大的食用经济价值, 但在生态上仍占有极重要的地位, 它们是属于底栖、碎食性 (detritus) 的生物, 又是其他哺乳类、鸟类、大型鱼类的食物来源之一。蟹类绝大多数生活在海洋里, 少数种类虽然也能够生活在江、河、湖等淡水水域中栖憩, 但一到生殖季节就游入海, 如中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*)。而广泛分布于热带、亚热带和少数温带地区的溪蟹类却是纯粹的淡水种类, 终生生活在淡水中。华溪蟹属是我国淡水蟹类特有属的代表, 包括的种类最多, 分布最广, 数量也最大, 见于整个长江水系及其支流等广阔地

区的中高山区及丘陵、平原等不同的生态区^[1]。

短尾类的部分种属分类分歧还较大, 其分类主要集中在传统的形态结构上, 分子系统发育研究不多。邱高峰等^[2]用 16S rDNA 序列对 4 种绒螯蟹分子分类与系统发育进行了分析, 王成辉等^[3]用线粒体基因序列对 3 种中华绒螯蟹群体进行了进化分析, 另外, 亚洲绒螯蟹分子系统发育分析也有报道^[4]。利用 β -actin 基因进行系统发育研究已在有孔虫与丝足虫类中应用^[5], 有报道利用 actin 蛋白研究了卡氏肺孢子虫的分类地位^[6], 水生生物中对黄鳝 β -肌动蛋白基因克隆并进行系统发育分析也有报道^[7]。本文以长江华溪蟹为材料, 扩增其 β -actin 基因并进行序列测定, 通过蟹类 β -actin 基因序列变异, 探讨长江华溪蟹在短尾类中的分类地位。同时, 可以为十足目的系统发生, 乃至甲壳动物的系统发生提供

收稿日期: 2010-05-28 修回日期: 2010-07-18

基金项目: 国家自然科学基金(30870267); 山西省自然科学基金(2008011069)

作者简介: 高爱保(1973-), 男, 在读博士, 主要从事动物分子生物学与基因调控研究。E-mail: gaoaibao@163.com

通讯作者: 王 兰, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

actin 基因的部分序列和排列信息,对更多蟹类 β -actin 基因的比较研究,将有助于重建短尾类,甚至十足目及甲壳纲的分子系统发生,为确定生物的进化位置及进化关系提供了分子证据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

太原市东安水产批发市场购买的长江华溪蟹(以下简称“溪蟹”),置于实验室水族缸(130 cm × 50 cm × 60 cm)中暂养。水为曝气 48 h 的自来水,水温 16 ~ 20 °C。选择个体大小基本一致(平均体重为 16.32 ± 3.22 g)、附肢完整且活泼健康的个体用于 RNA 提取。

实验所用主要试剂:0.1% DEPC(焦碳酸二乙酯)、Tiangen TRNzol 试剂、异硫氰酸胍、饱和酚、氯仿、cDNA synthesis kit (TaKaRa)、Taq 酶。

1.2 RNA 提取

按照 TRNzol 试剂说明书进行操作,一部分步骤做相应的改进^[8]。提取后的 RNA 样品加入 DNase Mix(包括 Buffer, RNase Inhibitor, RNase-free DNaseI),37 °C 孵育 20 min,去除 RNA 中微量的 DNA。

1.3 cDNA 合成

取心脏组织 RNA 样品 2 μ L, Oligo dT Primer (50 μ M) 1 μ L, dNTP 1 μ L, RNase free H₂O 10.5 μ L 混匀,于 65 °C 孵育 5 min,立即冰浴 2 min,加入单链 cDNA 合成主体混合液 5.5 μ L(含 5 × Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor 0.5 μ L, PrimeScript RTase 100 U),混匀,短暂离心,42 °C 孵育 1 h,70 °C 15 min 停止反应,贮存于 -20 °C 备用。

