

3种蛭类线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段的序列比较及其系统学初步研究

陈丽梅, 孔晓瑜, 喻子牛, 于珊珊, 徐 晖

(中国海洋大学 教育部海水养殖重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 对 3 种蛭类大竹蛭(*Solen grandis*), 长竹蛭(*Solen strictus*)和小刀蛭(*Cultellus attenuatus*)的线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段序列进行了比较并对其系统学进行了初步研究。得到的序列总长度分别为 472~481bp (16S) 和 658bp (COI)。3 种蛭序列的碱基组成均显示出较高的 A+T 比例 (16S rRNA 基因 62.1%; COI 基因 62.8%)。对位排序比较表明, 16S rRNA 片段种内个体间变异较小, 3 种类间存在 128 个碱基变异位点(其中包括 127 个简约信息位点)和 5 个插入/缺失位点, 总共 12 个碱基长; COI 片段有 200 个碱基存在变异, 其中包括 191 个简约信息位点, 不存在任何插入/缺失位点。数据分析结果表明 16S rRNA 和 COI 基因片段大竹蛭与长竹蛭两片段的遗传距离分别为 0.0856 和 0.1712, 两竹蛭类与小刀蛭的遗传距离分别为 0.3054, 0.2798 和 0.2662, 0.2933。作者认为小刀蛭与竹蛭之间的遗传距离已达到科之间的水平, 结果支持将其提升为刀蛭科的分类观点。3 种蛭类线粒体 16S rRNA 和 COI 基因在种间明显的多态性, 证实了 16S rRNA 和 COI 基因序列均普遍适用于蛭类种及以上阶元的系统学分析。

关键词: 竹蛭科; 线粒体; 16S rRNA 基因; COI 基因

中图分类号: Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2005)08-0027-06

蛭类大多分布于热带和温带, 生活于潮间带至水深 400m 左右的海域, 是常见的经济贝类种类。特别是长竹蛭(*Solen strictus* Gould)、大竹蛭(*Solen grandis* Dunker)、小刀蛭(*Cultellus attenuatus* Dunker)在我国分布很广, 北起辽东半岛, 南至海南岛都有分布, 是我国沿海群众所

喜爱的海产贝类之一, 在食用贝类中占有相当重要的地位。蛭类隶属于软体动物门 (Mollusca), 双壳纲 (Bivalvia), 异齿亚纲 (Heterodonta), 帘蛤目 (Veneroida)。在基于形态性状系统学上, 目前对这三种蛭类的相互关系存在某些不同观点, 齐钟彦^[1]将 3 种蛭归为竹蛭科 (Solenidae), 分属竹蛭属 (*Solen*) 和刀蛭属 (*Cultellus*)。徐凤山^[2]则主张将长竹蛭、大竹蛭分为竹蛭科并将刀蛭属提升为刀蛭科 Cultellidae)。

线粒体 DNA 由于具有变异大、母系遗传、解析能力强且检测方便等优点而在系统学研究、遗传变异分析、种类鉴定等领域应用广泛。作者利用序列分析法, 对 3 种蛭的 mtDNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列进行比较, 分析了 3 种蛭两片段的序列组成特性和系统关系, 以期为进一步的遗传分析、种质鉴定和系统进化研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大竹蛭, 长竹蛭, 小刀蛭购自青岛农贸市场。鉴定后取外套膜, -70℃ 冰箱保存。

1.2 DNA 提取和 PCR 扩增

随机选取大竹蛭 3 个, 长竹蛭 3 个, 小刀蛭 5 个, 剪取外

套膜约 100mg 切碎, 采用常规的“酚-氯仿”法提取基因组 DNA。所用 16S rRNA 基因引物序列为: 16S AR :5'-CGC CTG TTT ATC AAA AAC AT -3'; 16S BR:5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T-3'。COI 基因引物序列为: RCOIA :5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'; RCOIB :5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'。PCR 反应总体积为 25 μL, 其中含 2.0mmol/L MgCl₂, 0.2mmol/L 每种 dNTPs, 0.2 μmol/L 每种引物, 1 μLDNA 模板, 1U Taq (TAKARA), 2.5 μL 10 × 缓冲液, 补足灭菌水至终体积。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 2min 后, 94℃ 变性 45s, 46℃ 退火 1min (COI 48℃), 72℃ 延伸 1min, 共运行 35 个循环, 最后一个循环结束后 72℃ 再延伸 5min。PCR 产物用含有溴化乙锭的 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶成像系统观察、照相。用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒 (上海生工) 纯化后, 进行双向测序。

