

文章编号:1001-5132(2008)01-0039-04

泥蚶线粒体 COI 和 16S rRNA 基因片段序列研究

郑文娟¹, 朱世华^{1,2*}, 沈锡权², 叶央芳¹, 潘志崇²

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211;

2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 采用 PCR 技术扩增了泥蚶线粒体 DNA 的 COI 和 16S rRNA 基因片段, PCR 产物经 T 载体连接后进行克隆、测序, 用 MEGA version 3.0 软件计算这 2 个基因片段序列碱基组成。结果显示: COI 和 16S rRNA 基因删除引物序列后分别得到 660 bp 和 548 bp 的核苷酸序列, T, C, A 和 G 碱基含量分别为 40.4%, 14.7%, 20.6%, 24.3% 和 23.2%, 25.9%, 30.3%, 20.6%。COI 和 16S rRNA 基因片段对泥蚶不同地理种群的遗传分化的研究具有一定的应用价值。

关键词: 泥蚶; 线粒体 DNA; COI; 16S rRNA

中图分类号: Q786

文献标识码: A

泥蚶(*Tegillarca granosa*)俗称血蚶、粒蚶、花蚶等, 属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、蚶目(Arcoida)、蚶科(Arcidae), 是一种栖息于沿海滩涂的广温性双壳贝类, 在我国主要分布于江苏、浙江、福建、广东等地, 是南方沿海地区的主要经济养殖贝类之一。

目前, 已在形态、氨基酸、同工酶等方面对泥蚶遗传多样性进行了研究^[1-7], 但这些方法容易受到生物发育阶段及环境条件等诸多因素的影响。分子遗传标记本质上是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段, 不会受生物发育阶段及环境等因素限制, 所以将其应用于泥蚶遗传背景的研究显得更为重要, 近年来已有学者应用 RAPD 标记来研究泥蚶的遗传多样性^[8,9]。

线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 作为

分子遗传标记已成为分子系统学研究的热点^[10-12], 16S rRNA 和 COI 基因具有较强的中间解析和鉴别能力, 因而在脊椎动物和无脊椎动物的系统与进化学、种类鉴别及种群的遗传多样性的研究中广泛应用^[13]。但目前国内外应用线粒体 DNA 作为分子标记来研究泥蚶的遗传资源状况尚未见报道。本文对泥蚶线粒体 DNA 的 COI 和 16S rRNA 基因片段进行了 PCR 扩增和测序, 并对其序列进行分析, 为以后泥蚶的遗传资源、物种间的亲缘关系和系统进化等研究提供一定的分子生物学依据。

1 材料和方法

1.1 材料来源

泥蚶采自浙江乐清的自然样本, 样品采集后活

收稿日期: 2007-06-26.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 浙江省教育厅科研基金(20000008)。

第一作者: 郑文娟(1982-), 女, 浙江湖州人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 鱼类分子遗传。E-mail: g05b07070319@email.nbu.edu.cn

*通讯作者: 朱世华(1963-), 男, 浙江宁波人, 博士/教授, 主要研究方向: 遗传学与分子生物学。E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn

体运回,立即解剖,取出整个软体部,保存于95%的酒精中.

1.2 实验方法

1.2.1 基因组DNA提取

取0.1g保存于95%酒精中的样品腹足肌肉组织,基因组DNA提取采用苯酚/氯仿抽提法^[12].

1.2.2 PCR扩增

用于COI基因片段扩增的引物为:COIL1490(5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3')和COIH 2198(5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA-3')^[14];用于16S rRNA基因片段扩增的引物为:16SAR-L(5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3')和16SAR-H(5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT3')^[15].反应的模板DNA约为100ng,反应体系总体积为50 μ L,其中10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L,dNTPs 2 μ L(各2.5 mmol \cdot L⁻¹),引物各1 μ L(20 μ mol \cdot L⁻¹),Ex Taq酶0.5 μ L(2U).PCR反应条件为:94 预变性4 min;94 变性45 s,54 退火45 s,72 延伸1 min,35个循环,最后72 延伸10 min.每次反应设立不含DNA模板的空白对照,扩增产物经1%的琼脂糖凝胶电泳检测.