1.4 β -actin 基因扩增及测序

从 GenBank 上搜索蟹的 β -actin 基因序列,找出保守序列,由此设计的简并引物为:上游引物:5'-GCC TCY GGY CGT ACC ACT AGT AT-3',下游引物:5'-CGG AAN SKY TCR TTR CCG ATS GTG ATG A-3',其中:Y = C/T, R = G/A, K = G/T, S = G/C, N = A/T/C/G,由上海生工生物工程有限公司合成^[2,9]。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 2 min,94 °C 变性 40 s,50 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 50 s,运行 32 个循环,最后 72 °C 再延伸 5 min。取 5 μ L PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。用低熔点琼脂糖纯化回收 PCR 产物,由 pGEM-T 载体克隆后, TaKaRa Biotechnology 公司

完成测序,测序引物为通用引物 M13 - 47,测序仪为 ABI prism 377XL。

1.5 数据分析

测序所得溪蟹的 β -actin 基因片段与 GenBank 数据库中短尾类(Brachyura)的同源序列进行排序和比较。采用 Mega 4 软件^[10]分析序列的碱基组成和差异百分比、变异位点、转换颠换比值。邻接法(neighbor-joining, NJ)分析使用 Kimura 双参数模型估算遗传距离,将序列中的转换和颠换位点均视为同等加权,删除缺失引起的变异。采用重复抽样(Bootstrap)的方法检验系统树分支的置信度,重复抽样的次数为 1 000 次。最大似然法(Maximum likelihood, ML)使用 PAUP 4.0b10 软件, criterion 设置为 likelihood,采用启发式搜寻, Bootstrap 检验 1 000 次^[11-13]。

2 结果

2.1 电泳检测

PCR 产物与 DL 2000 ladder 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测比较,如图 1 所示,产物条带清晰,大小约 350 bp,经回收纯化测序,去除载体部分序列,获得长 338 bp 的溪蟹 β -actin 基因序列,具体见图 2 中长江华溪蟹 Sinopotamon 序列,该序列已提交到 GenBank,登录号为 GQ415418。

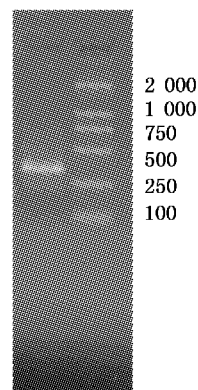


图1 长江华溪蟹心脏 β -actin 基因 PCR 产物电泳图
Fig.1 PCR product of β -actin gene partial cDNA sequences from the heart of *S. yangtsekiense*

