

栉孔扇贝核糖体 RNA 转录间区域的序列测定*

SEQUENCING OF RIBOSOMAL INTERNAL TRANSCRIBED SPACER TWO IN SCALLOP *Chlamys farreri*

孔晓瑜¹ 刘亚军¹ 喻子牛¹ 宋林生² 孙修勤³

(¹ 教育部海水养殖重点实验室, 青岛海洋大学 266003)

(² 中国科学院海洋研究所 266071)

(³ 国家海洋局第一研究所 青岛 266003)

关键词 栉孔扇贝, 核糖体 RNA 转录间区域, 序列测定

栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 在我国主要分布于北方沿海海域, 是我国北方沿海主要的养殖贝类之一。近些年来, 广泛的半人工采苗, 人工育苗及苗种转移等养殖活动增加了各种群间的交流, 从而给各种种群质资源的管理、利用和保护带来一定困难; 同时, 近几年来扇贝的养殖业出现了病害流行、养殖环境恶化等严重问题, 使人们迫切要求进行优质良种的培育, 而这两方面的工作都要求对各种群的遗传特征有充分的认识和研究。

近些年来, 运用等位基因酶电泳方法开展了栉孔扇贝的遗传变异研究^[1], 提供了一些非常有用的信息, 但由于等位基因酶电泳技术本身的不足, 限制了该物种种群遗传特征研究的进一步深入。DNA 多态分析技术是各类群生物的遗传、生态和进化等研究领域的重要工具, 其应用包括从物种鉴定、遗传结构(变异)分析、自然种群和养殖群体的遗传结构的变化等^①。其中, DNA 序列分析是最有效的方法, 因为不论个体还是群体, 任何遗传变异或多态最终体现为 DNA 序列的差异或多态。

对于选定的基因或基因片段可以利用互补于高度保守区域的通用引物进行 PCR 扩增, 然后进行克隆、序列测定。由于核糖体 RNA 转录间区域(ITS-1 和 ITS-2) 具有较大的变异性和易于扩增的特点而成为核基因组中较好的序列分析对象。本文扩增了栉孔扇贝的 ITS-2 区域, 并进行了序列测定, 为进一步开展种群 DNA 多态分析、近缘种类的系统学研究及寻找 DNA

分子标记奠定良好的开端。

1 材料和方法

1.1 实验材料

栉孔扇贝样品 (1 a) 购自农贸市场, 取健康个体外套膜和闭壳肌组织, -20℃ 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取大约 0.1 g 外套膜组织, 尽量剪碎, 用 DNA 提取试剂盒 (Pure Gene, Genta 公司) 提取基因组 DNA, TE 溶解后 -20℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 引物 ITS-2A/B (美国 University of Delaware 的 Gaffney 博士设计) 序列为:

ITS-2A: 5' GGRTCGATGAAGAACGCAG 3'; ITS-2B: 5' GCTCTTCCYGGCTTCACTCG 3'。

PCR 扩增在 PTG100 型 PCR 仪 (MJ Research, USA) 上进行, 25 μl 反应体积内含: 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L 每种 dNTPs, 0.2 μmol/L 每种引物, 1 μl DNA 模

* 国家 973 资助项目 G1999012008 号 国家自然科学基金重点资助项目 39620260 号和国家自然科学基金资助项目 39600113 号。

① Gaffney P. M., E. A. Orbach and Z. Yu, Using the dcode system to identify DNA sequence variation for studies of population structure in marine organisms, Mutation Analysis, Tech Note 1998, 2329

收稿日期: 2000-09-07; 修回日期: 2000-09-12

板,1单位 Taq 酶(Sangon, Canada),及1×缓冲液。PCR反应程序为:94℃预变性2min,然后94℃(45s),50℃(1min),72℃(1min),循环35次,最后72℃延伸5(min),PCR产物1.4%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,凝胶成像系统观察 照像。

1.2.3 PCR产物克隆 PCR产物用 UNIQ5 柱式纯化试剂盒纯化后,连接到 PMD18T载体上。连接反应液10μl,其中载体1μl, Ligation Solution I 5μl,PCR产物4μl,16℃连接1h或4℃过夜,然后连接液转化感受态大肠杆菌 JM09,涂平板,蓝-白斑筛选阳性克隆,液体培养基培养,Pharmacia EasyPrep Kit 提纯质粒,插入片段经 EcoR I 和 Hind III 酶切检测。

1.2.4 测序 使用 Perkin Elmer 公司的 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit 及 Ampli Taq DNA polymerase 在 ABI PRISM 377XL DNA 测序仪上测序。

2 结果与讨论

PCR扩增得到了清晰的 PCR产物(图1)。产物大小为510bp(图2)。碱基序列 A,T,G,C 含量比较均匀,分别为30.00%,21.37%,24.12%和24.51%。作者曾扩增过太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)、海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、深海扇贝(*Placopecten magellanicus*)、虾夷扇贝(*Patinopecten yessoensis*)及贻贝(*Dreissena polymorpha*)等贝类的 ITS-2 区域,得到相应大小的片段,这表明该对引

