

杂色龙虾线粒体基因组全序列的测定与分析

刘 皓, 姚 维, 刘海情, 刘楚吾, 刘 丽

(广东海洋大学 水产学院 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要: 为了解杂色龙虾(*Panulirus versicolor*)线粒体基因组多态位点及遗传变异, 对龙虾类的分类研究奠定基础, 作者通过常规 PCR 步移扩增法获得杂色龙虾线的线粒体基因组全序列, 分析了其线粒体基因组的基本特征以及基因排列情况, 并结合中国龙虾(*Panulirus stimposni*)、波纹龙虾(*Panulirus homarus*)线粒体基因组全序列, 综合分析了龙虾属线粒体编码基因多态位点及基因变异状况。结果表明: 杂色龙虾线粒体基因组全序列为 15 700 bp, 由 13 个蛋白质编码基因、22 个 *tRNA* 基因、2 个 *rRNA* 基因和 D-loop 区组成, 保持了泛甲壳动物线粒体基因组的原始排列。杂色龙虾线粒体 DNA 的碱基组成具有 AT 偏好性, A+T 含量为 67%, 4 种碱基的含量分别为(A=34.6%, T=32.1%, C=20.5%, G=12.8%)。预测了杂色龙虾 18 个 *tRNA* 以及 2 个 *rRNA* 的二级结构。龙虾属线粒体基因组中的 *nad 2*、*nad 5* 基因以及 D-loop 区的多态位点比例较高, 适合作为分子标记用于龙虾类系统进化关系、种内多态性以及遗传分化等方面的研究。

关键词: 杂色龙虾(*Panulirus versicolor*); 线粒体基因组; RNA 二级结构; 分子标记

中图分类号: Q959 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)11-0016-08

doi: 10.11759/hyxx20131126001

动物线粒体基因组(mitochondrial DNA, mtDNA)是核外遗传物质, 结构简单, 具有典型的母系遗传特征^[1], 受精时, 父本 mtDNA 无法进入卵细胞, 受精卵的 mtDNA 直接来自母本, 不存在父母双方 mtDNA 的重组过程。mtDNA 进化速度相对较快, 大约是单拷贝核基因进化速度的 6~7 倍^[2-3]。mtDNA 还缺少具有校对功能的酶, 呈游离裸露状态且无组蛋白的保护, 由于其修复系统不健全、代增时间比较短和选择压力小等原因, 造成的突变很容易固定下来。尽管动物线粒体在基因组上具有很高的保守性, 但在种群内或不同物种间存在较大的差异^[2, 4-6]。利用这种高效的单倍体母系遗传方式以及差异性, 只需少量材料就能反映群体的遗传结构, 可缩减用于测有效种群的群体大小, 提高对遗传漂变的敏感性, 便于进行群体分析^[7]。后生动物 mtDNA 为典型的环状双链分子结构, 长度大多在 14~18 kb, 编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白质基因、22 个 *tRNA* 基因以及 12S *rRNA* 和 16S *rRNA* 基因^[8]。近年来, 研究者们非常关注后生动物 mtDNA 的基因排列, 主要是因为它是研究系统进化的一个很好的模型^[9-12]。

作者报道了杂色龙虾的线粒体基因组全序列特征, 并在杂色龙虾(*Panulirus versicolor*)、中国龙虾

(*Panulirus stimposni*)、波纹龙虾(*Panulirus homarus*)3 个物种线粒体基因组全序列的基础上分析了龙虾属线粒体基因组多态位点及遗传变异, 为进一步从分子水平对龙虾类的分类研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用杂色龙虾样品来自广东湛江霞山水产品市场, 取其肌肉, -20℃保存于无水乙醇中备用。

1.2 基因组总 DNA 的提取

以杂色龙虾的肌肉为实验材料, 参照《现代分子生物学实验技术》, 采用苯酚-氯仿法提取基因组总 DNA^[13]。并利用核酸定量仪检测 DNA 的浓度和纯度, 然后 4℃保存备用。

1.3 引物设计

利用甲壳动物 *cox1*、*nad5* 和 *Cyt b* 3 种编码基因

收稿日期: 2013-11-26; 修回日期: 2014-06-22

基金项目: 国家科技支撑计划资助项目(2007BAD29B03)

