

# 岱衢族大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*) 线粒体基因组全序列的扩增及其 特异鉴别引物的开发\*

沈锡权<sup>1</sup> 何萌萌<sup>1</sup> 严小军<sup>1</sup> 薛良义<sup>1</sup> 吴雄飞<sup>2</sup>

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211;

2. 浙江省宁波市海洋与渔业研究院 宁波 315012)

**提要** 采用 PCR 扩增、克隆获得了岱衢族和闽-粤东族大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)线粒体基因全长序列,并扩增了各 25 条样本的高变区域,测序结果可分成 3 个操作分类单元(Operational Taxonomic Unit, OTU);闽-粤东族含 3 个类型: D1-N1、D1-N2 和 D2 型;而岱衢族样品均为 D1-N1 型;设计出能区分不同分型的鉴别引物 J1 和 J2,且优化了鉴别条件。结果表明:根据凝胶电泳的图片,如果样品分型为 D1-N2 和 D2 型,则 100%为闽-粤东族;如果样品分型为 D1-N1 型,则该样品为岱衢族的概率为 86.2%,为闽-粤东族的概率为 13.8%。研究结果为岱衢族大黄鱼的种质资源保护、良种选育和市场销售等方面提供技术支持。

**关键词** 岱衢族大黄鱼;闽-粤东族大黄鱼;线粒体基因组;OTU;鉴别  
中图分类号 S917

野生岱衢族大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)资源由于酷渔滥捕和缺乏应有的种质资源保护措施而濒临衰竭(陈卫忠,1994)。为有效保护岱衢族大黄鱼的种质资源,2007 年宁波市开始启动岱衢族大黄鱼野生亲本采捕、保活、繁育和种质库建设项目,在岱衢洋成功捕获 8 尾亲鱼。经过驯养、促熟、催产和人工繁育,截至到 2011 年底,已规模化生产出全长 5cm 以上岱衢族大黄鱼 340 万尾(徐吟梅,2011)。

因岱衢族大黄鱼在体色、体型、营养价值和风味等方面优势(李明云等,2009),在市场上价格要比闽-粤东族大黄鱼高;在养殖方面,其生长速度、成活率、发病率、饵料系数(陈琳等,2007)和抗寒能力(徐镇等,2006)等方面也强于福建的闽-粤东族大黄鱼。而在宁波、舟山地区养殖的大黄鱼绝大部分为闽-粤东族大黄鱼,其在外观上与岱衢族大黄鱼很相似,

采用传统的性状观察,主观性强,也很难进行有效区分。因此,开发岱衢族大黄鱼区别于闽-粤东族大黄鱼的鉴别方法,对于种质资源保护、良种选育和市场销售等方面都显得非常重要。

目前对于岱衢族大黄鱼和闽-粤东族大黄鱼的遗传多样性研究较多(刘必谦等,2005;黄良敏等,2006;丁诗华等,2006;Cui *et al.*,2009;毛勇等,2010;黄振远等,2011),但对于岱衢族大黄鱼的鉴别方法仅有少量报道,丁文超等(2009)通过对 10 个贡献率较大的形态变量进行逐步判别分析,建立了大黄鱼 4 个家系的判别公式,综合判别率为 92.5%,其中岱衢洋大黄鱼样本选自野生种驯化的第 2 代,然而随着繁育代数的增加,岱衢族大黄鱼的形态性状难免发生变化,从而会对综合判别率造成影响。中国专利(专利号:200610135259)(王德祥等,2006)公开了不同种群大黄

\* 国家星火计划项目,2011GA701001 号;宁波市岱衢族大黄鱼科技创新团队项目,2011B82018 号;宁波市重大科技攻关项目,2011C1105 号。沈锡权,博士研究生,E-mail:shenxiqun@nbu.edu.cn

通讯作者:严小军,博士,研究员,E-mail:yanxiaojun@nbu.edu.cn

收稿日期:2012-07-14,收修改稿日期:2012-09-13

鱼的鉴别引物和鉴别方法,采用单引物 RAPD-PCR 扩增图谱就可区分岱衢族大黄鱼和闽-粤东族大黄鱼;此外,丁诗华等(2006)发现使用引物 S11 进行 RAPD-PCR 扩增出官井洋选育群体特征性条带,而岱衢洋大黄鱼则只有 10%能扩增出此条带。然而, RAPD-PCR 技术对 DNA 模板的质量、扩增的条件和体系都有很高的要求,而其自身固有的缺陷即可重复性差很难克服(赵淑清等, 2000; 姜自锋等, 2002)。

线粒体基因具有母系遗传及高进化速率等特点,是研究基因组进化、种群遗传学分析的有效标记(毛勇等, 2010; Miya *et al.*, 2000; Gunnarsdóttir *et al.*, 2011)。本研究拟利用岱衢族大黄鱼和闽-粤东族大黄鱼的线粒体基因高频差异位点,设计出特异性辨别引物,通过优化 PCR 扩增的条件及体系来建立一套鉴别岱衢族大黄鱼的标准方法体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

采集岱衢族、闽-粤东族大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)养殖个体各 25 尾,2010 年 11 月取自浙江象山黄避岙养殖网箱。

### 1.2 总 DNA 的提取

取鱼体背部肌肉(去除鳞片和皮肤)约 0.1g,酚/氯仿法抽提大黄鱼总 DNA(朱世华等, 2006), $-20^{\circ}\text{C}$  下保存备用。