1.2.3 PCR产物克隆

PCR产物电泳割胶回收,用凝胶纯化试剂盒(上海申能)纯化,与pUCm-T载体(上海生工)连接,连接体系总体积为20 μ L,其中T载体1 μ L,PCR纯化产物6 μ L,T4 DNA ligase 1 μ L,T4 DNA ligase buffer 2 μ L,灭菌蒸馏水10 μ L.4 过夜连接.转化感受态细胞DH5 α ,筛选阳性克隆子,提取克隆质粒,插入片段经PstI酶切检测.

1.2.4 测序

用M13引物在自动测序仪(Applied biosystems 3730,上海英俊)正反双向测序,以保证所测序列的准确性.

1.2.5 序列分析

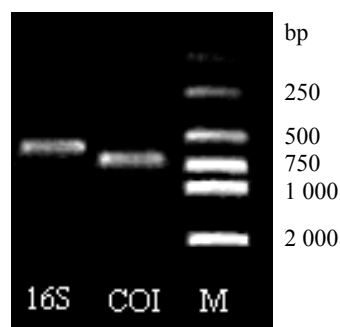
测序后的序列,用Vector NTI Suite 8软件对正反双向序列进行序列比对拼接,把所得到的目的序

列提交到GenBank,得到其序列号,用MEGA version 3.0软件分析泥蚶COI和16S rRNA基因片段的碱基组成.

2 结果与讨论

2.1 泥蚶COI和16S rRNA基因片段大小

COI和16S rRNA基因片段经特异性引物PCR扩增,2个片段均得到了清晰的条带,如图1所示,然后PCR扩增产物经过回收、克隆、测序、序列比对拼接,删除引物序列.本实验的泥蚶样本分别得到660 bp和548 bp,这2个序列被录入GneBank,登录号为EF583539,EF583543如图2所示.



M为DL2000分子标记

图1 泥蚶COI和16S rRNA基因片段的PCR扩增产物

2.2 泥蚶COI和16S rRNA基因片段序列特征

COI和16S rRNA基因所得到的目的序列用MEGA version 3.0软件计算泥蚶这2个基因片段序列碱基组成见表1.在所得到的COI基因片段序列中,T,C,A和G碱基含量中显示,碱基出现了偏倚,T的含量达到40.4%,而C的含量只有14.7%,A+T的含量显著高于G+C含量,这一模式与其他无脊椎动物的COI基因相似^[16].相对于COI基因,16S rRNA基因片段序列的各碱基含量较为平均.

表1 泥蚶COI和16S rRNA基因片段序列碱基组成 %

	T	C	A	G	A+T
COI	40.4	14.7	20.6	24.3	61.0
16S rRNA	23.2	25.9	30.3	20.6	53.5

2.3 泥蚶COI和16S rRNA基因片段的应用价值

DNA分子标记是指由于DNA分子发生缺失、

COI (GenBank accession No: EF583539)

```

ACACTTATT TACTTTCAGG GTTTTGGTGG GCGTTGATAG GGATCTGTTT AAGATTTTCAT 60
ATTCGTGTTA ATTTAGCACA GOCGGOGGGC CTTTATGATAG AGGTGAGTCA GTTGATATAAT 120
GTAATTATTA CGAGGCATGC GTTTATTATA AITTTTTTTT TTGTTATGCC AGTGATGATG 180
GGGGGGTTG GGAATTGGTT AATTCOGATT ATAGTTGGGT GTGGTGATAT AAATCACCCCT 240
CGTTTAAATA ACTTTAGTTA TTGAGCTATT CCTGGTGGT TGTTTATGGT ATTTATATCA 300
GCCTTGATTG AGGGGGGTGC GGGGACTGGA TGAACCCCTT ATCTCCTCT TCCGGTTGA 360
ATTATCATA GAAGTCGGC GTTGGACATA GTCATTCTTT CATTACATAT TGCTGGGTTT 420
GGGTCAATGA TAAGATCTTT AAATTTTATA TGTACGATAA TTACAAGTCG TTTTACGCT 480
ATGATTCOGG AGCGGATGCC TGTATTTTGT TGGTCAATGT TTGTTACATC TTGATTGTTA 540
CTATTTTCTT TGCTGTATT GGCTGGGGG TTGACAAATGC TTATCACCGA TGTTCATATT 600
AACACTTCTT TTTTTCGGCC TCAGGGGGGT GTGATCCTT TGTTATTCA GCATTGTTT 660