2.2 序列分析

用 DNAMAN 程序对测定的溪蟹 β -actin 基因与 GenBank 数据库中短尾类的 β -actin 基因序列进行对位排序,并找出所测序的溪蟹 β -actin 基因 338 bp 的同源序列,其它 6 种蟹分别为蓝蟹

```

Sinopotamon      GCCTCCGGCCGTACC ACTGGTATCGTGCTCGACTCTGGAGACGGCGTCACCCATACCGTC
Callinectes      GCCTCCGGCCGTACC ACCGGTATTGTGCTGGACTCCGGTGACGGCGTCTCACACTGTGTC
Eriocheir        GCCTCCGGTTCGTACC ACTGGTATCGTGCTCGACTCTGGTGACGGTGTCTCCCACACCGTG
Gecarcinus       GCCTCTGGCCGTACC ACTGGTATAGTGCTCGATACTGGAGATGGTGTACCCACACCGTC
Neohelice        GCCTCTGGCCGTACC ACTGGGATCGTGCTCGATACTGGAGATGGTGTACCCACACTGTT
Portunus         GCCTCTGGCCGTACC ACTGGTATCGTGCTCGATACTGGTGTATGGTGTACCCACACCGTC
Scylla           GCCTCTGGCCGTACT ACTGGTATCGTGCTCGATACTGGTGTATGGTGTACCCACACCGTC
***** ** ***** ** ** * ***** ** * ** ** ** ** * ** ** ** **
Sinopotamon      CCCATTTATGAAGGTTATGCTCTCCCTCACGCCATCATGCGTCTGGACTTGGCTGGTCCG
Callinectes      CCCATCTACGAGGGATATGCCCTTCCTCACGCTATCCTCGGTTTGGACTTGGCTGGCCGT
Eriocheir        CCCATCTACGAGGGCTACGCCCTGCCCCACGCCATCCTGCGTCTCGACCTGGCTGGCCGT
Gecarcinus       CCCATCTATGAAGGTTATTGCCCTTCCTCACGCCATCCTGCGTCTCGACCTTGCTGGTCCG
Neohelice        CCCATCTACGAGGGTACTGGCCTTCCCCACGCCATCCTTCGTCTCGACCTAGCTGGACGT
Portunus         CCCATCTATGAAGGTTACTGCCCTTCCCCACGCCATCCTGCGTCTCGACCTGGCTGGCCGT
Scylla           CCCATCTATGAAGGTTACTGCCCTTCCCCACGCCATCCTGCGTCTCGACCTGGCTGGCCGT
***** ** ** ** **          ** ** ***** ** * ** ** ** ** * ***** **
Sinopotamon      GATCTGACAGACTATCTCATGAAGGTTATGACTGAACGAGGCTACTCCTTCACTACCACA
Callinectes      GACCTTACCGACTACCTGATGAAAATCCTGACCGAGCGAGGCTACACCTTCACGACCACC
Eriocheir        GACCTCACAGACTACCTGATGAAGATCCTGACGGAGCGAGGCTACACCTTCACGACCACC
Gecarcinus       GACCTGACCGCCTACCTCACCAAGATCATGACTGAGCGTGGCTACTCCTTCACTACCACG
Neohelice        GACCTAACTGCTTATCTCATGAAGATCATGACTGAGCGTGGCTACTCCTTCACTACCACG
Portunus         GACCTGACTGCCTACCTCACCAAGATCATGACTGAGCGTGGCTACTCCTTCACTACCACG
Scylla           GACCTGACTGCCTACCTCACCAAGATCATGACTGAGCGCGGCTACTCCTTCACTACCACG
** ** ** * ** ** ** ** ** * ***** ** ** ***** ***** ** **
Sinopotamon      GCAGAGCGTGAGATCGTTCGTGACGTCAAGGAGAAGCTCTGTTATGTTGCCCTTGACTTT
Callinectes      GCCGAGCGGAGAAAATCGTTCGTGACATCAAGGAAAAGCTGTGCTACGTCCGCTGGACTTC
Eriocheir        GCCGAGCGGAGAAAATCGTTCGTGACATCAAGGAAAAGCTGTGCTACGTCCGCTGGACTTC
Gecarcinus       GCTGAGCGGAGAAAATCGTTCGTGACATCAAGGAAAAGCTTTGCTATGTGCGCTCTTGACTTC
Neohelice        GCTGAGCGGAGAAAATCGTTCGTGACATCAAGGAGAAGCTTTGCTATGTTGCTCTCGACTTC
Portunus         GCTGAGCGGAGAAAATCGTTCGTGACATCAAGGAGAAGCTCTGCTATGTGCGCTCTTGACTTC
Scylla           GCTGAGCGGAGAAAATCGTTCGTGACATCAAGGAGAAGCTTTGCTATGTGCGCTCTTGACTTC
** ***** ** ***** ** ** * ***** ***** ** ** ** ** ** ** *****
Sinopotamon      GAGAACGAAAATGGCTCAAGCTGCTGCCTCGACCTCTCTGGATAAAGTCTATGAGTTACCC
Callinectes      GAGCAGGAGATGACC ACTGCCGCTTCTTCTCTCTCCCTGGAGAAAGTCTTACGAGCTTCCC
Eriocheir        GAGCAGGAAAATGACC ACTGCCGCGCGTCTCCTCCCTGGAGAAAGTCTTACGAGCTGCCCT
Gecarcinus       GAGAGTGAGATGAACGTGGCTGCCGCTCCCTCCTCCCTCGAGAAAGTCTTACGAGCTGCC
Neohelice        GAAAACGAAAATGAATCTTGCAGCTGCATCATCTTCCCTAGAAAAATCATACGAGCTACCC
Portunus         GAGAGTGAGATGAACGTGGCTGCCCTCCTCTTCCCTCGAGAAAGTCTTACGAGCTTCCC
Scylla           GAGAGTGAGATGAACGTGGCTGCCCTCCTCTTCCCTCGAGAAAGTCTTACGAGCTTCCC
**      ** ***          ** ** * * * ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** ** **
Sinopotamon      GACGGACAGGTCATCACGATCGGTAACGAAAACATTCCG
Callinectes      GACGGTCAGGTCATCACCATCGGTAACGAGAGGTTCCG
Eriocheir        GACGGCCAGGTCATCACGATCGGCAATGAGACCTTCCG
Gecarcinus       GACGGCAGGTTATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCG
Neohelice        GACGGTCAAGTCAATCACCATCGGCAACGAAACGCTTCCG
Portunus         GACGGTCAGGTCATCACCATCGG-----
Scylla           GACGGTCAGGTCATCACCATCGGCAACGAGCGCTTCCG
*****          ***** *****