### 1.3 大黄鱼线粒体全长序列扩增

**1.3.1 引物设计和 PCR 扩增** 模板 DNA: 岱衢族和闽-粤东族大黄鱼各 1 条; 扩大大黄鱼线粒体全长序列的引物见表 1。PCR 反应的模板 DNA 浓度约为 100ng, 反应体系总体积为 25 $\mu\text{L}$ , 其中 10 $\times$ Buffer 2.5 $\mu\text{L}$ , dNTPs 4 $\mu\text{L}$  (各 2.5mmol/L), 引物各 1 $\mu\text{L}$  (10 $\mu\text{mol/L}$ ), Taq 酶 0.2 $\mu\text{L}$  (5U/ $\mu\text{L}$ )。PCR 反应条件为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 3min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 45s,  $54^{\circ}\text{C}$  退火 45s,  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 1min 30s, 35 个循环; 最后  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10min。PCR 产物采用试剂盒切胶纯化。

**1.3.2 克隆和测序** 将 15 个 PCR 产物纯化后分别与 pMD18-T 载体  $4^{\circ}\text{C}$  过夜连接, 转化感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。用引物 M13F/R 随机检测, 每个克隆均送出 3 个阳性克隆子正反双向进行测序, 以保证序列的准确性。

**1.3.3 序列分析** 测序结果采用 DAMBE、Vector NTI 7.0 等软件进行拼接, 对大黄鱼线粒体基因全长

表 1 大黄鱼线粒体基因全长序列扩增引物、高变区扩增引物及岱衢族大黄鱼鉴别引物

Tab.1 The primers for amplification of the complete mitochondrial genome of *P. crocea*, its high variability regions and for identification of Dai-qu Stock *P. crocea*

编号	扩增区域	产物长度(bp)	上游引物(5'—3')	下游引物(5'—3')
1	350—1621	1272	AGTCAACGGCGTAAAGAGTGG	TACCCCTCTGGGAAAGTTGT
2	1481—2664	1184	CCTGGGAAATGAATAGAAAGT	AAAATCATGGCATAGATAGA
3	2526—3960	1435	TTACGACCTCGATGTTGGATCAG	GGAAGCACTAGGAGTTTTGAGT
4	3855—4767	913	AAGGGCCACTTTGATAGAGTG	GTGAGTGCGGGGTTTTGGCTCA
5	4581—5787	1207	TTGCTACTCCTCAATTGCCAC	CTTATGTTATTCATTCGGGGGAA
6	5536—7089	1554	CCTCTACCTAATTTTTGGTGC	ATGCGGTTGGCTTGAATCAA
7	6704—8135	1432	AGCACTTGAACAAAAGCTCACTT	GTCGAAGAGGCTTACAGTCATGGTCA
8	7902—8844	943	GCAAGCGTTAGCCTTTAAGC	CAGGGGCTGGGGTCTACTAT
9	8517—9812	1296	CCTACACTTCTATCCCTATTCTAAT	GGAGAAAGGGAGGCGAGCGGT
10	9602—10821	1220	AGTATTAGTGACTTCCAATCA	TGTAGAATAGAAAATAAGTGCC
11	10655—11923	1269	CCTCTTAACATCCCTGCAAATC	TTCTAAGACCAACGGATGAGC
12	11760—13253	1494	AAAACATTAGATTGTGATTCTAA	GACTCGGAGGCTGTAATAG
13	13105—14416	1312	GCCTGGCCCTCACTGGTACC	AGCGGGTGGGTTTTGCGTAG
14	14329—15861	1533	CTCTAACCAGGACTAATGGCTTG	TGATTATCAATCAATGTCCT
15	15758—507	1217	TCAACATTAATTACCACGCT	GGGGTATCTAATCCCAGTTT
B1	15068—62	1462	AGACCTTCTAGGCTTTGCAATC	GGAGCTTTCTAGGGCTCATCT
B2	10805—11589	785	TTATTTCTATTCTACACCCTGGC	AGAGGGAATACCCCGCTGT
J1	15953—16287	335	GGCATTTAGGCACAAGGAC	GGGGGCACAACCTCAGAGG
J2	10909—11565	657	CAGGCCCCACCATACTAGT	GGGTGCCGGTTCCTGAC

序列进行分析。

#### 1.4 大黄鱼高变异区域序列扩增

**1.4.1 设计引物** 将获取的岱衢族和闽-粤东族大黄鱼各 1 条的线粒体基因全长序列, 结合 NCBI 上的大黄鱼 mtDNA 全序列(序列号: FJ 595214 和 NC011710)用 Vector NTI 7.0 软件进行比对找出高变异区域, 在高变异区两端的保守区域设计引物对 B1 和 B2 (表 1)。

**1.4.2 PCR 扩增、克隆和测序** 将岱衢族和闽-粤东族大黄鱼样品各 25 条先用 B1 引物对进行 PCR 扩增、克隆测序, 再用 B2 引物对扩增 25 条岱衢族大黄鱼和 9 条闽-粤东族大黄鱼样品。PCR 扩增反应体系及条件、克隆测序和序列分析等方法同上。