1.3 序列分析

每个个体测得正反向序列用 BioEdit 软件进行拼接, 结合人工校正。用 DNASP 软件检测多态位点 (polymorphic sites) 简约信息位点数 (Parsimony informative sites) 和序列的碱基组成。

收稿日期: 2005-04-06; 修回日期: 2005-06-01

基金项目: 国家 863 计划项目 (2002AA626020) 资助

作者简介: 陈丽梅 (1981-), 女, 蒙族, 内蒙古赤峰人, 主要从事水产动物遗传多样性研究, E-mail: chenlimeicd@yahoo.com.cn; 孔晓瑜, 通讯联系人, E-mail: carlzyu@ouc.edu.cn

用球蚬科的 *Sphaerium striatinum* 相应序列(GenBank 序列号 AF120666 ,COI ;AF 038999 ,16S), 蚬科河蚬 *Corbicula fluminea* (GenBank 序列号 AF120667, COI ;AF152045 ,16S) 做外群进行两个基因片段对位排序, 根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离 (D), 相应的标准误差用 Bootstrap 方法 (重复数=1000) 计算。NJ (neighbor -joining) 和 MP (maximum-parsimony) 系统树通过 MEGA2 软件构建, 采用 Bootstrap (重复数=1000) 检验分子系统树各分支的置信度。

2 结果

2.1 序列特性及碱基组成

经 PCR 扩增, 分别得到 3 种蛭类清晰的 16S rRNA 和 COI 基因片段扩增产物。序列测定表明, 大竹蛭, 长竹蛭, 小刀蛭 16S rRNA 序列长度分别为 480bp,481bp,472bp。COI 基因片段中, 3 种蛭类长度均为 658bp。3 种蛭的 16S rRNA 和 COI 序列片段的碱基组成如表 1 所示, 16S rRNA 序列中, 平均 T 30.7%,

表 1 3 种蛭 16S rRNA 和 COI 基因片段的碱基组成 (%)

Tab.1 The base composition (%) of 16S rRNA and COI gene fragments of the three species

种类	16S					COI				
	T	C	A	G	A+T	T	C	A	G	A+T
<i>Solen gradnis</i>	28.1	15.0	32.7	24.2	60.8	44.8	13.7	19.3	22.2	64.1
<i>S.strictus</i>	30.1	13.9	32.2	23.7	62.3	41.3	16.6	18.4	23.7	59.7
<i>Cultellus attenuatus</i>	32.4	13.8	30.1	23.7	62.5	45.1	13.8	18.5	22.5	63.6
平均	30.7	14.1	31.4	23.8	62.1	44.3	14.4	18.5	22.8	62.8

C 14.1%, A 31.4%, G 23.8%, A+T 62.1%, COI 序列中为 T 44.3%, C 14.4%, A 18.5%, G 22.8%, A+T 62.8% (表 1), A+T 明显高于 G+C 含量。

在 16S rRNA 片段中, 3 个种的种内个体间变异较小, 大竹蛭有 2 个转换 (A-G, C-T), 长竹蛭 3 个序列完全相同, 小刀蛭颠转换换各 1 个 (G-T, G-A)。

要是由 12 个碱基插入/缺失造成的, 其中最长的插入/缺失(7 个碱基)位于位点 44-50; 其它几个一个或两个碱基的插入/缺失分布于序列位点 341-430 之间的 4 个地方。3 种类序列间共检测到有 128 个变异位点, 其中简约信息位点 127 个 (图 1)。而从大竹蛭和长竹蛭来看, 两者之间只有 1 个插入/缺失 (1 个碱基)、46 个变异位点。