作者简介: 刘皓(1981-), 男, 湖南湘乡市人, 硕士, 主要从事水产经济动物发育生物学研究, E-mail: liuh@gdou.edu.cn; 刘丽, 通信作者, E-mail: zjoulili@163.com

的通用引物扩增出 3 个片段^[14-16]。然后在 GenBank 中选取与杂色龙虾线粒体基因组同源性比较高的 3 个物种(中国龙虾(NC014339)、日本龙虾(*Panulirus japonicus*)(NC004251)和锦绣龙虾(*Panulirus ornatus*)

(NC014854)^[17-19]的序列进行序列比对, 选取保守性较高的区域, 利用 Primer 5.0 软件设计了 19 对 PCR 引物(表 1), 覆盖杂色龙虾线粒体基因组全序列, 引物由上海生工生物技术服务有限公司合成。

表 1 线粒体 DNA 基因组序列测定引物

Tab.1 PCR and sequencing primers used in the analysis of *P. Versicolor* mitogenome

编号	上游引物(5'-3')	下游引物 (5'-3')
1F/1R	TTTGGACACATCAATCTTTGACCCA	CAGGAGCTTAAATCCTGCGCAT
2F/2R	ATGCGCAGGATTTAAGCTCCTG	AAAATGTCCDTARGACAACCTCRAGC
3F/3R	CCCATACTGATRAAAGTGAGGT	AGGATTGAATAAYTGCAACAGCTGA
4F/4R	CTAGCTGTTGCARTTATTCAATCCT	GACTTTCCAYTTGGAAGGMGGAGGT
5F/5R	ACCTCCKCCTTCCAARTGGAAAGT	TAGAATATTGCATTGAAGCTGCAAA
6F/6R	TTTGCAGCTTCAATGCAATATTCT	AAGATTTTTCATTCTGGTAATAGAT
7F/7R	GAATACCTTTAACTTCTTCGCTTAT	ATAGWTTTRTATTYTCTTGCAGTCC
8F/8R	GGACTGCAAGARAATAAYAAWCTA	AAAGCTCAYGTWGARGCTCCAGT
9F/9R	ACTGGAGCYTCSACRTGAGCTTT	TTAATTTTGGGGATTAAAGATAGGG
10F/10R	ACCCTATCTTTAATCCCCAAAATTA	TTGTCCGTAGGAATCCATAGTT
11F/11R	ATTAGACCCATACCTTCTAGGAGAC	GTWGCWCARACTATTTGTTATGAGG
12F/12R	CCTCATAAGAAATAGTYTGWGCWA	GCCTGTTTATCAAAAACATGTCTT
13F/13R	TGCTACCTTAGCACGGTCATRGATC	CTAAAGTGTGTACATATTGCCCGTC
14F/14R	ACCTTCACTAGGACATCGAGTTTAA	GATATTCTYGGAATTGGTGTAAGTC
15F/15R	CTACTATTCCCAAACCTCACTCACAG	AATGATTGGTGCCAAGTGTTATAGTG
16F/16R	GACTTACACCAATTCCRAGAATATC	GARAAAAATCATCGTTGCGT
17F/17R	AGATGCTAACCATATTCCGCTCAAA	TGTAGCGTTTGTGACTTTACTGGAGC
18F/18R	CCCCTAACATTACGAACCTTAACCT	CTAATGGGTGAACTAGGCGAGTGAA
19F/19R	GTCCCCGTAACCTCAAATACCATAAC	TAGATTACAATCCATGCAGCTACACC
Lco1490/H	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATC
Nad5F/R	TWYTATTAGGKTGAGATGGKYTNNG	TARAAKCCWGMTARAAAWGGKAWWCC
cobF424/R	GGWTAYGTWYTWCCTGRGGWGAT	GCRTAWGCRAAWARRAARTAYCAYTCW

1.4 PCR 扩增

PCR 反应体系: 反应总体积为 25 μ L, 其中, 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, dNTP2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 0.15 μ L, DNA 模板 1 μ L, 去离子水 18.35 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 48~58 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.5 扩增产物的纯化回收及测序

取 PCR 产物 2 μ L 在 1% 的琼脂糖凝胶中进行电泳, 凝胶成像仪拍照记录。用 QIAquick Gel Extraction 50 柱式胶回收试剂盒纯化扩增产物, 纯化的步骤按试剂盒说明书进行。取适量纯化产物作为测序反应的模板, 委托上海生工生物技术服务有限公司