#### 1.5 岱衢族大黄鱼的特异性鉴别

**1.5.1 岱衢族大黄鱼特异鉴别引物的设计** 根据高变异区序列比对分析, 针对两地理种群大黄鱼变异位点设计出岱衢族大黄鱼特异鉴别引物对 J1 和 J2 (表 1)。

**1.5.2 鉴别 PCR 扩增条件的优化** Real-time PCR 扩增体系 25 $\mu$ L, 包括 SYBR Premix EX *Taq* (2 $\times$ ) 12.5 $\mu$ L, 10 $\mu$ mol/L 上下游引物各 0.5 $\mu$ L, 10ng/ $\mu$ L DNA 1 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 10.5 $\mu$ L。扩增程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 4 个温度梯度(51.2 $^{\circ}$ C、53.6 $^{\circ}$ C、55.8 $^{\circ}$ C、58.6 $^{\circ}$ C) 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35s, 35 个循环。Real-time PCR 产物 1%琼脂糖凝胶电泳检测其特异性。通过比较使用特异鉴别引物对岱衢族和闽-粤东族大黄鱼样品 Real-time PCR 扩增的 *C<sub>t</sub>* 值差值来确定最优的退火温度和循环数。

**1.5.3 PCR 验证** 用引物对 J1 和 J2 分别对 25 个岱衢族和闽-粤东族大黄鱼样品进行 PCR 扩增验证。

PCR 反应体系总体积为 25 $\mu$ L, 其中 10 $\times$ Buffer 2.5 $\mu$ L, dNTPs 4 $\mu$ L (各 2.5mmol/L), 引物各 0.5 $\mu$ L (10 $\mu$ mol/L), *Taq* 酶 0.2 $\mu$ L (5U/ $\mu$ L), 模板 DNA 浓度为

10ng (J1 引物对)和 40ng (J2 引物对)。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55.8 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35s, 28 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

## 2 结果与分析

### 2.1 大黄鱼线粒体全长序列的分析

使用 15 对大黄鱼线粒体基因扩增引物进行 PCR 反应, 获得特异性的扩增产物, 条带较量, 见图 1。

岱衢族大黄鱼线粒体基因组成及其与闽-粤东族大黄鱼的差异分析见表 2。岱衢族大黄鱼和闽-粤东族大黄鱼线粒体基因组全长均为 16467bp, 差异位点 64 个, 两者相似性为 99.6%, 共编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白质编码基因。除去短序列的 tRNA 基因序列外, 在岱衢族和闽-粤东族大黄鱼线粒体基因之间 D-loop 区域差异性最高(2.01%), 其次是 ND3(0.86%)、CO (0.72%)、ND6(0.57%)和 ND4(0.43%)等。

### 2.2 高变异区序列分析及岱衢族大黄鱼特异性鉴别引物的设计

用 2 引物对 B1 和 B2 对岱衢族大黄鱼和闽-粤东族大黄鱼高变异区进行 PCR 扩增, 克隆测序后进行数据分析, 结果见表 3。引物对 B1 扩增大黄鱼线粒体的 D-loop 区域, 对该序列中的 2 部分序列片段结合分型, 差异位点在岱衢族大黄鱼线粒体基因全序列的第 15971 位和第 16270 位, 可分成 2 个 OTU, 分别为 D1 型: GGCATTTAGGCACAAGGTC 和 CTTCTGAG-TTGTGCCCCC, D2 型: GGCATTTAGGCACAAGGTT 和 TTTCTGAGTTG TGCCCC; 岱衢族 25 个样品均为 D1 型, 闽-粤东族 25 个样品中, 有 9 个为 D1 型, 有 16 个为 D2 型。在上述实验的基础上, 使用引物对 B2 扩增 D1 型大黄鱼样本的线粒体 ND4 基因区域, 对该序列中的 2 部分序列片段也结合分析, 差异点位于岱衢族大黄鱼线粒体基因全序列的第 10927 位和第 11549 位, 共检出 2 个 OTU, 分别为 N1 型: CAGGC

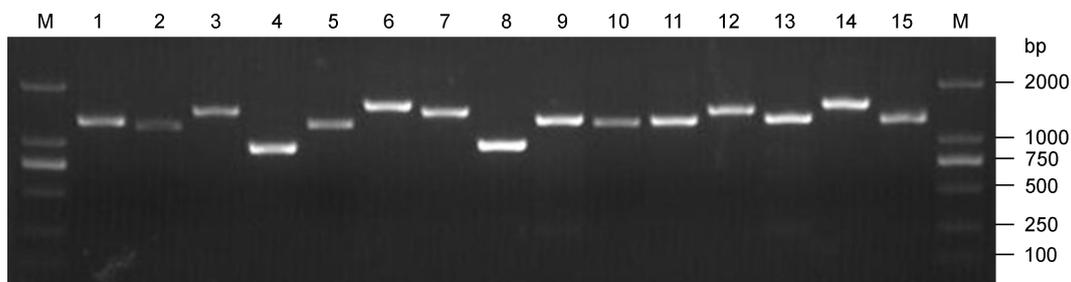


图 1 15 对大黄鱼线粒体基因扩增引物 PCR 产物电泳图

Fig.1 Electrophoretogram of PCR products amplified from the mitochondrial genes of *P. crocea*