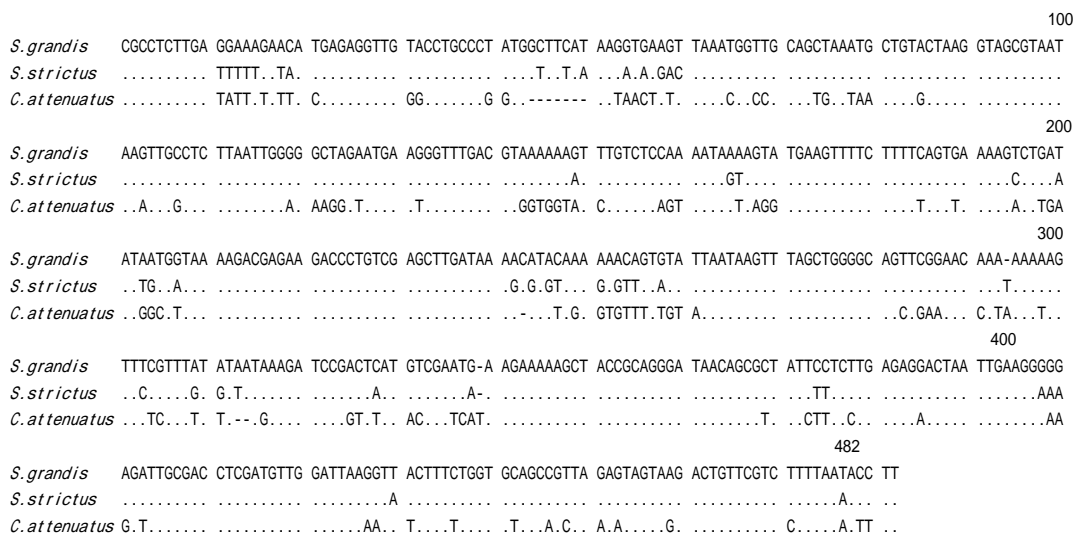


图 1 3 个种 16S rRNA 基因片段序列比较

Fig.1 Sequence alignment of partial 16S rRNA gene fragment in the three species.

与 16S rRNA 片段相比, COI 序列不存在任何插入/缺失位点, 种内个体间变异位点数为 2~18 个, 大竹蛭种内有 2 个变异(A-G, C-T), 长竹蛭共 11 个变异(转换 6 个, 颠换 5 个), 小刀蛭 18 个变异(转换 16 个, 颠换 2 个)。但种间共有 200 个变异位点, 其中简约信息位点 191 个(图 2)。

扩增的 COI 片段编码的肽链长 219 个氨基酸, 碱基替换的位置在第一、二、三位都存在, 但大部分发生在密码子的第 3 位上, 由于密码子兼并现象, 虽然在碱基上有 200 个位点存在差异, 但在序列上, 仅有 37 个氨基酸有变化。3 种蛭类间的氨基酸变异如图 3 所示, 其中, 大竹蛭和长竹蛭之间只有 4 个氨基酸变异, 而大竹蛭和小刀蛭之间有 34 个氨基酸变异。

2.2 遗传距离和系统树

根据 Kimura 双参数模型得出包括外群在内的遗传距离(D)

(表 2), 由 16S rRNA 基因片段所得到的遗传距离中, 大竹蛭和长竹蛭之间遗传距离最小($D=0.0856$), 大竹蛭和小刀蛭之间遗传距离最大($D=0.3054$)。球蚬科 *Sphaerium striatinum* 和蛭类之间的遗传距离在 0.3643~0.4401 之间, 河蚬在 0.3288~0.3798 之间。COI 基因片段的遗传距离这四个数值相应的为 0.1712 和 0.2662; 0.3867~0.4312, 0.3187~0.4254。

对实验所有个体和外群进行聚类分析, 得到 3 种蛭的 NJ, MP 树, 两种系统树的拓扑图总体趋势相似, 所有的种内个体均首先聚在一起; 而种间的聚类可以看出隶属于竹蛭属的大竹蛭和长竹蛭最先聚类, 并得到很高的 Bootstrap 支持, 然后与刀蛭属的小刀蛭聚类。



图 2 3 个种 COI 基因片段序列比较

Fig. 2 Sequence alignment of partial COI gene fragment in the three species

S. grandis TLYIIFAVWS GLVGTSLSL IRLELARPGS YLGDGHLNV IVTAHAFIMI FFLVMPMMVG GFGNWLVLPL LTSPDMCFPR MNNSFWLLP PALFMLLFSG
S. strictusD.....I.....
C. attenuatus ...M.L.F...LMG FM..E.....L.....S... L..L..... F...F..W..