进行测序。

1.6 序列拼接及分析

所测得序列用 Lasergeneversion 7.0(DNASTAR) 软件包进行分析, 用 Seqman 对重叠群进行拼接, 然后用 Clustal W 软件对拼接后的序列进行人工校对。参考中国龙虾、日本龙虾和锦绣龙虾的线粒体基因组 DNA 数据对所获得序列的蛋白编码基因、*rRNA* 和 *tRNA* 基因进行识别, 并通过 tRNAscan-SE 搜索服务器(<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)^[20]进行识别 tRNA 的再验证。利用 MEGA5.0^[21]分析各种区段的碱基组成特征, 密码子使用频率, 通过 DnaSP 4.10.7^[22]分析龙虾属线粒体基因组的编码基因多态位点和基因变异特征。

2 结果与分析

2.1 杂色龙虾线粒体基因组全序列的基本特征

杂色龙虾 mtDNA 全长为 15 700 bp(GenBank 登

录号为 JQ320274), 由 13 个蛋白质编码基因、22 个 *tRNA* 基因、2 个 *rRNA* 基因(16S *rRNA* 和 12S *rRNA*) 以及 D-loop 控制区组成(表 2)。其中 14 个基因位于轻链(L)上, 分别为 12S *rRNA*, 16S *rRNA*, *nad* 1, *nad* 4L, *nad* 4, *nad* 5, *tRNA*^{Val}, *tRNA*^{Leu-CUN}, *tRNA*^{Pro}, *tRNA*^{His},

表 2 杂色龙虾线粒体基因组组成

Tab.2 Gene organization of *P. versicolor* mitochondrial genome

基因	编码链	起始位置	终止位置	起始密码子	终止密码子	反密码子
<i>cox</i> 1	H	1	1535	ACG		
<i>tRNA</i> ^{Leu}	H	1536	1599			TAA
<i>cox</i> 2	H	1603	2290	ATG	T	
<i>tRNA</i> ^{Lys}	H	2291	2355			TTT
<i>tRNA</i> ^{Asp}	H	2366	2428			GTC
<i>atp</i> 8	H	2430	2588	ATG	TAA	
<i>atp</i> 6	H	2582	3259	ATG	TAA	
<i>cox</i> 3	H	3259	4049	ATG	T	
<i>tRNA</i> ^{Gly}	H	4045	4115			TCC
<i>nad</i> 3	H	4116	4467	ATC	T	
<i>tRNA</i> ^{Ala}	H	4468	4530			TGC
<i>tRNA</i> ^{Arg}	H	4533	4596			TCG
<i>tRNA</i> ^{Asn}	H	4601	4666			GTT
<i>tRNA</i> ^{Ser}	H	4667	4734			TCA
<i>tRNA</i> ^{Glu}	H	4734	4805			TTC
<i>tRNA</i> ^{Phe}	L	4812	4879			GAA
<i>nad</i> 5	L	4880	6608	ATG	T	
<i>tRNA</i> ^{His}	L	6609	6674			GTG
<i>nad</i> 4	L	6674	8014	ATG	T	
<i>nad</i> 4L	L	8008	8310	ATG	TAA	
<i>tRNA</i> ^{Thr}	H	8313	8380			TGT
<i>tRNA</i> ^{Pro}	L	8381	8448			TGG
<i>nad</i> 6	H	8451	8967	ATA	TAA	
<i>Cytb</i>	H	8967	10101	ATG	T	
<i>tRNA</i> ^{Ser}	H	10102	10169			TGA
<i>nad</i> 1	L	10200	11144	ATG	TAA	
<i>tRNA</i> ^{Leu}	L	11180	11249			TAG
16S <i>rRNA</i>	L	11247	12607			
<i>tRNA</i> ^{Val}	L	12608	12679			TAC
12S <i>rRNA</i>	L	12680	13541			
A+T rich	L	13542	14291			
<i>tRNA</i> ^{Ile}	H	14292	14357			GAT
<i>tRNA</i> ^{Gln}	L	14355	14424			TTG
<i>tRNA</i> ^{Met}	H	14433	14500			CAT
<i>nad</i> 2	H	14501	15502	GTG	T	
<i>tRNA</i> ^{Trp}	H	15501	15569			TCA
<i>tRNA</i> ^{Cys}	L	15569	15634			GCA
<i>tRNA</i> ^{Tyr}	L	15635	15700			GTA