物结合的序列高度保守,引物通用性好,可以用于近缘种类的系统学研究。在藻类,Patwary 等^[3]已利用它进行了这方面工作。

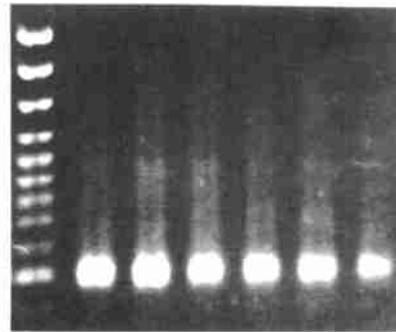


图1 栉孔扇贝核糖体 RNA 转录间区域(ITS2) PCR 扩增产物

等位基因酶电泳方面的工作使我们对栉孔扇贝遗传变异情况有了一个基本的了解和认识,但在另一方面,由于只有约10%的真核生物基因组 DNA 编码蛋白质、酶和存在约24%的同义密码及转录、转译水平的调节作用等,等位基因酶电泳所检测的遗传变异程度受到一定限制^[1]。而 DNA 序列分析不仅可以研究基因组 DNA 编码区和非编码区,更可以检测到许多在蛋白质水平难以检测的 DNA 水平的遗传变异或多态,如碱基替换、插入和缺失等变异信息,从而从 DNA 水平更灵敏地分析个体、群体及种间的遗传差异及多态性。

ITS 2 GenBank accession No: AF245688

```

1  GGGTCGATGA  AGAACGCAGC  CAGGTGCGTG  AATTAATGTG  AATTGCAGGA  CACATTGAAC
61  ATCGATATCT  TGAACGCACA  TTGCGGCTCC  GGGTCACTCC  CGGAGCCACG  CCTGTCTGAG
121  GGTTCGGCAA  ACATCTATCG  CAACCTGCAT  GGCACAGCAG  CATTCGCGCT  TGGACCGTCT
181  CGTCTCCCGG  GCGAGCGGTC  TTAAATGAGG  AATCAGAGTC  TCCAATCGAA  CCAAAAACAA
241  ACCAGTACGG  AACAAATTAC  AAGAGACGCA  GTTCGATTAA  AACACAAAAT  GCGCTCTCGG
301  TTCCGTGAAA  CTGTAGGTTC  GCCTTTTACA  TGTGAAAAAA  AAGGTATGAT  GGTGTA AATT
361  TCTCTGGTCT  ACACAACACT  TTGTGTTTGT  CTTTTACAC  TCCGACCTCA  GATCAGACGA
421  GACTACCCGC  TGAATTTAAG  CATATCACTA  AGCGGAGGAA  AAGAAACTAA  CAAGGATTCC
481  CCCAGTAACG  GCGAGTGAAG  CGGGAAGAGC
    
```

图2 栉孔扇贝核糖体 RNA 转录间区域(ITS2)的核苷酸序列

近几年来,栉孔扇贝养殖业连续遭受病害侵袭,损失严重。从栉孔扇贝的其他分布区(如韩国和朝鲜)引进、更新亲贝是解决问题的途径之一。但是,为了今后栉孔扇贝养殖业的健康发展,有必要对它们进行一些分子遗传学分析和遗传多样性的监测,以便于种质管理、区分和遗传改良,就目前来看,核基因或线粒体基因序列分

析是合适的方法之一。

核糖体 RNA 转录间区域位于核糖体 RNA 基因 16S 与 5.8S 及 5.8S 与 28S 之间,在基因组中进化速度高于基因编码区,因而在许多物种中,其在群体和亚种水平变异较大,Mznka 等^[2]报道,在日本沿岸两个地点采集的紫菜(*Porphyra yezoensis*)中 371 bp 大小的 ITS1 碱基序列

在个体间(叶状体)存在相当大的差异,而用其他方法没有检测到这么大的差异。这表明该紫菜 ITS-1 碱基序列存在较大的种内变异。King(Aquatic Ecology Lab, Leetown Science Center, Biological Resources Division, USA,待发表资料)用 ITS 序列对淡水贝类 *Las nigona subvirdis* 进行了地理系统学研究,表明 ITS 是适用于这一研究的一个有效区域; Allard 1991 年和 Furlong 1983 年等在啮齿类和爪蟾的同类研究中也证明 ITS 序列是适用于从种类鉴别到系统学分析等研究中的合适的片段; Kenchington 测定了大西洋沿岸数种扇贝的 ITS-2 序列,意在建立其分子系统学关系(待发表资料)。因此,作者认为,ITS-2 序列分析将不仅适用于栉孔扇贝的遗传变异及扇贝的系统

学研究,而且会使这些工作进入到更深的层次。

该序列已录入 GenBank,登录号 AF245688。📄

参考文献

- 1 喻子牛,孔晓瑜。海洋湖沼通报,1997,2:32~42
- 2 Mzuka mi Y., H. Kito *et al.*. *Fisheries Science*, 1999, **65**(6): 787~789
- 3 Patwary M. U., C. W. Sensen *et al.*. *J. Phycol.* 1998, 34: 299~305
- 4 Zhang G. and F. Zhang. The genetic structure and variation of five populations in the Chinese scallop, *Chlamys farreri*. *Proceedings of the Fourth Asian Fisheries Forum, Beijing, China Ocean Press*, 1997, 422 (本文编辑:李本川)