200

S. grandis LAGTGVGAGW TIYPPLSGNL AHGDQSMDF A IFSMHLAGVS SILGAINFVT TMINMRPGIM ELKRVPLFWW SVAITAFLLI IAMPVLGAL TMLLDRHFN
S. strictusVV
C. attenuatus FV.S.I.....SSP..YGA.....A.....V.....S.....I.....V L.....

219

S. grandis TSFFDPGGGG DSILFVHLF
S. strictus
C. attenuatusS... .P.....

图 3 3 种蛭 COI 基因氨基酸序列片段比较

Fig.3 Alignment of amino acid sequences of partial COI gene fragment in the three species.

表 2 3 种蛭类及其外群的 16S rRNA 和 COI 基因序列之间的遗传距离和标准误差

Tab.2 Genetic distances(D) and corresponding standard errors of 16S rRNA and COI gene fragments among the three species and outgroups.

种类	片 段									
	16S rRNA 基因					COI 基因				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
1 <i>S. grandis</i>	***	0.0142	0.0296	0.0384	0.0354	***	0.0171	0.0218	0.0289	0.0301
2 <i>S. strictus</i>	0.0856	***	0.0283	0.0362	0.0343	0.1712	***	0.0236	0.0321	0.0313
3 <i>.attenuatus</i>	0.3054	0.2798	***	0.0339	0.0314	0.2662	0.2933	***	0.0297	0.0309
4 <i>.striatinum</i>	0.4401	0.4139	0.3643	***	0.0341	0.3873	0.4312	0.3867	***	0.0256
5 <i>C. fluminea</i>	0.3798	0.3628	0.3288	0.3721	***	0.3834	0.3994	0.4254	0.3187	***

注：遗传距离：对角线下方，标准误差：对角线上方

3 讨论

一般认为，在线粒体基因组中，12S rRNA 和 16S rRNA 基因进化速率低，比较保守，而 COI 基因为变异性较大的区域。在不少无脊椎动物检测到了较大的变异^[3,4]。从本实验的结果可以看出，在长度为 481bp 的 16S rRNA 片段中，蛭类 3 个种间存在 128 个碱基变异，而在长度为 658bp 的 COI 基因片段中，蛭类 3 个种之间存在高达 200 个碱基的变异。从种内变异来看，以在 16S rRNA 和 COI 基因中种内变异都是最大的小刀蛭为例，在 16S rRNA 中种内变异为 0.5%，而在 COI 基因中则高达 2.3%。

由此可见，在文中得到的 3 种蛭的 16S rRNA 和 COI 基因序列中，COI 基因表现出的种内和种间趋异都要高于 16S rRNA 基因，说明在蛭类的 3 个种类中，COI 基因的进化速率与 16S rRNA 基因相比要快，16S rRNA 基因则相对保守一些。蛭类线粒体 16S rRNA 和 COI 基因在不同种间其多态性的明显差异，

证实了 16S rRNA 和 COI 基因序列均普遍适用于蛭类种以上阶元的遗传多样性分析。

作者得到的蛭类两片段 A+T 含量相差不大，分别为 62.1% 和 62.8%，都明显高于 G+C 含量，这一结果与其他研究者在头足类，甲壳类，双壳贝类等的 16S rRNA，12S rRNA 和 COI 基因中观察到的结果一致^[3-8]，即较高的 AT 含量，是目前观测到的无脊椎动物线粒体 DNA 序列中的普遍现象^[9]。