tRNA^{Phe}, *tRNA^{Cys}*, *tRNA^{Tyr}*, *tRNA^{Gln}*, 其余 23 个基因位于重链(H)上。

杂色龙虾线粒体基因组存在 11 处基因重叠, 重叠区长度 1~6 bp 不等, 基因间隔有 10 处, 大小在 1~36 bp, 基因间隔最大的在 *tRNA^{Ser}* 与 *nad 1* 和 *nad 1* 与 *tRNA^{Leu}* 之间, 分别是 17 bp 和 36 bp; 既没有重叠, 也没有间隔的基因共计 15 处。杂色龙虾线粒体 DNA 的碱基组成具有 AT 偏好性, A+T 含量为 67%, 4 种碱基的含量分别为(A=34.6%, T=32.1%, C=20.5%, G=12.8%), 变化趋势与其他甲壳动物基本一致, A 含量

最高而 G 含量最低, 在 A+T 富集区表现更为明显。

线粒体基因排列能够提供重要的系统进化信息, 一般而言, 泛甲壳动物的线粒体基因组的基因排列顺序基本相同, 但十足目较为复杂。作者研究的杂色龙虾保持了泛甲壳动物线粒体基因组的原始排列, 没有出现重组/随机丢失现象。

2.2 蛋白编码基因

在杂色龙虾线粒体基因组中, 参与蛋白质编码的基因有 13 个(表 3), 核苷酸共 11140 bp, 占全序列的 70.96%。杂色龙虾的 *atp 6* 与 *atp 8* 之间和 *nad 4* 与

表 3 杂色龙虾粒体基因组 13 个蛋白编码基因密码子使用情况

Tab.3 Average codon frequencies and usage in the 13 mitochondrial protein-coding genes in *P. versicolor*

密码子(氨基酸)	使用次数	百分比(%)	密码子(氨基酸)	使用次数	百分比(%)
UUU(F)	239	1.35	UCU(S)	111	1.5
UUC(F)	116	0.65	UCC(S)	84	1.13
UUA(L)	196	2.01	UCA(S)	117	1.58
UUG(L)	57	0.58	UCG(S)	24	0.32
CUU(L)	109	1.12	CCU(P)	72	1.18
CUC(L)	87	0.89	CCC(P)	77	1.26
CUA(L)	110	1.13	CCA(P)	76	1.24
CUG(L)	26	0.27	CCG(P)	20	0.33
AUU(I)	245	1.35	ACU(T)	111	1.35
AUC(I)	117	0.65	ACC(T)	84	1.02
AUA(M)	170	1.58	ACA(T)	110	1.33
AUG(M)	45	0.42	ACG(T)	25	0.3
GUU(V)	72	1.73	GCU(A)	56	1.45
GUC(V)	31	0.75	GCC(A)	30	0.78
GUA(V)	47	1.13	GCA(A)	58	1.51
GUG(V)	16	0.39	GCG(A)	10	0.26
UAU(Y)	179	1.35	UGU(C)	50	1.06
UAC(Y)	87	0.65	UGC(C)	44	0.94
UAA(*)	151	1.4	UGA(*)	59	1.15
UAG(*)	64	0.6	UGG(W)	44	0.85
CAU(H)	92	1.12	CGU(R)	26	0.85
CAC(H)	72	0.88	CGC(R)	29	0.94
CAA(Q)	123	1.37	CGA(R)	41	1.33
CAG(Q)	57	0.63	CGG(R)	27	0.88
AAU(N)	218	1.27	AGU(S)	58	0.78
AAC(N)	124	0.73	AGC(S)	60	0.81
AAA(K)	280	1.49	AGA(R)	87	1.17
AAG(K)	95	0.51	AGG(R)	52	0.7
GAU(D)	65	1.11	GGU(G)	37	1.23
GAC(D)	52	0.89	GGC(G)	22	0.73
GAA(E)	92	1.43	GGA(G)	41	1.37
GAG(E)	37	0.57	GGG(G)	20	0.67

nad 4L 之间的重叠情况一致, 均重叠 7 个碱基。除 *cox* 1 和 *nad* 2 外, 其余的 11 个蛋白质编码基因都以标准的 ATN 作为起始密码子。*nad* 2 的起始密码子为 GTG, *cox* 1 的起始密码子为 ACG。除 *atp* 6、*atp* 8、*cox* 3、*nad* 1、*nad* 2、*nad* 4L 和 *nad* 6 的终止密码子是 TAA 外, 其余的终止密码子为不完全的 T 或 TA, 在后生动物中这种不完全密码子比较常见。Ojala 等^[23]的研究表明, 成熟的终止密码子 TAA 可以通过转录后的多腺苷酸化产生。

