

6 种鳗鲡(*Anguilla*)线粒体 DNA CO_{II} 基因序列分析 及其系统发育*

田鑫江^{1,2} 吴宁^{1,2} 黎中宝^{1,2} 林小云^{1,2}
张志红^{1,2} 陈晓姣^{1,2} 陈丽娜^{1,2}

(1. 集美大学水产学院 厦门 361021; 2. 集美大学水产生物技术研究所 厦门 361021)

摘要 采用基因测序的方法,对 6 种鳗鲡的 CO_{II} 基因片段进行了 PCR 扩增和测序。结果表明,6 种鳗鲡 CO_{II} 基因片段的长度都为 412bp,4 种碱基组成非常相似,并且 A+T 的含量都大于 G+C 的含量。6 种鳗鲡 CO_{II} 基因片段核苷酸序列之间有 46bp 的差异,其中有 6 处发生碱基颠换,40 处发生碱基转换。非洲鳗鲡(*Anguilla mossambic*)和日本鳗鲡(*A. japonica*)CO_{II} 基因片段核苷酸序列差异最大为 27bp,同源率为 93.45%,而日本鳗鲡和菲律宾鳗鲡(*A. marmorata*)CO_{II} 基因片段核苷酸序列差异最小为 5bp,同源率为 98.79%。

关键词 鳗鲡, mtDNA CO_{II} 基因, 序列差异, 颠换, 转换
中图分类号 Q75

鳗鲡(*Anguilla*)隶属于鳗鲡目(Anguilliformes)、鳗鲡科(Anguilliformes)、鳗鲡属(*Anguilla*),全世界鳗鲡属的鱼类共有 19 种(包含亚种),广泛分布于太平洋、印度洋和大西洋(董金海等, 1993; 连珍水, 1993)。鳗鲡营养丰富、肉味鲜美,且有滋补身体的功效,被誉为“水中人参”。鳗鲡养殖业是我国水产品出口创汇的重要项目。随着人们对我国沿海鳗鲡苗资源的过度捕捞、环境污染的日益严重以及拦河建坝等,使得我国鳗鲡种质资源急剧减少,并且在多年的鳗鲡养殖过程中病害发生日益频繁,且病原复杂(潘海平等, 2009),严重制约了我国鳗鲡养殖业的发展。因此非常有必要对我国常见鳗鲡养殖品种的遗传背景进行系统研究。

目前国内外的学者利用分子标记技术对鳗鲡的遗传结构(龚小玲等, 2007, 2009; Tseng *et al.*, 2001; Mank *et al.*, 2003)、种质鉴定(杨弘等, 2002; 吴宁等, 2010; Rehbein *et al.*, 2002; Aoyama *et al.*, 2001; Minegishi *et al.*, 2005)等方面进行了研究,但尚未发现对本

文中 6 种鳗鲡 CO_{II} 基因片段序列比较研究的报道。本文首次采用 DNA 测序技术对本文中 6 种鳗鲡的 CO_{II} 基因片段序列进行比较研究,以期对鳗鲡种质资源保护和可持续发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

日本鳗鲡(*Anguilla japonica*)、欧洲鳗鲡(*A. anguilla*)、美洲鳗鲡(*A. rostrata*)于 2008 年 3 月,印尼鳗鲡(*A. bicolor* Pacifica)、菲律宾鳗鲡(*A. marmorata*)、非洲鳗鲡(*A. mossambic*)于 2009 年 3 月均通过福建天马公司从产出国引进。样品低温运输到实验室后,保存于 95%的酒精中。每一个群体随机取 3 个个体共 18 个样品,用于 CO_{II} 基因片段的序列扩增和测序。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用上海生工生物工程技术有限公司的基因组小量抽提试剂盒提取基因组 DNA,所有操作均按照试剂盒说明书。通过琼脂糖凝胶电泳检测提取基

* 公益性行业(农业)科研专项经费项目,“鳗鲡种质鉴定与新品种引进”,nyhyzx07-043-08 号;集美大学创新团队建设项目,集大人(2007)17 号。田鑫江, E-mail: tianxinjiang12345@163.com