```

图 2 7 种蟹的 β -actin 基因序列比对
Fig. 2 Multiple β -actin sequences alignment of 7 crabs
 - 表示间隙, * 表示完全相同的碱基。

(*Callinectes sapidus*)、中华绒螯蟹(*E. sinensis*)、黑背地蟹(*Gecarcinus lateralis*)、张口蟹(*Neohelice granulata*)、远海梭子蟹(*Portunus pelagicus*)、锯缘青蟹(*Scylla serrata*)，登录号分别为：DQ084066、AY910691、L76530、AY074923、EF110528、EF100891(图 2)，其中远海梭子蟹 *Portunus* 同源序列仅 323 bp。参照其它 6 种蟹的 β -actin 蛋白质序列推导溪蟹的部分 β -actin 蛋白序列为：

ASGRITGIVL DSGDGVTHTV PIYEGYALPH
 AIMRLDLAGR DLTDYLMKVM TERGYSFTTT
 AEREIVRDVK EKLCYVALDF ENEMAQAAAS
 TSLDKSYELP DGQVITIGNE TF。采用 Mega 4 软件统计 7 种蟹的 β -actin 基因序列，计算 A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 20.6%、22.8%、32.1%、24.5%，G、C 的含量高于 A、T 的含量，其中有 115 个变异位点，57 个单碱基变化位点。利

用 Mega 4 软件中的 Kimura 双参数法统计序列的差异数和碱基替换情况(表 1)。种间核苷酸变异值是 0.016(远海梭子蟹和锯缘青蟹)到 0.253

(长江华溪蟹和黑背地蟹,张口蟹)。碱基替换比值是从 0.740(中华绒螯蟹和远海梭子蟹)到 4.050(远海梭子蟹和锯缘青蟹)。

表 1 7 种蟹的 β -actin 基因序列转换与颠换比(上三角)和序列差异率(下三角)

Tab.1 The numbers of nucleotide transitions/transversions (upper triangle) and percent of sequences differences (lower triangle) for β -actin gene sequences of 7 crabs examined in this study

种类	长江华溪蟹	蓝蟹	中华绒螯蟹	黑背地蟹	张口蟹	远海梭子蟹	锯缘青蟹
长江华溪蟹(<i>S. yangtsekiense</i>)		1.440	1.217	2.147	2.004	1.909	2.000
蓝蟹(<i>C. sapidus</i>)	0.241		1.112	1.053	1.105	1.316	1.361
中华绒螯蟹(<i>E. sinensis</i>)	0.236	0.110		0.750	0.882	0.740	0.789
黑背地蟹(<i>G. lateralis</i>)	0.253	0.219	0.214		1.741	2.806	3.592
张口蟹(<i>N. granulata</i>)	0.253	0.249	0.222	0.172		1.451	1.304
远海梭子蟹(<i>P. pelagicus</i>)	0.213	0.195	0.185	0.072	0.136		4.050
锯缘青蟹(<i>S. serrata</i>)	0.230	0.207	0.198	0.072	0.136	0.016	