2.3 tRNA 基因与 rRNA 基因

杂色龙虾 mtDNA 序列与其他物种一样, 也包含 22 个 *tRNA* 基因。除 *tRNA^{Leu}* 和 *tRNA^{Ser}* 有 2 个, 其他 18 个均只有 1 个序列。每个 *tRNA* 均能折叠成三叶草状二级结构, 长度为 61~75 bp 不等。12s *rRNA* 基因位于 *tRNA^{Val}* 和 D-loop 之间, 长度为 861 bp, 16s *rRNA* 基因位于 *tRNA^{Leu}* 和 *tRNA^{Val}* 之间, 长度为 1 460 bp。两个 *rRNA* 基因都位于轻链上, 其方向与龙虾属的其他物种完全一致。本研究成功地预测出 18 个 *tRNA* 基因的二级结构和两个 *rRNA* 基因的二级结构。预测到的 12s *rRNA* 的二级结构含有 3 个结构域, 40 个茎环结构, 它的 3'端存在一个茎环结构; 16s *rRNA* 二级结构都有 6 个结构域, 53 个茎环结构。

在相近种种间或种内的遗传变异分析研究中, 选取分子标记片段至关重要。本研究在中国龙虾, 杂色龙虾, 波纹龙虾 3 个物种线粒体基因组全序列基础上分析了龙虾属线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因、D-loop 及 2 个核糖体 RNA 基因的多态位点分析 (表 4)。结果显示: 多态位点比例较大的基因有 *nad* 2、*nad* 4、*nad* 5、*Cyt* b、D-loop。

3 讨论与结论

3.1 杂色龙虾线粒体基因组全序列

杂色龙虾线粒体基因组序列全长 15 700 bp, 稍大于中国龙虾^[18]的 15 677 bp, 而稍小于日本龙虾^[17]的 15 717 bp, 在软甲亚纲的范围内。杂色龙虾线粒体基因组的基因排列次序与其他龙虾类及节肢动物的基本模式相同, 没有 KD 倒置现象, 即 *tRNA^{Asp}*(D) 排在 *tRNA^{Lys}*(K) 基因上游(DK 排列)^[24]。杂色龙虾线粒体 DNA 的碱基组成具有很强的 AT 偏好性, A+T 含量为 67%, 稍高于中国龙虾的 65.6%和日本龙虾的 64.5%。4 种碱基的含量分别为(A=34.6%, T=32.1%, C=20.5%, G=12.8%), 变化趋势与其他甲壳动物基本

表 4 龙虾属线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因、D-loop 及 2 个核糖体 RNA 基因的多态位点分析

Tab.4 Polymorphic loci analysis of 13 protein-coding genes, D-loop and two ribosomes RNA gene in Lobster (*Panulirus*) mitochondrial genome

基因	总位点数*	多态位点数	使用个数	多态位点比例(%)
<i>cox</i> 1	1530	348	1188	22.66
<i>cox</i> 2	688	167	521	24.27
<i>cox</i> 3	791	156	635	19.72
<i>atp</i> 6	678	151	527	22.27
<i>atp</i> 8	159	34	125	21.38
<i>nad</i> 1	933	161	772	17.26
<i>nad</i> 2	1000	285	715	28.50
<i>nad</i> 3	352	78	274	22.16
<i>nad</i> 4	1339	337	1002	25.16
<i>nad</i> 4L	303	60	243	19.80
<i>nad</i> 5	1729	419	1310	24.23
<i>nad</i> 6	516	148	368	28.68
<i>Cyt</i> b	1135	292	843	25.73
12sRNA	855	109	746	12.75
16sRNA	1343	262	1081	19.51
D-loop	724	286	438	39.50

注: * 总位点数不包含插入和缺失的位点信息

一致, A 含量最多而 G 含量最少, 在 A+T 富集区表现更为明显, 这与线粒体含有大量 ATP 有着密切的联系。蛋白质基因 *nad* 4 和 *nad* 4L, *atp* 6、*atp* 8 和 *cox* 3 紧密相连, 没有 *tRNA* 基因的间隔, 这也说明存在于蛋白质编码基因间的 *tRNA* 二级结构是多顺反子, 在转录过程中不进行蛋白质编码基因间隔序列的形成^[25]。