通讯作者: 黎中宝, 博士, 教授, E-mail: lizhongbao@jmu.edu.cn

收稿日期: 2010-06-23, 收修改稿日期: 2010-08-31

因组DNA的完整性,用紫外分光光度计测量DNA的OD值,测定其浓度,取5 μ l DNA加水稀释至100ng/ μ l,置4℃保存备用。

1.3 PCR 扩增

根据NCBI中已公布的日本鳗鲡线粒体DNA COI序列,利用primer5.0设计COI基因片段引物,正向引物为COI a: 5'-AACTACTTCATTTCCACGAC-3',反向引物为COI b: 5'-CTAAGGATGGGACTGCTC-3'。PCR扩增反应总体积为50 μ l,反应体系:10 \times buffer 5.0 μ l, MgCl₂ (25mmol/L) 4.0 μ l, Taq DNA聚合酶(5U/ μ l) 0.5 μ l, dNTP (10mmol/L) 1.25 μ l, 正反向引物(10 μ mol/L)各1.25 μ l, 模板2.5 μ l, 加水补足至50 μ l。

PCR反应在Mastercycler PCR仪(Eppendorf)上进行扩增,扩增反应为:94℃变性5min;然后35个循环:94℃变性30s, 49℃退火30s, 72℃延伸1min;最后72℃保温10min。PCR产物用1%含EB的琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统检测并拍照。

1.4 测序和分析

扩增产物在上海美季生物技术有限公司测序,测序使用的是美国ABI公司生产的ABI3730XL全自动DNA测序仪,为了保证所测DNA序列的准确性和可靠性,每个样品均使用双向测序,用Chromas软件进行序列分析。用BioEdit7.0软件对6种鳗鲡线粒体DNA的COI基因片段的核苷酸序列进行比对,分析其基因片段的分子变异和碱基组成。

2 结果

2.1 6种鳗鲡COI基因片段序列扩增

用COI a和COI b对6种鳗鲡基因组进行PCR扩增,扩增产物分子量大小在450bp(包括引物序列)左右,扩增产物凝胶电泳图谱清晰,见图1。

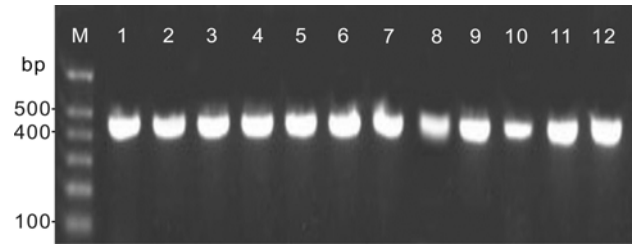


图1 6种鳗鲡mtDNA COI的基因片段扩增电泳图谱

Fig.1 Electrophoresis profiles of the mtDNA COI gene fragments of the six *Anguilla* genus after PCR amplification
注:1、2为美洲鳗鲡;3、4为欧洲鳗鲡;5、6为非洲鳗鲡;7、8为印尼鳗鲡;9、10为菲律宾鳗鲡;11、12为日本鳗鲡

经双向测序6种鳗鲡COI基因片段的长度都为412bp(不包括引物序列),见图2。美洲鳗鲡、欧洲鳗鲡、非洲鳗鲡、印尼鳗鲡、菲律宾鳗鲡、日本鳗鲡COI片段碱基组成(A、T、G、C)非常相似,并且A+T含量也非常相似分别为60.41%、61.89%、62.38%、61.89%、61.89%、61.41%,见表1。6种鳗鲡COI基因片段核苷酸序列共有46个变异位点,其中非洲鳗鲡和日本鳗鲡COI基因片段核苷酸序列差异最大为27bp,差异为6.55%,同源率为93.45%,而日本鳗鲡和菲律宾鳗鲡COI基因片段核苷酸序列差异最小为5bp,差异为1.21%,同源率为98.79%(图2)。6种鳗鲡之间COI基因片段核苷酸序列差异见图2,6种鳗鲡COI基因片段核苷酸序列之间共发生6处碱基颠换,在38bp位点上印尼鳗鲡和其他5种鳗鲡之间、159bp位点上日本鳗鲡与其他5种鳗鲡之间、162bp位点上非洲鳗鲡与其他5种鳗鲡之间都发生A↔C颠换;在138bp位点上印尼鳗鲡与其他5种鳗鲡之间发生T↔A颠换;在150bp位点上欧洲鳗鲡、美洲鳗鲡与其他4种鳗鲡之间发生C↔A颠换,剩余40处变异位点之间都是发生碱基转换。