表 2 岱衢族大黄鱼线粒体基因组及其与闽-粤东族大黄鱼的差异分析  
Tab.2 Genomic structure of mtDNA of Dai-qu Stock *P. crocea* and its difference with Min-yue Stock

名称	位置	大小	间隔	重叠	氨基酸	与闽-粤东族大黄鱼差异碱基数(比例)
<i>tRNA<sup>Phe</sup></i>	1—69	69				
<i>12S rRNA</i>	70—1016	947				1(0.11%)
<i>tRNA<sup>Val</sup></i>	1017—1087	71				
<i>16S rRNA</i>	1088—2783	1696				2(0.12%)
<i>tRNA<sup>Leu</sup></i>	2784—2857	74				
<i>ND1</i>	2858—3832	975	4		324	4(0.41%)
<i>tRNA<sup>Ile</sup></i>	3837—3906	72		1		
<i>tRNA<sup>Gln</sup></i>	3906—3978	73		1		
<i>tRNA<sup>Met</sup></i>	3978—4048	71				
<i>ND2</i>	4049—5094	1046			348	4(0.38%)
<i>tRNA<sup>Trp</sup></i>	5095—5165	71	1			
<i>tRNA<sup>Ala</sup></i>	5167—5235	69	2			
<i>tRNA<sup>Asn</sup></i>	5238—5310	73	37			1(1.37%)
<i>tRNA<sup>Cys</sup></i>	5348—5414	67				1(1.49%)
<i>tRNA<sup>Tyr</sup></i>	5415—5484	70	1			
<i>CO I</i>	5486—7042	1557		5	518	4(0.26%)
<i>tRNA<sup>Ser</sup></i>	7038—7109	72	3			
<i>tRNA<sup>Asp</sup></i>	7113—7181	69	8			
<i>CO</i>	7190—7880	691			230	5(0.72%)
<i>tRNA<sup>Lys</sup></i>	7881—7955	75	1			
<i>ATPase8</i>	7957—8124	168		10	55	
<i>ATPase6</i>	8115—8797	683			227	
<i>CO</i>	8798—9582	785			261	2(0.25%)
<i>tRNA<sup>Gly</sup></i>	9583—9653	71				
<i>ND3</i>	9654—10002	349			116	3(0.86%)
<i>tRNA<sup>Arg</sup></i>	10003—10071	69				1(1.45%)
<i>ND4L</i>	10072—10368	297		7	98	
<i>ND4</i>	10362—11742	1381			460	6(0.43%)
<i>tRNA<sup>His</sup></i>	11743—11811	69				
<i>tRNA<sup>Ser</sup></i>	11812—11878	67	6			
<i>tRNA<sup>Leu</sup></i>	11885—11960	73				
<i>ND5</i>	11958—13796	1839		4	612	4(0.22%)
<i>ND6</i>	13793—14314	522			173	3(0.57%)
<i>tRNA<sup>Glu</sup></i>	14315—14383	69	4			1(1.45%)
<i>Cytb</i>	14388—15524	1137	4		378	6(0.53%)
<i>tRNA<sup>Thr</sup></i>	15529—15600	72	2			
<i>tRNA<sup>Pro</sup></i>	15603—15672	70				
<i>D-loop</i>	15673—16467	795				16(2.01%)

CCCACCATACTAAT 和 GACAGGAACCGGCACCC, N2 型: CAGCCCCACCA TACTAAC 和 AACAGGA-ACCGGCACCC; 岱衢族 25 个样品均为 N1 型, 闽-粤东族 9 个 D1 型样品中, 有 4 个为 N1 型, 有 5 个为

N2 型。

对上述的 D-loop 和 ND4 区域差异位点的 OTU 分型进行结合分析, 则可分为 3 个类型: D1-N1、D1-N2 和 D2。岱衢族大黄鱼 25 个样品均为 D1-N1

表 3 大黄鱼不同 OTU 分型及其相应的序列、引物、比例和电泳图谱  
Tab.3 Different OTUs and its corresponding sequences, primers, proportion and electrophoresis pattern

名称	引物序列 (5' 3')	岱衢族 D1-N1 型 (5' 3')	闽-粤东族 D1-N1 型 (5' 3')	闽-粤东族 D1-N2 型 (5' 3')	闽-粤东族 D2 型 (5' 3')
引物对 J1	GGCATTTAGGCACAA GGAC	GGCATTTAGGCACAA GGTC	GGCATTTAGGCACAA GGTC	GGCATTTAGGCACAA GGTC	GGCATTTAGGCACAA GGTT
引物对 J2	GGGGGCACAACACTCA GAGG	CTTCTGAGTTGTGCC CCC	CTTCTGAGTTGTGCC CCC	CTTCTGAGTTGTGCC CCC	TTTCTGAGTTGTGCC CCC
引物对 J2	CAGGCCCCACCATAC TAGT	CAGGCCCCACCATAC TAAT	CAGGCCCCACCATAC TAAT	CAGGCCCCACCATAC TAAC	
	GGGTGCCCGTTCCT GAC	GACAGGAACCGGCA CCC	GACAGGAACCGGCA CCC	AACAGGAACCGGCA CCC	
个数/总数		25/25	4/25	5/25	16/25
比例		100%	16%	20%	64%
电泳图谱		图 2a	图 2a	图 2b	图 2c 或图 2d