```

16S rRNA (GenBank accession No: EF583543)

```

CACCTCTAGC ATCACCAGTA TTAGAGGCAC CGCTGCCCA GTGACACATG TTTAAGGOC 60
GCGGTACCOCT AACCGTGCAA AGGTAGCATA ATCACTTGTT CCTTAAATAG GGACCTGTAT 120
GAATGGCTCC ACGAGGGTTC AGCTGTCTCT TACTTTTAAAC CAGTGAAATT GACCTGCCCG 180
TGAAGAGCGC GGCATGACAC AGCAAGACGA GAAGACCCTA TGGAGCTTTA ATTTATTAAT 240
GCAAAACAGTA CCTAACAAAC CCACAGGTCC TAAACTAOCA AACCTGCATT AAAAAATTOG 300
GTGGGGGGA CCTCGGAGCA GAACCCAAOC TCCGAGCAGT ACATGCTAAG ACTTCACCAG 360
TCAAAGCGAA CTACTATACT CAATTGATOC AATAACTTGA CCAACGGAAC AAGTTACCCT 420
AGGGATAACA GCGCAATCCT ATTCTAGAGT CCATATCAAC AATAGGGTTT ACGACCTCGA 480
TGTGGATCA GGACATCCCG ATGGTGCAGC CGCTATTAAC GGTTGCTTIG TTCAACGATT 540
AAAGTCTT 548

```

图 2 泥蚶 COI 和 16S rRNA 基因片段的核苷酸序列

插入、易位、倒位、重排或由于存在长短与排列不一的重复序列等机制而产生的多态性标记,从而可以在分子水平检测个体、群体及种间的多态性及遗传差异^[17]。而mtDNA具有分子结构简单,严格的母系遗传,进化速度快,不同的区域进化速度存在差异等特征,使其成为分子群体遗传学和分子系统学研究的重要标记^[18]。

由于目前泥蚶尚无任何线粒体基因片段的序列报道,而线粒体DNA的COI和16S rRNA基因在脊椎动物和无脊椎动物的系统发生和遗传进化研究领域及疑难种类或地理种群鉴别中常作为分子标记而得以广泛应用^[19-21]。COI和16S rRNA这2个基因在进化速度上存在差异,16S rRNA基因则比COI基因要明显保守些^[17]。故本文对泥蚶线粒体DNA中COI和16S rRNA基因片段序列进行PCR特异性扩增,分别得到660 bp的COI和548 bp的16S rRNA基因2个基因片段的碱基序列,而且这2个片段长度对测序来说显得比较合适,所以期望可以

将COI和16S rRNA这2个基因作为研究泥蚶不同地理群体的遗传变异、多样性评估、亲缘关系等方面的很好的分子标记,也可应用于品种的鉴定、资源保护和利用、遗传育种等方面。

参考文献:

- [1] 喻子牛, 孔晓瑜, 杨锐, 等. 泥蚶等位基因酶遗传变异研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(5):5-21.
- [2] 贾守菊, 张永普, 陈艳乐, 等. 不同种群泥蚶的5种同工酶研究[J]. 东海海洋, 2003, 21(3):34-41.
- [3] 张永普, 林志华, 应雪萍. 不同地理种群泥蚶的形态差异与判别分析[J]. 水产学报, 2004, 28(3):339-342.
- [4] 雷焕宗, 林植华, 张永普. 不同种群泥蚶肉游离氨基酸及无机元素的含量和组成[J]. 河南科学, 2004, 22(2): 203-205.
- [5] 王日昕, 李太武, 吕振明, 等. 泥蚶(*Tegillarca granosa*)不同地理居群同工酶变异及遗传分化的研究[J]. 海洋与湖沼, 2005, 36(3):227-234.
- [6] 吕振明, 李太武, 苏秀榕. 泥蚶遗传多样性的研究[J]. 高技术通讯, 2005, 15(12):104-110.
- [7] 潘沙芳, 李太武, 苏秀榕. 用多元分析法研究泥蚶

- (*Tegillarca granosa*)氨基酸地区差异[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(6):536-540.
- [8] 李太武, 李成华, 宋林生, 等. 5个泥蚶群体遗传多样性的RAPD分析[J]. 生物多样性, 2003, 11(2):118-124.
- [9] 李成华, 李太武, 宋林生, 等. 福建南北泥蚶种内分化的RAPD分析[J]. 动物学研究, 2003, 24(5):362-366.
- [10] Miya M, Takeshima H, Endo H, et al. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 26:121-138.
- [11] 项方, 邹记兴, 邓凤姣, 等. 用细胞色素 b 部分序列研究斑马鱼的分子分类与系统发育[J]. 动物学杂志, 2004, 39(5):13-18.
- [12] 朱世华, 杨迎春, 沈锡权, 等. 从细胞色素 b 基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系[J]. 动物学报, 2006, 52(3):514-521.
- [13] 孔晓瑜, 姜艳艳, 相建海, 等. 魁蚶线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段序列测定及其应用前景[J]. 海洋科学, 2001, 25(12):46-48.
- [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]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3:294-299.
- [15] Simon C, Frati F, Beckenbach A, et al. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers[J]. Ann Entomol Soc Am, 1994, 87, 651-701.
- [16] Harrison J S. Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16S and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austini* (*Decapoda: pinnotheridae*)[J]. Mol Phylogenet Evol, 2004, 30:743-754.
- [17] 郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清, 等. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 COI 基因片段序列的比较研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1):22-28.
- [18] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4):384-391.
- [19] 马凌波, 张凤英, 乔振国, 等. 中国东南沿海青蟹线粒体 COI 基因部分序列分析[J]. 水产学报, 2006, 30(4):463-468.
- [20] 郑芳, 吕秀玲, 孙红英, 等. 基于线粒体 COI 基因序列探讨长江华溪蟹的遗传分化[J]. 南京师范大学学报: 自然科学版, 2006, 29(2):103-105.
- [21] 牛东红, 李家乐, 汪桂玲, 等. 缙蛭六群体 16S rRNA 基因片段序列的差异[J]. 上海水产大学学报, 2007, 16(1):1-6.

Probing Sequence of Mitochondrial 16S rRNA and COI Gene Fragment in *Tegillarca granosa*

ZHENG Wen-juan¹, ZHU Shi-hua^{1,2*}, SHEN Xi-quan², YE Yang-fang¹, PAN Zhi-chong²

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I gene(COI) and 16S rRNA gene fragments of *Tegillarca granosa* are amplified using PCR, then the PCR products are ligated into T-vectors, cloned and sequenced. 660 bp and 548 bp nucleotide sequences of partial COI gene and partial 16S rRNA gene are obtained respectively. Nucleotide composition frequencies are analyzed with the MEGA 3.0 software. The contents of T, C, A and G are found to be 40.4%, 14.7%, 20.6%, 24.3% in COI; 23.2%, 25.9%, 30.3%, 20.6% in 16S rRNA.

Key words: *Tegillarca granosa*; mitochondrial DNA; COI; 16S rRNA

CLC number: Q786

Document code: A

(责任编辑 史小丽)