表1 6种鳗鲡mtDNA COI的基因片段的碱基组成(%)

Tab.1 Base compositions of the six mtDNA COI gene fragments (%)

物种	A	T	G	C	A+T
美洲鳗鲡 <i>A. rostrata</i>	33.74	26.67	15.53	24.06	60.41
欧洲鳗鲡 <i>A. anguilla</i>	33.74	28.15	15.29	22.82	61.89
非洲鳗鲡 <i>A. mossambica</i>	34.95	27.43	14.81	22.81	62.38
印尼鳗鲡 <i>A. bicolor</i> Pacifica	34.22	27.67	14.81	23.30	61.89
菲律宾鳗鲡 <i>A. marmorata</i>	34.22	27.67	14.81	23.30	61.89
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	33.98	27.43	15.53	23.06	61.41

<i>Anguilla mossambica</i>	CACGCGCTAATAATTGTTTTCTAATTAGCGTCCTAGTACTTTATATTATTGTAGCAATAGTAACTGCCAAAGTTACCAA
<i>A. rostrata</i>	.. T.....
<i>A. anguilla</i>	.. T.....
<i>A. bicolor</i> Pacifica	.. T.. A..... T..... A..... C..... G..... T..
<i>A. mormorata</i>	.. T..... G.....
<i>A. japonica</i>	.. T..... G..... G.....
<i>Anguilla mossambica</i>	CATATTCATCCTAGATTCACAAGAAATTGAAATTGTGTGAACCGTATTACCAGCAGCAATCCTAATTCTAATTGCACTCC
<i>A. rostrata</i>	... G.. T.. T..... G..... T..... C.. C.....
<i>A. anguilla</i>	... G.... T..... G..... T..... C.. C.....
<i>A. bicolor</i> Pacifica	... G.. T.... G..... C..... T.. T..... C.....
<i>A. mormorata</i>	... G.. T..... G..... T..... C.....
<i>A. japonica</i>	... G.. T..... G..... C..... G..... T..... C.... A.
<i>Anguilla mossambica</i>	CATCTCTACGGATCCTTTATCTAATAGACGAAATCAATGACCCACACTTAACAATTAAGCAATCGGACATCAATGATAC
<i>A. rostrata</i>	. C..... A..... T..... T.....
<i>A. anguilla</i>	. C..... A..... G..... T..... T.....
<i>A. bicolor</i> Pacifica	. C..... C..... T.....
<i>A. mormorata</i>	. C... T..... C..... T..... T.....
<i>A. japonica</i>	. C... T..... C..... T..... T.....
<i>Anguilla mossambica</i>	TGAAGCTACGAATATACTGATTATGAAGACCTTGGATTGACTCATACATAATCCCAACACAAGACTTGACCCAGGGCA
<i>A. rostrata</i> G.... C.. C.. C..... G.... G.... G..... C. A..... A..
<i>A. anguilla</i> C..... G.... G..... AG..... A..
<i>A. bicolor</i> Pacifica G..... C..... A..... A..
<i>A. mormorata</i> G.. C.... C..... G..... A..... A..
<i>A. japonica</i> G.. C.... C..... G..... A..... A..
<i>Anguilla mossambica</i>	ATTCCGACTGCTAGAAACAGACCATCGAATAGTAGTACCAATAGAATCACCTGTACGAGTATTAGTAACAGCAGAAGACG
<i>A. rostrata</i> T.....
<i>A. anguilla</i> T.....
<i>A. bicolor</i> Pacifica T..... C..... C.....
<i>A. mormorata</i> C.... T.....
<i>A. japonica</i> A..... C.... T.....
<i>Anguilla mossambica</i>	TCTTGCATTCAT
<i>A. rostrata</i>	... A.. C...
<i>A. anguilla</i>	... A.. C...
<i>A. bicolor</i> Pacifica	... A.. C...
<i>A. mormorata</i>	... A.. C...
<i>A. japonica</i>	... A.. C...