表 4 不同退火温度、引物对和模板 DNA 样品的 Ct 值  
Tab.4 Ct values of different annealing temperature, primers and template DNA

退火温度	Ct 值					
	D1	D2	D1 与 D2 型相差	N1	N2	N1 与 N2 型相差
51.2℃	19.96±0.05	23.91±0.01	3.95±0.06	22.13±0.10	25.70±0.08	3.57±0.18
53.6℃	20.08±0.08	24.69±0.06	4.61±0.14	22.43±0.07	26.20±0.04	3.77±0.11
55.8℃	20.48±0.06	25.83±0.05	5.35±0.11	22.43±0.08	28.72±0.05	6.29±0.13
58.6℃	22.66±0.13	26.55±0.08	3.89±0.21	24.37±0.12	33.27±0.09	8.90±0.21

型; 而闽-粤东族大黄鱼中可以分为 3 个类型: D1-N1 型 4 个样品, D1-N2 型 5 个样品, D2 型 16 个样品。闽-粤东族大黄鱼 25 个样品中有 4 个与岱衢族一致, 有 21 个与岱衢族不同。

根据上述的试验研究及数据分析, 鉴别不同地理种群的大黄鱼样品, 即可采用 2 对引物 B1 和 B2 对样品进行 PCR 扩增, 克隆测序后分析, 如果样品 OTU 分型为 D1-N2 型和 D2 型, 则 100% 为闽-粤东族大黄鱼; 如果样品 OTU 分型为 D1-N1, 则该样品为岱衢族大黄鱼的概率为 86.2% (25/25+4), 闽-粤东族大黄鱼的概率为 13.8%(4/25+4)。

### 2.3 鉴别 PCR 扩增条件的优化

使用 Real-time PCR 对

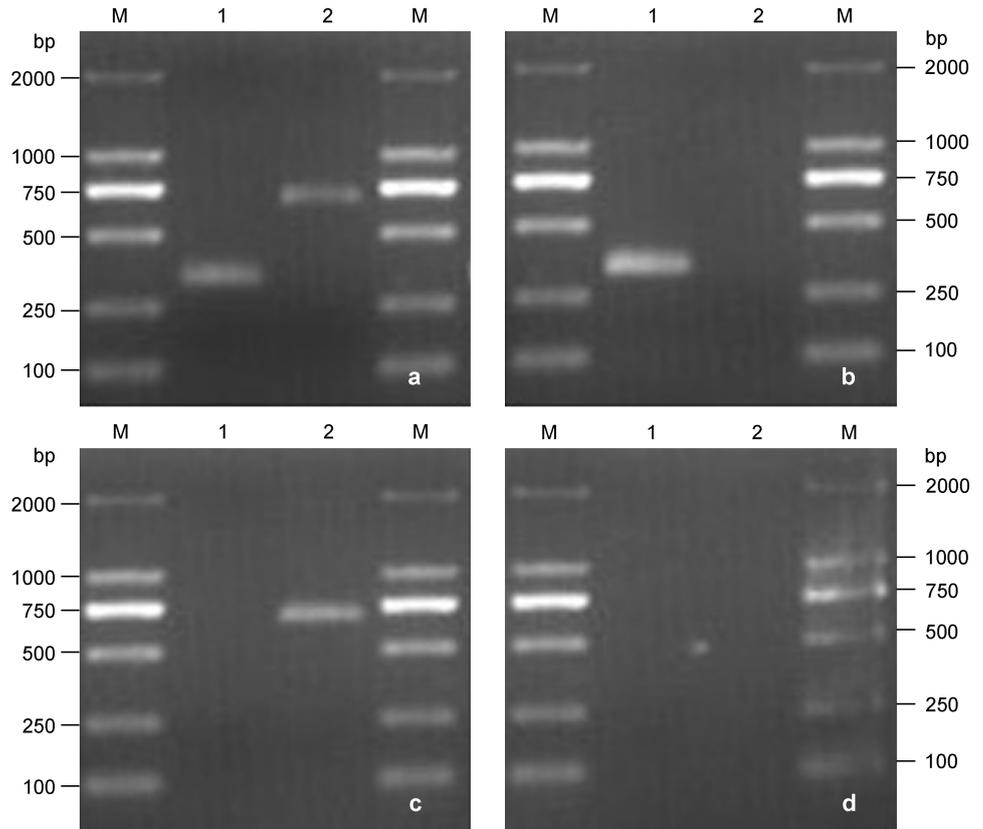


图 2 不同 OTU 分型大黄鱼的 PCR 产物电泳图谱

Fig.2 Electrophoretogram of PCR products from different OTUs of *P. crocea*  
a: D1-N1 型; b: D1-N2 型; c 和 d: D2 型

扩增条件进行优化,使得 PCR 扩增能有效区分 D1 与 D2 型、N1 与 N2 型。对于不同退火温度、引物对和模板 DNA 样品的  $C_t$  值见表 4,退火温度优选 55.8℃。采用同样的反应体系进行 Real-time PCR 发现,在退火温度 55.8℃时, J1 比 J2 的  $C_t$  值大 2,因此加大前者 PCR 反应体系中的模板 DNA 量至 40ng,让两对引物的 PCR 扩增能大致同步进行,而循环数则优选 28。