3.2 蛋白质编码基因

与日本龙虾及中国龙虾一样, 杂色龙虾的 *atp* 6 与 *atp* 8 之间和 *nad* 4 与 *nad* 4L 之间均重叠 7 个碱基。除 *cox* 1 的起始密码子为 ACG、*nad* 2 的起始密码子为 GTG 外, 其余的 11 个蛋白质编码基因都以标准的 ATN 作为起始密码子。除 *atp* 6、*atp* 8、*cox* 3、*nad* 1、*nad* 2、*nad* 4L 和 *nad* 6 的终止密码子是 TAA 外, 其余的终止密码子为不完全的 T 或 TA, 在后生动物中这种不完全密码子比较常见。Ojala 等^[23]的研究表明, 成熟的终止密码子 TAA 可以通过转录后的多腺苷酸化产生。

从表 3 可以看出, 杂色龙虾组成蛋白质的氨基酸中按数目的多少排列分别为: Ser, Leu, Ile, Phe, Tyr, Pro, Asn, Thr, Lys, Met, Gln, Val, His, Ala, Glu, Arg, Gly, Asp, Trp, Cys。这与已知的龙虾属其他物种的氨

氨基酸排列顺序大致相同,说明龙虾属各物种的蛋白质编码基因序列之间的替换多为同义替换,没有影响所编码的氨基酸种类。在杂色龙虾线粒体基因组中,占主导地位的是非极性氨基酸,其次是极性不带电的氨基酸。根据生物分子的相似相溶性原理可知,其线粒体 DNA 所编码的蛋白质为疏水蛋白质。另外,从编码同一个氨基酸不同密码子的使用个数和百分比来看,三联密码子的第三位点有 4 种摆动形式,第三位点为 G 的密码子使用个数较少,这也反映了线粒体蛋白质编码基因在使用密码子上的明显偏好,即反 G 偏倚。

3.3 *tRNA* 基因与 *rRNA* 基因

杂色龙虾 mtDNA 也编码 22 个 *tRNA* 基因。*tRNA^{Leu}* 和 *tRNA^{Ser}* 有 2 个序列,其他 18 个均只有 1 个序列。长度范围为 61~75 bp。所预测到的二级结构,仅 *tRNA^{Ser}* 无 DHC 臂,由 7 个核苷酸取代了该位置,其余的 *tRNA* 都能形成典型的三叶草结构,这是后生动物线粒体基因组的一个普遍特征。杂色龙虾的 18 个 *tRNA* 的二级结构中出现 16 处错配,其中 14 处为 GU 错配,2 处 UU 错配,发生在 *tRNA^{Tyr}* 和 *tRNA^{Gln}* 的氨基酸接受臂和 T ψ C 臂。有学者认为线粒体基因组 *tRNA* 基因的部分错配可以通过 RNA 编辑校正,不会引起氨基酸转运上的障碍^[26]。12s *rRNA* 基因位于 *tRNA^{Val}* 和 D-loop 之间,长度为 861bp,16s *rRNA* 基因位于 *tRNA^{Leu}* 和 *tRNA^{Val}* 之间,长度为 1 460 bp。两个 *rRNA* 基因都编码在轻链上,其方向与龙虾属的其他物种完全一致^[17-18]。预测到的杂色龙虾 16s *rRNA* 二级结构,有 6 个结构域,53 个茎环结构;12s *rRNA* 的二级结构含有 3 个结构域,40 个茎环结构,它的 3'端存在一个茎环结构,Cannone 等^[27]认为 12s *rRNA* 和类似 12s *rRNA* 的二级结构都存在该茎环结构。杂色龙虾的 *rRNA* 二级结构与其他脊椎动物的基本相同^[28],这说明 *rRNA* 基因进化非常慢,在相当长的进化过程中,其分子的排列变化不大,功能几乎保持恒定。

3.4 A+T 富集区

目前对 A+T 富集区域的关注主要集中于所包含的与复制相关的调控信息。由于其在进化过程中选择压力相对较小,较线粒体其他区域具有更高的多态性,不同种类动物线粒体 DNA 大小的差异主要是由该区域的变化造成的^[29]。杂色龙虾控制区与其他后生动物的相似,主要包括 5 个结构:轻链复制起点