由 16S rRNA 和 COI 基因片段得到的系统树及遗传距离所表现的趋势相似，5 种帘蛤目的贝类中，大竹蛭与长竹蛭两片段的遗传距离分别为 0.0856 和 0.1712，两者在形态上相似度也较高，亲缘关系较近。两蛭类与小刀蛭的遗传距离分别为 0.3054，0.2798 和 0.2662，0.2933。与两竹蛭相比，小刀蛭与两者之间的距离明显要大一些，3 种蛭类与外群的球蛭科 *Sphaerium striatinum* 和蛭科河蚬的遗传距离均在 16S rRNA 0.3288 ~ 0.4401 和 COI 基因片段 0.3187 ~ 0.4312 之间，在 COI 基因片

段中灯塔蛤科的缢蛏 (*Sinonovacula constricta*) 与两竹蛏的遗传距离为 0.2843 和 0.3256。基于两片段的系统树聚类结果可看

出所有种内个体均首先聚在一起。同属的两竹蛏先聚在一起然后再与小刀蛏聚类，外群的两则依次加入。

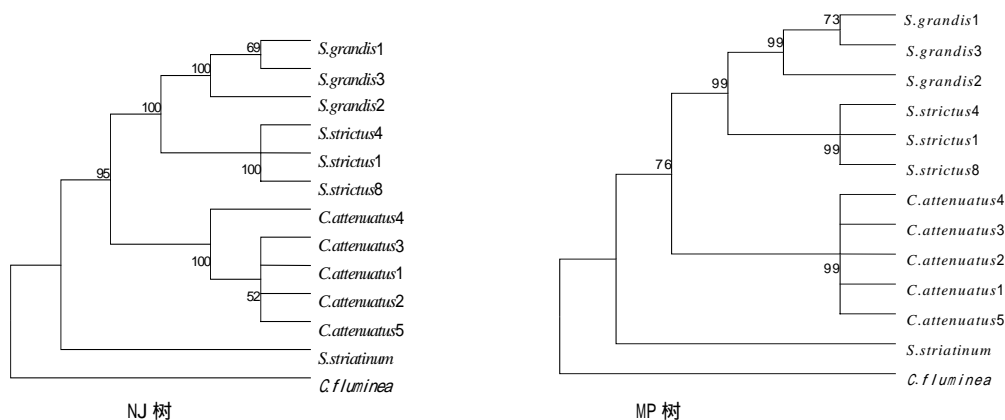


图 4 基于 3 种蛏和外群 16S rRNA 基因的 NJ 和 MP 系统树

Fig.4 NJ and MP phylogenetic trees based on 16S rRNA gene sequences of the three species and out groups

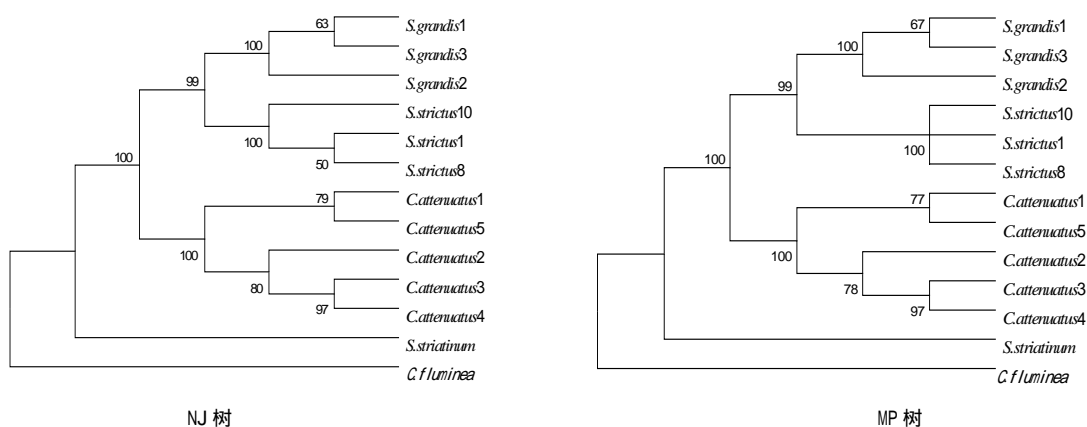


图 5 基于 3 种蛏和外群 COI 基因片段序列的 NJ 和 MP 树

Fig.5 NJ and MP phylogenetic trees based on COI gene sequences of the three species and out groups.