图 2 6 种鳗鲡 mtDNA CO 的基因片段序列比较

Fig.2 Comparison of the sequences of the six mtDNA CO gene fragments

2.2 构建6种鳗鲡的NJ进化树

根据测序所得6种鳗鲡COI基因片段序列,利用MEGA4.0软件构建6种鳗鲡NJ进化树。在构建的NJ进化树中,日本鳗鲡与菲律宾鳗鲡先聚为一支,再与印尼鳗鲡聚为一支,然后与美洲鳗鲡和欧洲鳗鲡聚在一起,最后与非洲鳗鲡聚在一起(图3)。

3 讨论

本实验所获得的6种鳗鲡COI基因片段长度都为412bp,6种鳗鲡COI基因片段核苷酸序列共有46bp的差异,其中6处发生碱基颠换,40处发生碱基转换,非洲鳗鲡和日本鳗鲡COI基因片段核苷酸序列差异最大为27bp,差异为6.55%,同源率为93.45%;而日本鳗鲡和菲律宾鳗鲡COI基因片段核苷酸序列差异最小为5bp,差异为1.21%,同源率为98.79%。6种鳗鲡之间COI基因片段核苷酸序列差异率介于1.21%—6.55%之间,而实验中同一群体的3个不同个体之间COI基因片段核苷酸序列几乎无差异,因此6种鳗鲡能通过COI基因片段的序列测定而被有效的鉴定区分。实验所测6种鳗鲡COI基因片段序列中A、T、G、C的含量都非常相似,并且A+T的含量明显高于G+C的含量,这与鲟属鱼类(张凤英等,2008)、暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)(邵爱华等,2006)、鲟属鱼类(张凤英等,2006)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)(林琪等,2008)的COI基因片段扩增结果以及羊鲍(*Haliotis ovina*)、耳鲍(*H. asinina*)(黎中宝,2008)COI基因片段扩增结果相似。

根据6种鳗鲡COI基因片段序列构建的NJ进化树(图3),6种鳗鲡的聚类结果与作者根据COI基因片段序列所构建的NJ进化树中6种鳗鲡的聚类结果有所不同。在根据COI基因片段序列构建的NJ

进化树中,日本鳗鲡和菲律宾鳗鲡先聚为一支,再与印尼鳗鲡聚为一支,然后与美洲鳗鲡和欧洲鳗鲡聚在一起,最后和非洲鳗鲡聚在一起;而在根据COI基因片段序列构建的NJ进化树中(吴宁等,2010),印尼鳗鲡和菲律宾鳗鲡先聚为一支,再与日本鳗鲡聚在一起,然后与非洲鳗鲡聚在一起,最后它们与美洲鳗鲡和欧洲鳗鲡聚在一起,造成这种结果的原因可能是实验中所研究的目的基因片段以及基因片段长度不同造成的。学者们曾利用不同的基因片段研究鳗鲡的系统进化从而得出了不同的结论,Aoyama等(2001)通过对18种鳗鲡(包括3个亚种)的16S rRNA和Cyt b全序列研究认为婆罗洲鳗鲡(*A. borneensis*)是鳗鲡中最早衍生出来的种,是所有鳗鲡的基础种,并且鳗鲡可分为4个不同的地理种群;而Minegishi等(2005)对世界上18种鳗鲡的全线粒体DNA序列进行了系统进化研究,结果认为莫桑比克鳗鲡(*A. mosambica*)是鳗鲡18个种中最早分化出来的种,是所有鳗鲡的基础生物种,除了婆罗洲鳗鲡以外剩余16个种形成3个地理分布:大西洋2种,大洋洲3种,印度-太平洋11种,因此实验中研究目的基因的不同以及基因片段长度的不同会得到不同实验结果。

参 考 文 献

- 杨弘,王希道,2002.用RAPD技术研究3种鳗鲡鱼的种质鉴定.中国水产科学,9(3):269—272
- 连珍水,1993.世界鳗鲡种类分布产卵场及鳗鲡苗汛期.福建水产,(4):78—82
- 吴宁,黎中宝,林小云等,2010.6种鳗鲡(*Anguilla*)线粒体DNA COI序列的比较研究.海洋与湖沼,41(6):930—934
- 张凤英,马凌波,施兆鸿等,2006.两种鲟属鱼类线粒体COI基因片段序列的比较.上海水产大学学报,15(4):403—408
- 张凤英,马凌波,施兆鸿等,2008.3种鲟属鱼类线粒体COI基因序列变异及系统进化.中国水产科学,15(3):392—399
- 邵爱华,朱江,陈葵等,2006.暗纹东方鲀线粒体COI及其侧翼tRNA基因的克隆与序列分析.遗传,28(8):963—971
- 林琪,李少菁,黎中宝等,2008.中国东南沿海青蟹属不同种类的mtDNA COI基因序列分析及其系统发育.厦门大学学报:自然科学版,47(2):268—273
- 龚小玲,李思发,王成辉,2007.长江口日本鳗鲡群体遗传多样性RAPD初步分析.上海水产大学学报,16(3):201—206
- 龚小玲,李思发,蔡完其等,2009.澳洲鳗鲡微卫星分子标记的筛选与检测.中国水产科学,16(1):133—138
- 董金海,祝茜,1993.鳗鲡属鱼类研究现状及存在的若干问