#### 2.4 PCR 验证

岱衢族大黄鱼鉴别图谱见图 2,如果大黄鱼样本使用特异鉴别引物 PCR 扩增图谱为图 2b、图 2c 或图 2d,则判定此样品为闽-粤东族大黄鱼,如果图谱为图 2a,则判定样品为岱衢族大黄鱼。J1 引物对扩增的长度约 335bp, J2 引物对扩增的长度约 649bp。

采用引物对 J1 和 J2 分别对 25 个岱衢族和闽-粤东族大黄鱼样品进行 PCR 扩增后,产物经 1.5%琼脂

糖凝胶电泳、拍照(图 3),根据图谱鉴别的结果与各大黄鱼样品测序结果确定的 OTU 分型完全一致。

### 3 讨论

本研究开发了岱衢族大黄鱼区别于闽-粤东族大黄鱼的特异鉴别引物,并通过条件优化建立了一套标准化的鉴别方法,其具有操作简易、可重复性强、假阳性率低等优点。

岱衢族大黄鱼鉴别的技术流程(图 4)为:参照 1.2 方法提取大黄鱼总 DNA,紫外分光光度计定量,总 DNA 浓度稀释至 10ng/μl,使用鉴别引物 J1 和 J2 进行 PCR 反应(参照 1.5.3 PCR 反应体系和条件),电泳拍照后,如果样品分型为 D1-N2 型和 D2 型(图 2b、图 2c 或图 2d),则 100%为闽-粤东族大黄鱼;如果样品 OTU 分型为 D1-N1(图 2a),则该样品为岱衢族大

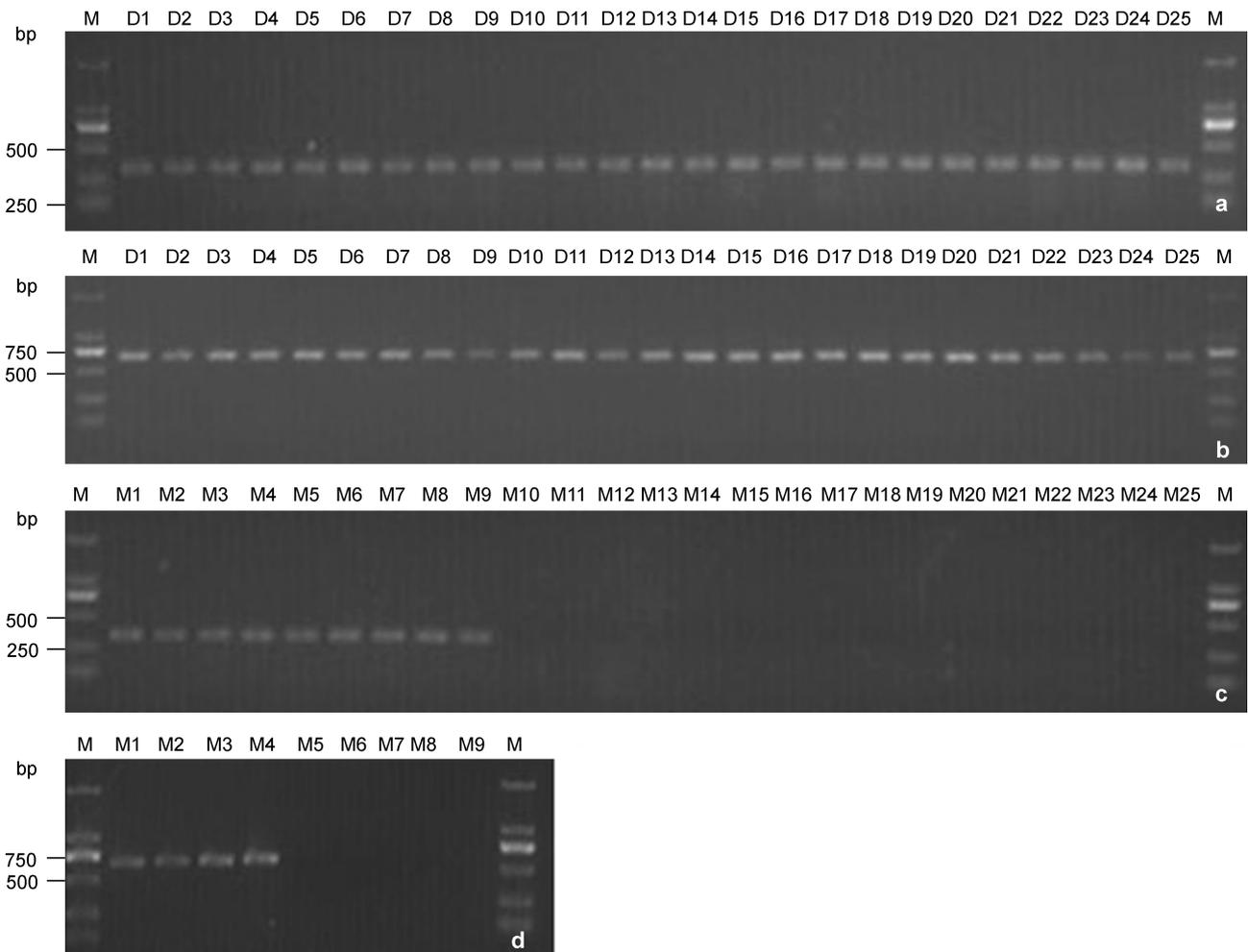


图 3 岱衢族大黄鱼特异性鉴别引物的 PCR 验证

Fig.3 PCR identification with diagnostic primers of Dai-qu Stock *P. crocea*

a: D1-D25 为岱衢族大黄鱼样品,引物为 J1; b: D1-D25 为岱衢族大黄鱼样品,引物为 J2; c: M1-M25 为闽-粤东族大黄鱼样品,引物为 J1; d: M1-M9 为闽-粤东族大黄鱼样品,引物为 J2