2.3 基于 β -actin 基因部分序列的分子系统发育

依据所测定的溪蟹 β -actin 基因片段,基于 Kimura 双参数使用 Mega 4 软件的 NJ 法构建了 7 种蟹的 NJ 树(图 3),并以中华绒螯蟹为外群,PAUP 4.0b10 软件的 ML 法构建了 7 种蟹的 ML 树^[14-16](图 4)。所得 ML 树拓扑结构与 NJ 树完全一致,仅置信度不同。从图中可以看出,7 种蟹中长江华溪蟹所在的溪蟹科,单独形成一支。锯缘青蟹和远海梭子蟹先聚在一起,同属于梭子蟹科,置信度为 96,然后和黑背地蟹聚在一起,置信度 99,再和张口蟹聚在一起,置信度 97。

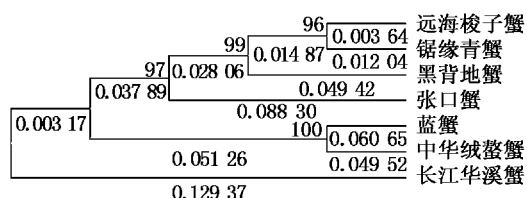


图 3 基于 β -actin 基因片段构建 7 种蟹的 NJ 树

Fig.3 NJ tree of 7 crabs based on partial β -actin sequences

枝上显示 Bootstrap 1000 个循环的置信度和分枝长度

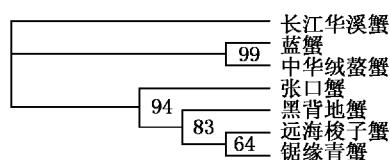


图 4 基于 β -actin 基因片段构建 7 种蟹的 ML 树

Fig.4 ML tree of 7 crabs based on partial β -actin sequences

枝上显示 Bootstrap 1000 个循环的置信度

3 讨论

Actin 是真核生物中广泛存在的一种蛋白质。单体肌动蛋白为球蛋白,一般由 375~377 个氨基酸残基组成,分子量约为 42 ku。单体肌动蛋白在溶液中可聚合成具有活性的双螺旋肌动蛋白丝,是构成肌小节和细胞骨架的主要成分。肌动蛋白非常保守,各种生物间氨基酸序列的同源性高达 70%~100%,高等动物细胞内的肌动蛋白根据等电点的不同可分为 α 、 β 和 γ 3 类, β -actin 序列高度保守^[17-18]。根据本研究测定的 338 bp 的 β -actin 基因序列,推导出溪蟹的部分 β -actin 蛋白序列长 112 个氨基酸残基,所测的基因序列全部在编码区,因而保守性更高。采用 Gamier-Robson 方法和 Chou-Farplus 方法预测其结构蛋白的二级结构, α 螺旋结构较少,但是含有较多的 β 折叠和转角结构,可能与其功能有直接关系。经 BLAST 比对,与 GeneBank 中 actin 蛋白序列同源性达到 91% 以上。Actin 基因序列也有高度保守的特征,同时还具有 mRNA 的表达数量高,而且数量稳定,几乎不随年龄产生变化的特点,对于从分子水平来研究生物进化规律的角度来看, β -actin 无疑是一个非常合适的工具,因此, β -actin 基因常用来做荧光定量分析的内标及分子系统发育分析^[19]。已经有各种生物的 30 905 条 actin 的核苷酸序列和氨基酸序列存于 GeneBank 中,而短尾类仅 6 个物种 8 条 mRNA 和 Aa 序列。因而有必要继续充实 actin 基因数据库。