杨明等^[10]做了 4 种竹蛏的肌浆蛋白的电泳分析，通过蛋白质图谱的相似性对大竹蛏，长竹蛏，小刀蛏以及缢蛏的分类关系进行了探讨，得出大竹蛏，长竹蛏之间的相似性较大为 0.52，小刀蛏与两竹蛏之间为 0.13~0.32，缢蛏与两竹蛏之间为 0.13~0.20。综合上两基因片段分析结果与蛋白质图谱分析结果比较，作者认为小刀蛏与竹蛏之间的遗传距离已达到科之间的水平，相比较形态的分类结果支持徐凤山将其提升为刀蛏科的观点。

参考文献：

- [1] 齐钟彦.中国经济软体动物[M].北京：中国农业出版社，1998.233-237.
- [2] 徐凤山.中国海双壳类软体动物[M].北京：科学出版社，1997.186-189.
- [3] How land D E ,Hewitt G M. Phylogeny of the colepters based

- on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data [J]. *Insect Mol Bio*, 1995, 4:203-205.
- [4] Spicer G B. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex[J]. *Mol Evol*, 1995, 41:749-759.
- [5] Zheng X D, Wang R C, Wang X F, *et al*. Genetic variation in population of the common Chinese cuttlefish *Sepiella maindroni* (Mollusca:Cephalopoda) using allozymes and mitochondrial DNA sequence analysis [J]. *Shellfish Research*, 2001, 20(3):1159-1165.
- [6] Anderson F E. Phylogeny and historical biogeography of the loliginid squids (Mollusca : Cephalopoda) based on mitochondrial DNA sequence data[J]. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 2000, 15(2):191-214.
- [7] 孔晓瑜, 刘亚军, 喻子牛, 等. 栉孔扇贝和海湾扇贝线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段序列研究[A]. 中国贝类学会主编. 贝类学论文集第 IX 辑[C]. 北京: 海洋出版社 2001, 9:59-63.
- [8] 高天祥, 张秀梅, 吉崎悟朗, 等. 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹线粒体 12S rRNA 基因序列研究[J]. 中国海洋大学学报, 2000, 30(1): 43-47
- [9] 杨建敏, 郑小东, 王如才等. 3 种鲍 16S rRNA 基因片段序列的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(1): 36-40
- [10] 杨明, 马纯艳, 彭霞. 四种竹蛏肌浆蛋白的电泳分析[J]. 沈阳师范学院学报(自然科学版), 2000, 18(3): 40-43

Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA 16S rRNA and COI gene fragments in three species of razor shell

CHEN Li-mei, KONG Xiao-yu, YU Zi-niu, YU Shan-shan, XU Hui

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Key words: *Solenidae*; mitochondrial DNA; 16S rRNA gene; COI gene

Received: Apr., 11, 2005

Abstract: Sequence comparison and phylogenetic analysis of mtDNA 16S rRNA and COI gene fragments in three species of razor shell were made using PCR and direct sequencing. The three species are *Solen grandis* Dunker, *Solen strictus* Gould and *Cultellus attenuatus* Dunker. Nucleotide sequences of 472~481bp for 16S rRNA gene and 658bp for COI gene were obtained, respectively. A high percentage of A+T base composition in the two sequences was observed. Alignment indicated that variation level of intra-species was low in both sequences. Five indels and 128 variable sites were detected for 16S rRNA gene fragment (of which 127 were parsimony informative ones) across the three species. Two hundred polymorphic sites were detected in COI gene fragments and 191 were parsimony informative among the three species, with no indels. Genetic distances between *S. grandis* and *S. strictus* were 0.0856 (with 16S rRNA gene) and 0.1712 (with COI gene), respectively. However, with both sequence data, the genetic distances between the two *Solen* species and *C. attenuatus* were significantly larger, with numbers of 0.3054 and 0.2662 for 16S rRNA gene data, and numbers of 0.2798 and 0.2933 for COI gene data, respectively. These genetic distances have reached family level, and are in favor of the opinion that genus *Cultellus* should be promoted to family Cultellidae.

(本文编辑:张培新)