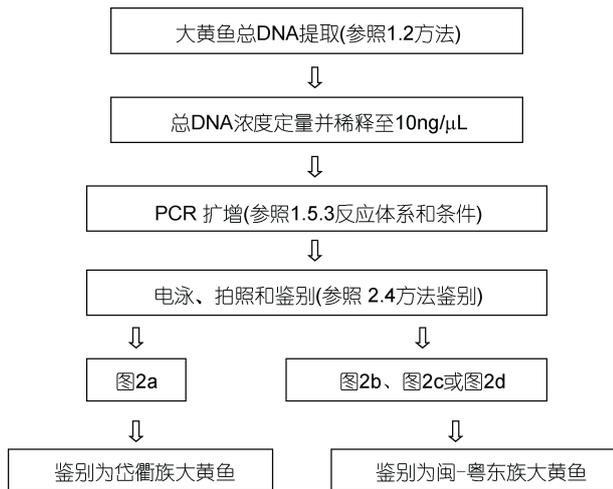


图4 岱衢族大黄鱼鉴别流程图

Fig.4 Flowchart for identification of Dai-qu Stock *P. crocea*

黄鱼的概率为 86.2% (25/25+4), 闽-粤东族大黄鱼的概率为 13.8% (4/25+4)。由于鉴别概率是本研究采用岱衢族和闽-粤东族大黄鱼各 25 条样品得到的, 样本数不大, 还有待进一步加大样品数来精确鉴别概率。另外, 在本研究的基础上, 可以进一步寻找岱衢族和闽-粤东族大黄鱼线粒体基因的差异区域结合分型来提高岱衢族大黄鱼鉴别的准确率。

本试验难点在于设计出能有效区分不同 OTU 分型的特异鉴别引物, 在设计引物的过程中必须综合考虑各种因素。引物 3'末端的碱基与模板的配对对于 PCR 扩增效率至关重要, Ralph 等(2010)运用 real-time PCR 技术对末端几个碱基错配引起的扩增效率进行了研究, 研究发现引物最末端位与模板错配 1 个碱基跟完全匹配相比,  $C_t$  值平均增加 5.19, 而倒数第 2、3 位则增加 1.87 和 0.53 $C_t$  值。因此在设计岱衢族大黄鱼和闽-粤东族大黄鱼鉴别引物时, 把正反向引物 3'最末端设置在上述 OTU 差异点上。Kwok 等(1990)研究发现引物 3'末端 3 位碱基错配 1 个碱基 PCR 扩增效率会出现一定的下降, 而错配 2 个碱基 PCR 扩增效率则会出现大幅的下降。因此, 在引物设计中, 在 3'末端倒数第 2 位碱基处引入一个错配来有效加大不同 OTU 分型 PCR 扩增差异。这样使得引物对 J1 的正反向引物, 分别与 D1 型 DNA 样本在 3'末端倒数第 2 个碱基有 1 个错配, 与 D2 型 DNA 样本在 3'最末端错配 2 个碱基; 也使得引物对 J2 的两条引物, 分别与 N1 型 DNA 样本在 3'末端倒数第 2 个碱基有 1 个错配, 与 N2 型 DNA 样本在 3'最末端错配 2 个碱基。Ralph 等(2010)研究了 12 种碱基错配对 PCR 扩增效率的影

响, 发现 A:A、A:G、C:C 等错配能有效降低扩增效率, 而 T 错配则对 PCR 扩增效率影响不大, 因此在引入错配碱基的时候不引 T, 而结合考虑引物二级结构等情况引入合适的碱基, 加大不同 OTU 分型的区分。

另外, Kwok 等(1990)研究发现引物碱基数在 12—16bp 时, 错配对 PCR 影响加大, 所以在设计引物时尽量减少引物的碱基数。模板和 dNTP 浓度对 PCR 扩增的效率影响也很大。模板浓度大, 则错配对 PCR 扩增影响下降, 因此稀释提取到的模板 DNA 浓度到 10ng/μl, 而稀释 DNA 模板浓度也有利于降低 DNA 模板中的残留物质量进而减少其对 PCR 扩增的影响。

考虑到岱衢族大黄鱼的鉴别方法的实用性和可操作性, 摸索出一套简易的标准化操作步骤和条件至关重要, 最为关键的是优选 J1 和 J2 的两个 PCR 反应同时进行的反应程序以及退火温度。Real-time PCR 技术有能实时定量出 PCR 扩增的产物的优点, 因此本研究采用此项技术对各项条件进行优化。采用同样的反应体系进行 Real-time PCR 发现, 在退火温度 55.8℃时, J1 比 J2 的  $C_t$  值大 2, 因此加大前者 PCR 反应体系中的模板 DNA 量至 40ng, 让两对引物的 PCR 扩增能大致同步进行, 而 PCR 扩增循环数设为 28, 使得此时 D1、N1 型大黄鱼样品 PCR 扩增的条带较亮, 而 D2、N2 型 PCR 扩增的产物还未能被凝胶成像系统所检测到。