核苷酸变异值大小反映了亲缘关系的远

近^[17]。本研究涉及到的 7 种蟹的种间核苷酸变异值是 1.6% (远海梭子蟹和锯缘青蟹)到 25.3% (长江华溪蟹和黑背地蟹,张口蟹),说明远海梭子蟹和锯缘青蟹亲缘关系很近,而长江华溪蟹和黑背地蟹,张口蟹亲缘关系较远;其中黑背地蟹和远海梭子蟹,锯缘青蟹间核苷酸变异值都是 7.2%,说明黑背地蟹和远海梭子蟹,锯缘青蟹亲缘关系也较近,而张口蟹和蓝蟹之间核苷酸变异值是 24.9%,说明张口蟹和蓝蟹之间亲缘关系也较远。物种间的序列变异位点是转换多于颠换,这种差异在亲缘关系接近的类群中更为显著。7 种蟹的碱基替换比值是从 0.740 (中华绒螯蟹和远海梭子蟹)到 4.050 (远海梭子蟹和锯缘青蟹),说明中华绒螯蟹和远海梭子蟹亲缘关系较远,同时再次说明远海梭子蟹和锯缘青蟹亲缘关系很近。黑背地蟹和远海梭子蟹间碱基替换值是 3.592,表明黑背地蟹和远海梭子蟹亲缘关系较近。颠换对基因表达的影响大于转换,因而颠换发生多的物种间亲缘关系较远。基于 β -actin 基因片断 7 种蟹的分子系统树中,ML 树的拓扑结构与 NJ 树完全一致,用不同方法获得的系统树一致,表明结果有较高可靠性,长江华溪蟹单独形成一支,支持溪蟹单独划为总科,说明溪蟹与其它海洋蟹的亲缘关系较远。远海梭子蟹和锯缘青蟹先聚在一起,然后和黑背地蟹聚在一起,说明黑背地蟹和梭子蟹科关系较近,再和弓蟹科的张口蟹聚在一起,与传统的形态学分类系统稍有不同。在本研究中,系统树上长江华溪蟹最后聚在一起,分支明显比其他蟹类长,表明溪蟹 β -actin 基因进化速率最快,这与溪蟹从海洋到淡水生存环境的改变有极大关系,可见此基因的进化速率与物种进化速率一致。蓝蟹,中华绒螯蟹聚在一起,置信度 100,ML 树中置信也在 99,说明这两物种 β -actin 基因可能来源于同一祖先。目前,由于蟹类 β -actin 基因序列测定的报道还很有限,构建的树不全面,还需继续增加其它蟹种 actin 基因信息,构建更完整的 actin 基因系统树。

分支系统学和进化分类学的学者主张系统发育是生物分类学研究的目標和建立分类系统的依据,用系统树来表示系统发育的关系^[20]。如果一个分子系统树是根据某一基因数据构建而来时,就称为基因树^[21]。但研究基因树并不总是为了推导物种树。在研究多基因家族的进化时,

了解成员基因的进化史和基因重复的过程十分重要,这时必须研究基因树。本文创新性在于首次研究了长江华溪蟹的 β -actin 基因,并测序提交到 GenBank 数据库中,充实了蟹类的 actin 基因序列,并进行系统发育分析,初步构建了基于 β -actin 基因序列的蟹类系统树。随着越来越多的 actin 基因的克隆和序列测定,对基因本身结构、功能和表达的研究也逐步深入,这将更有利于了解 actin 基因的保守性和变异性与生命起源和进化的关系。

参考文献:

- [1] 戴爱云. 节肢动物门甲壳动物亚门软甲纲十足目束腹蟹科溪蟹科[M]//中国动物志. 北京:科学出版社,1999.
- [2] 邱高峰,徐巧婷,王丽卿,等. 四种绒螯蟹分子分类与系统发育[J]. 动物学报, 2001, 47(6): 640-647.
- [3] 王成辉,李思发,刘至治,等. 3 种中华绒螯蟹群体线粒体 CO II 基因序列测定与进化分析[J]. 水产学报, 2008, 32(1): 8-12.
- [4] 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(2): 309-316.
- [5] TAKISHITA K, INAGAKI Y J, TSUCHIYA M, et al. A close relationship between Cercozoa and Foraminifera supported by phylogenetic analyses based on combined amino acid sequences of three cytoskeletal proteins (actin, α -tubulin, and β -tubulin) [J]. *Gene*, 2005, 362(1): 153-160.
- [6] YAN A, PAN M, LI Y. Phylogenetic trees of three conservative proteins support placement of *Pneumocystis carinii* in archiascomycetes [J]. *China journal of modern medicine*, 2005, 15(23): 3536-3539.
- [7] 李建林,俞菊华,唐永凯,等. 黄鳞 β -肌动蛋白基因的克隆及序列分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(2): 188-191.
- [8] MCKENNA L A, GEHRSTZ A, SODER S, et al. Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage [J]. *Analytical Biochemistry*, 2000, 286(1): 80-85.
- [9] VARADARAJ K, SINDHU K S, SKINNER D M. Actin-encoding cDNAs and gene expression during the intermolt cycle of the Bermuda land crab *Gecarcinus lateralis* [J]. *Gene*, 1996, 171(1): 177-184.
- [10] TAMURA 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.
- [11] 陈明秀,高谦,聂品. 从 18S rRNA 基因序列探讨盾腹吸虫的系统发育关系[J]. 水生生物学报, 2007, 31(6): 817