(origin of minority strand replication)、poly T(poly-thymidine stretch)结构、高度变异区、类似微卫星的重复序列以及靠近 *tRNA^{Ile}* 上游的一段 poly T 结构^[30-31],这段 Poly(T)结构,与复制起点的识别有关^[32]。

3.5 基因多态位点分析

通常 *cox 1*、*Cyt b* 被认为适用于近缘物种的区分和鉴定,在群体遗传、分类学、系统进化、动物保护生物学以及古生物化石等研究方面得到了广泛的应用^[33-35]。本研究,通过对多态位点的分析得知:*cox 1* 的多态位点比例较低,不适宜用于龙虾类分子进化研究。*nad 2*、D-loop 基因的多态位点比例较高,尤其是 D-loop,高达 39.50%,且基因片段较长,而 *nad 5* 基因拥有的多态位点总数最多(>400),因此,他们比较适合作为分子标记用于分析龙虾类生物进化过程中的谱系发生和迁移流动以及群体间线粒体基因组进化全序列比较分析、系统发育进化、种内多态性研究、遗传分化等。

参考文献:

- [1] 李冬玲. 线粒体病的母系遗传[J]. 潍坊学院学报, 2006, 6(4): 85-87.
- [2] Moriyama E N, Powell J R. Synonymous substitution rates in *Drosophila*: mitochondrial versus nuclear genes[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1997, 45(4): 378-391.
- [3] Caccone A, Gentile G, Burns C E, et al. Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm *Galapagos tortoises*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 31(2): 794-798.
- [4] Brown W M, George M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(4): 1967-1971.
- [5] 刘丽, 李晓娜, 陈育盛, 等. 基于线粒体基因的珊瑚礁分子系统学研究[J]. 海洋与湖沼, 2012, 43(4): 814-820.
- [6] 刘丽, 李文娟, 刘楚吾. 广东徐闻地区滨珊瑚遗传多样性和系统发生关系[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(2): 371-376.
- [7] 廖顺尧, 鲁成. 动物线粒体基因组研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(5): 508-512.

- [8] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution[J]. International Review of Cytology, 1992, 141: 173-216.
- [9] Beagley C T, Okimoto R, Wolstenholme D R. The mitochondrial genome of the sea anemone *Metridium senile* (Cnidaria): introns, a paucity of *tRNA* genes, and a near-standard genetic code[J]. Genetics, 1998, 148(3): 1091-1108.
- [10] 牛屹东, 李明, 魏辅文, 等. 线粒体 DNA 用作分子标记的可靠性和研究前景[J]. 遗传, 2001, 23(6): 593-598.
- [11] 刘楚吾, 徐田军, 刘丽, 等. 笛鲷属(*Lutjanus*)鱼类线粒体 *16s rRNA* 基因序列比较及系统学分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 563-571.
- [12] Liu X, Guo Y, Wang Z, et al. The complete mitochondrial genome sequence of *Trichiurus nanhaiensis* (Perciformes: Trichiuridae) [J]. Mitochondrial DNA, 2013, 24(5): 516-517.
- [13] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第2版)[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 61-66.
- [14] Folmer O, Black M, Hoeh W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology, 1994, 3: 294-299.
- [15] Lavrov D V, Brown W M, Boore J L, et al. Phylogenetic position of the Pentastomida and (pan) crustacean relationships[J]. Proceedings of the Royal Society B, 2004, 271(1538): 537-544.
- [16] Boore J L, Brown W M. Mitochondrial genomes of *Galathealinum*, *Helobdella*, and *Platynereis*: sequence and gene arrangement comparisons indicate that Pogonophora is not a phylum and Annelida and Arthropoda are not sister taxa[J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(1): 87-106.
- [17] Yamauchi M, Masaki U M, Mutsumi N. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (Crustacea: Decapoda) [J]. Gene, 2002, 295 (1): 89-96.
- [18] Liu Y, Cui Z. Complete mitochondrial genome of the Chinese spiny lobster *Panulirus stimpsoni* (Crustacea: Decapoda): genome characterization and phylogenetic considerations [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(1): 403-410.
- [19] Liang H F. Complete mitochondrial genome of the ornate rock lobster *Panulirus ornatus* (Crustacea: Decapoda) [J]. African Journal of Biotechnology, 2012, 11(80): 14519-14528.
- [20] Newman S J, Cappo M, Williams D M. Age, growth and mortality of the stripey, *Lutjanus carponotatus* (Richardson) and the brown-stripe snapper, *L. vitta* (Quoy and Gaimard) from the central Great Barrier Reef, Australia [J]. Fishery Research, 2000, 48(3): 263-275.
- [21] Koichiro T, Daniel P, Nicholas P, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Molecular Biology and Evolution, 2011, 28 (10): 2731-2739.
- [22] Rozas J, Sanche E L. DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Biomedical Informatics, 2003, 19(18): 2496-2497.
- [23] Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria [J]. Nature, 1981, 290(5806): 470-474.
- [24] Ballard J W O, Dean M D. The mitochondrial genome: mutation, selection and recombination [J]. Current Opinion in Genetics and Development, 2001, 11(6): 667-672.
- [25] Kurabayashi A, Ueshima R. Complete sequence of the mitochondrial DNA of the primitive Opisthobranch gastropod *Pupa strigosa*: systematic implication of the genome organization [J]. Molecular Biology and Evolution, 2000, 17(2): 266-277.
- [26] Yokobori S, Paabo S. Transfer RNA editing in land snail mitochondria [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(22): 10432-10435.
- [27] Cannone J J, Subramanian S, Schnare M N, et al. The comparative RNA web (CRW) site: an online database of comparative sequence and structure information for ribosomal intron and other RNAs [J]. BMC Bioinfor-