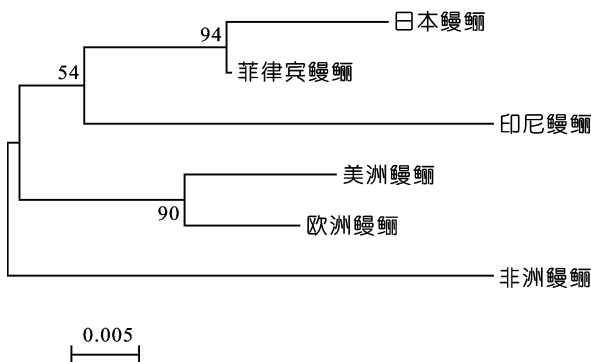


图3 6种鳗鲡mtDNA COI序列NJ进化树

Fig.3 NJ tree of the six *Anguilla* species based on the mtDNA COI sequence

- 题探讨. 海洋科学, (6): 21—23
- 黎中宝, 2008. 羊鲍(*Haliotis ovina*)和耳鲍(*H. asinina*) mtDNA CO₁ 和 CO₂ 基因片段序列的比较研究. 海洋与湖沼, 39(2): 168—173
- 潘海平, 吴 斌, 曾占壮等, 2009. 日本鳗鲡体表溃疡病病原菌的分离、鉴定及单克隆抗体的制备. 中国水产科学, 16(2): 295—302
- Aoyama J, Nishida M, Tsukamoto K, 2001. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eel, genus *Anguilla*. Molecular Phylogenetics and Evolution, 20(3): 450—459
- Mank J, Avise J, 2003. Microsatellite variation and differentiation in North Atlantic eels. Journal of Heredity, 94(4): 310
- Minegishi Y, Aoyama J, Inoue J *et al*, 2005. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution, 34(1): 134—146
- Rehbein H, Sotelo C, Perez-Martin R *et al*, 2002. Differentiation of raw or processed eel by PCR-based techniques: restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP) and single strand conformation polymorphism analysis (SSCP). European Food Research and Technology, 214(2): 171—177
- Tseng M, Chen C, Kao H *et al*, 2001. Polymorphisms of GA/GT microsatellite loci from *Anguilla japonica*. Marine Biotechnology, 3(3): 275—280

SEQUENCING ANALYSIS OF THE mtDNA CO₁ GENE FRAGMENTS OF SIX ANGUILLA SPECIES

TIAN Xin-Jiang^{1,2}, WU Ning^{1,2}, LI Zhong-Bao^{1,2}, LIN Xiao-Yun^{1,2},
ZHANG Zhi-Hong^{1,2}, CHEN Xiao-Jiao^{1,2}, CHEN Li-Na^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen, 361021; 2. Institute of Aquaculture Biotechnology, Jimei University, Xiamen, 361021)

Abstract MtDNA CO₁ gene fragments of six *Anguilla* species were amplified using the PCR method, and the products were purified and sequenced. The results showed that all the mtDNA CO₁ gene fragments had 412bp with similar base composition, which had greater amount of the A+T pairs than the G+C pairs. The difference among the six mtDNA CO₁ genes was 46bp, including 6 base transversions and 40 base transitions. The difference between the mtDNA CO₁ genes of *A. mossambica* and *A. japonica* was 27bp with 93.45% homology; however the difference between those of *A. japonica* and *A. marmorata* was 5bp with 98.79% homology.

Key words *Anguilla*, mtDNA CO₁ gene, Sequence difference, Transversion, Transition