- 821.
- [12] 周春花, 欧阳珊, 吴小平, 等. 基于 16S rRNA 和 ND1 基因序列的中国蚌科丽蚌属的系统发育[J]. 动物学报, 2007, 53(6): 1024 - 1030.
- [13] 朱世华, 郑文娟, 邹记兴, 等. 基于细胞色素 b 序列的鳢科分子系统发育[J]. 动物学报, 2007, 53(4): 641 - 650.
- [14] BHATTACHARYA D, STICKEL S K, SOGIN M L. Isolation and molecular phylogenetic analysis of actin coding regions from *Emiliania huxleyi*, a Prymnesiophyte Alga, by Reverse Transcriptase and PCR Methods[J]. Mol Biol Evol, 1993, 10(3): 689 - 703.
- [15] 胡红霞, 张勇, 刘晓春, 等. 史氏鲟两种促性腺激素亚基 cDNA 克隆及序列进化分析[J]. 动物学报, 2006, 52(2): 362 - 375.
- [16] 梅洪, 刘国祥, 胡征宇. 基于 28S rDNA 序列的鞘藻目系统发育研究[J]. 水生生物学报, 2007, 31(4): 492 - 498.
- [17] 胡松年, 阎隆飞. 肌动蛋白与真核生物的进化[J]. 动物学报, 1999, 45(4): 40 - 647.
- [18] VOIGT K, COZIJNSEN A J, KROYMANN J, *et al.* Phylogenetic relationships between members of the crucifer pathogenic *Leptosphaeria maculans* species complex as shown by mating type (MAT1-2), actin, and β -tubulin sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 37: 541 - 557.
- [19] 江建平, 周开亚. 从 12S rRNA 基因序列研究中国蛙科 24 种的进化关系[J]. 动物学报, 2001, 47(1): 38 - 44.
- [20] 郑乐怡. 动物分类学方法与原理[M]. 北京: 高等教育出版社, 1987.
- [21] NEI M, KUMAR S. Molecular Evolution and Phylogenetics [M]. Oxford: Oxford University Press, Inc, 2000.

Amplification of cDNA and primary molecular phylogeny based on β -actin gene sequences of a freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*

GAO Ai-bao^{1,2}, WANG Lan¹, YUAN Hui¹

(1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China; 2. Jinzhong University, Jinzhong 030600, China)

Abstract: Amplification and sequence of the β -actin gene of *Sinopotamon yangtsekiense* were conducted with the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). It is aligned with homologous sequences of 6 other crabs from GenBank. The results showed there were 115 variable sites and 57 singleton sites in β -actin homologous sequences of 338 bp. Substitution rates among nucleotide sites were from 1.6% to 25.3% and the numbers of nucleotide transitions / transversions were from 0.740 to 4.050. *Scylla serrata* was more closely related to the sand crab *Portunus pelagicus* than any other species. *S. yangtsekiense* was farther related to *Gecarcinus lateralis*, *Neohelice granulata*. Furthermore, *Eriocheir sinensis* was farther related to *P. pelagicus*. The phylogenetic trees constructed by neighbor joining (NJ) and maximum likelihood (ML) supported the same topology. The phylogenetic analysis implied that *S. yangtsekiense* was singleton branch, far away from other marine crabs, so it should belong to potamidea. *S. serrata* was clustered with *P. pelagicus* firstly, clustered with *G. lateralis* consequently and then *N. granulata* was clustered into them. The results of inferred phylogeny were different from traditional classification scheme based on morphology.

Key words: *Sinopotamon yangtsekiense*; β -actin; RT-PCR; molecular phylogeny