- matix, 2002, 3(1): 15.
- [28] Hixson J E, Brown W M. A comparison of the small ribosomal RNA genes from the mitochondrial DNA of the great apes and humans: sequence, structure evolution and phylogenetic implications[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1986, 3(1): 1-18.
- [29] Zhang D X, Hewitt G M. Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 1997, 25(2): 99-120.
- [30] Lee W J, Conroy J. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1995, 12(1): 54-66.
- [31] Giles R E, Blane H. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1980, 77(11): 6715-6719.
- [32] Ye W, Dang J P, Xie L D, et al. Complete mitochondrial genome of *teleogryllus emma* (Orthoptera: Gryllidae) with a new gene order in Orthoptera[J]. *Zoological Research*, 2008, 29(3): 236-244.
- [33] Ferran P. Phylogenetic relationships between spiny, slipper and coral lobsters (Crustacea, Decapoda, Achelata) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 50(1): 152-162.
- [34] George R W, Main A R. The evolution of spiny lobsters (Palinuridae): a study of evolution in the marine environment[J]. *Society for the Study of Evolution*, 1967, 21(4): 803-820.
- [35] George R W. Tethys origin and subsequent radiation of the spiny lobsters (Palinuridae) [J]. *Crustaceana*, 2006, 79(6): 397-422.

Sequencing and analysis of the complete mitochondrial genome of *Panulirus versicolor*

LIU Hao, YAO Wei, LIU Hai-qing, LIU Chu-wu, LIU Li

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524025, China)

Received: Nov., 26, 2013

Key words: *Panulirus versicolor*; mitochondrial genome; RNA secondary structure; molecular markers

Abstract: The complete sequence of *Panulirus versicolor* mitochondrial genome was determined by using conventional PCR and conserved primers walking approaches. The basic characteristics and gene arrangement of *P. versicolor* mitochondrial genome were analyzed. Combined with the mitochondrial genome of *P. stimposni* and *P. homarus*, the mitochondrial genes encoding polymorphic loci and gene mutation of *Panulirus* were also analyzed. The results show that the entire mitochondrial genome of *P. versicolor* is 15700 bp in length, consisting of 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes and 2 rRNA genes and D-loop control area, which maintained the original arrangement of crustacean animal mitochondrial genomes. The composition of *P. versicolor* mitochondrial DNA base has AT preference, with 67% A+T content and the content of A, T, C, and G was 34.6%, 32.1%, 20.5, % and 12.8% respectively. The secondary structure of 18 tRNA and 2 rRNA of *P. versicolor* was predicted. The percentage of polymorphic loci of *Panulirus* mitochondrial genome in *nad 2*, *nad 5* gene and D-loop control region is high, which are suitable for the phylogenetic relationships, intraspecific polymorphism and genetic differentiation research of *Panulirus* as molecular markers.

(本文编辑: 谭雪静)