## 参 考 文 献

- 丁文超, 李明月, 管丹冬等, 2009. 大黄鱼 4 个家系的形态差异分析. 宁波大学学报(理工版), 22(2): 185—190
- 丁诗华, 黄丽英, 张海琪等, 2006. 大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)岱衢洋选育群体和官井洋养殖群体的遗传差异分析. 海洋与湖沼, 37(1): 41—46
- 王德祥, 王 军, 苏永全, 2006. 不同种群大黄鱼的鉴别引物和鉴别方法. 中国专利: 200610135259, 2006.11.28
- 毛 勇, 蒋秋芬, 曾华嵩等, 2010. 大黄鱼线粒体 DNA 控制区遗传多样性分析. 厦门大学学报(自然科学版), 49(3): 440—444
- 朱世华, 杨迎春, 沈锡权等, 2006. 从细胞色素 *b* 基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系. 动物学报, 52(3): 514—521
- 刘必谦, 董闻琦, 王亚军等, 2005. 岱衢族大黄鱼种质的 AFLP 分析. 水生生物学报, 29(4): 413—416
- 李明月, 郑岳夫, 管丹东等, 2009. 大黄鱼四家系肌肉营养成分差异及品质选育分析. 水产学报, 33(4): 632—638
- 陈 琳, 张达云, 郑凯宏等, 2007. 岱衢族和闽-粤东族大黄鱼生长对比试验. 科学养鱼, 8: 25—26
- 陈卫忠, 1994. 东海区主要经济鱼类资源近况. 海洋渔业, 16(4): 163—167

- 赵淑清, 武维华, 2006. DNA 分子标记和基因定位. 生物技术通报, 6: 1—4
- 姜自锋, 林乃铨, 徐梅, 2002. RAPD 技术及其应用中的一些问题. 福建农林大学学报(自然科学版), 31(3): 356—360
- 徐镇, 江锦坡, 陈寅儿, 2006. 不同品系大黄鱼致死低温的研究. 宁波大学学报(理工版), 19(4): 462—464
- 徐吟梅, 2011. 岱衢族大黄鱼首次在宁波放流入海. 现代渔业信息, 26(8): 33
- 黄良敏, 谢仰杰, 苏永全, 2006. 闽-粤东族与岱衢族养殖大黄鱼的遗传多样性研究. 厦门大学学报(自然科学版), 45(6): 836—840
- 黄振远, 苏永全, 张建设等, 2011. 闽粤群和岱衢群养殖大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)及其杂交子代遗传差异的 SSR 分析. 海洋与湖沼, 42(4): 592—596
- Cui Z X, Liu Y, Li C P *et al*, 2009. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene*, 432: 33—43
- Gunnarsdóttir E D, Li M, Bauchet M *et al*, 2011. High-throughput sequencing of complete human mtDNA genomes from the Philippines. *Genome Research*, 21: 1—11
- Kwok S, Kellogg D E, McKinney N *et al*, 1990. Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies. *Nucleic Acids Research*, 18(4): 999—1005
- Miya M, Nishida M, 2000. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17: 437—455
- Ralph S, Suzan D, Jeer A *et al*, 2010. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *Journal of Molecular Diagnostics*, 12(1): 109—117

## THE AMPLIFICATION OF THE COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME OF THE DAI-QU STOCK *PSEUDOSCIAENA CROCEA* AND THE DEVELOPMENT OF ITS DIAGNOSTIC PRIMERS

SHEN Xi-Quan<sup>1</sup>, HE Meng-Meng<sup>1</sup>, YAN Xiao-Jun<sup>1</sup>, XUE Liang-Yi<sup>1</sup>, WU Xiong-Fei<sup>2</sup>  
(1. Marine Biotechnology Laboratory, Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo, 315211; 2. Ningbo Academy of Ocean and Fishery, Ningbo, 315012)

**Abstract** The complete mitochondrial DNA (mtDNA) genomes of *Pseudosciaena crocea* sampled from Min-yue and Dai-qu Stock were amplified by PCR and sequenced. The sequences of high variability regions from 25 samples respectively were obtained, which were divided into 3 Operational Taxonomic Units (OTUs): D1-N1, D1-N2 and D2. The results indicated that: all the Dai-qu Stock samples were clustered into D1-N1 type; Min-yue Stock samples were clustered into D1-N1, D1-N2 and D2 type. Primer pairs J1 and J2 were designed to significantly distinguish different OTUs, and PCR conditions were optimized for identification. The results show that the accurate rate of identification for Min-yue Stock *P. crocea* is 100%, if the band pattern on photo belongs to D1-N2 or D2 type, and the accurate rate of identification for Dai-qu and Min-yue Stock *P. crocea* are respectively 86.2% and 13.8%, if it belongs to D1-N1 type, according to gel images of the samples. The research results provide technical support for varieties resources conservation, selective improved variety and market sales of the Dai-qu Stock *P. crocea*.

**Key words** Dai-qu Stock *Pseudosciaena crocea*; Min-yue Stock *Pseudosciaena crocea*; mitochondrial genomes; OTU; identification