

海南沼虾 ITS-1 序列分析

姚建华¹, 傅洪拓^{1,2}, 龚永生², 吴滢²

(¹南京农业大学无锡渔业学院, 江苏无锡 214081; ²中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室, 江苏无锡 214081)

摘要: 为了了解海南沼虾遗传方面信息, 利用 ITS-1 分子标记技术对珠江海南沼虾群体作了研究。研究结果表明: ①其 ITS-1 片段在 1700~1900 bp 之间, 较日本沼虾短; ②其碱基含量变化范围为: 27%~30% (A), 27%~31% (G), 14%~16% (C), 43%~46% (G+C); ③其 ITS-1 序列中包含着非常丰富的 SSR 序列信息, 具体为 (AG)_n, (GA)_n, (AGT)_n, (AGC)_n, (GCA)_n 重复, 在个体中出现的比例分别为 100%, 100%, 25%, 12.5%, 12.5%。(AG)_n, (GA)_n 是多态位点; ④BLAST 比对结果表明, 海南沼虾同日本沼虾和刀额新对虾都有较高的同源性。此研究结果在一定程度上填补了海南沼虾 ITS-1 方面研究的空白, 同时也为海南沼虾后续研究提供了理论参考。

关键词: 海南沼虾; ITS-1; SSR; 微卫星

中图分类号: S917.4 **文献标识码:** A

Analysis of ITS-1 Sequence for *Macrobrachium Hainanense*

Yao Jianhua¹, Fu Hongtuo^{1,2}, Gong Yongsheng², Wu Yan²

(¹Wuxi Fisheries College, NanJing Agricultural University, Wuxi Jiangsu 214081,

²Key Open Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology, Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi Jiangsu 214081)

Abstract: In order to obtain genetic information of *Macrobrachium Hainanense*, these papers focus on the research by ITS-1 molecular marker technology. As showed by results: ①The length of ITS-1 is ranged from 1700 bp to 1900 bp, shorter than *Macrobrachium nipponense*. ②The range of base (A, G, C, G+C) content is 27%~30%, 27%~31%, 14%~16%, 43%~46% respectively. ③ Rich SSR information is contained in ITS-1 sequence for *Macrobrachium Hainanense*, such as repeats of (AG) _n, (GA) _n, (AGT)_n, (AGC)_n, (GCA)_n and repeats of (AG)_n, (GA)_n are polymorphism locus. The proportion of which appear among individuals are 100%, 100%, 25%, 12.5%, 12.5%. ④Homology is demonstrated by BLAST method between *Macrobrachium Hainanense* and *Macrobrachium nipponense*, *Metapenaeus ensis*. This article does not only fill up *Macrobrachium Hainanense* ITS-1 research gaps, but also provides a theoretical reference for *Macrobrachium Hainan* follow-up studies.

Key words: *Macrobrachium Hainanense*, ITS-1, SSR, microsatellites

海南沼虾 (*Macrobrachium Hainanense*), 又称瓯江大虾、甬江大河虾、白河虾、大钳虾, 隶属甲壳纲, 十足目, 长臂虾科, 沼虾属。分布于浙江、广东、广西、福建、海南等地。在 20 世纪 90 年代, 一些学者对其繁殖和

运输进行了研究^[1-3], 但遗传方面研究至今未见报道。内转录间隔区 (ITS) 存在于核 DNA 中, 由于其不加入成熟核糖体, 所以受到选择的压力较小, 进化速率快。ITS-1 是 ITS 序列中的一种, 位于 18 S 和 5.8 S rRNA 之

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划“National Key Technology R&D Program of China”(2006BAD01A13); 江苏省高新技术研究项目“High Technology R&D Program of Jiangsu Province”(BG2007328)。

第一作者简介: 姚建华, 男, 1984 年出生, 江西贵溪人, 在读硕士研究生, 研究方向: 水生动物遗传育种。通信地址: 214081 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心遗传育种研究室, Tel: 0510-85550495, E-mail: wuxifish@163.com。

通讯作者: 傅洪拓, 男, 1964 年出生, 湖南长沙人, 研究员, 博士, 博士生导师。研究方向: 水生动物遗传育种。Tel: 0510-85558835, E-mail: fuht@ffrc.cn。

收稿日期: 2009-03-13, **修回日期:** 2009-04-15。

间。目前,ITS-1 序列研究在水产动物中的应用较少,张洪伟等^[4]对日本沼虾及其杂种后代 ITS-1 序列进行了非常详尽研究。海南沼虾作为沼虾属中的重要一种,与日本沼虾亲缘关系较近。因此,开展海南沼虾 ITS-1 序列研究无论是理论上还是技术上都是可行的,这对于积累其遗传方面资料有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

海南沼虾样品采集于珠江广州段,用酒精浸泡后运回试验室于-20 °C 保存。

1.2 方法

1.2.1 TAKARA 试剂盒提取 DNA 试验过程中涉及到克隆、测序相关步骤,因此对 DNA 纯度与浓度要求较高,试验时用 TAKARA 试剂盒抽提 DNA。具体操作详见说明书。

1.2.2 PCR 扩增 以全 DNA 为模板,PCR 扩增体系为 25 μl,具体为:2.5 μl 10×buffer,1.0 μl dNTPs (2.5 mmol/L),2.0 μl MgCl₂(25 mmol/L),正反向引物(10 μmol/ml,正向引物序列 5' CACACCGCCCGTCGTACTA3';反向引物序列 5' ATTTAGCTGCGGTCTTCATC3')各 0.5 μl,0.5 μl Taq DNA 聚合酶(5 U/μl),1.0 μl DNA(20 μg/ml),超纯水补至 25 μl。

PCR 扩增程序:94 °C 预变性 90 s;94 °C 变性 30 s,

56.8 °C 复性 30 s,72 °C 延伸 20 s,共进行 35 个循环;最后 72 °C 延伸 5 min。

1.2.3 电泳检测 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,正常的 ITS-1 条带应该是大小在 1700~2000 bp 之间且单一的亮带。

1.2.4 PCR 产物纯化 用上海生物工程公司生产的 UNIQ-10 胶纯化试剂盒纯化 PCR 扩增产物。

1.2.5 克隆及测序 将纯化后的 PCR 扩增产物连接至 PMD18-T 载体上,导入感受态细胞中,进行克隆。对克隆产物进行蓝白斑筛选,挑选白色单菌落,于液体培养基中培养过夜。取适量成功克隆的菌液于 1.5 mL 离心管中,加适量的甘油,送往南京博亚生物公司测序。

1.2.6 序列处理 用 DNASTar 软件拼接、分析序列。

2 结果与分析

2.1 海南沼虾序列比对结果及分析

2.1.1 海南沼虾 ITS-1 序列与日本沼虾 ITS-1 序列长度比较 如表 1 所示,海南沼虾 ITS-1 全序列长度在 1700~1900 bp 之间,较日本沼虾(1800~2100 bp)短 100~200 bp。各海南沼虾个体碱基含量变化范围分别为:27%~30%(A),27%~31%(G),14%~16%(C),43%~46%(G+C)(表 2)。利用 DNASTar 软件得到了海南沼虾标准序列(表 3),大小为 1735 bp,而日本沼虾 ITS-1 的标准序列长度为 2046 bp(NCBI 登陆号:EU346851.1)^[4]。

表 1 海南沼虾和日本沼虾 ITS-1 片段长度比较

海南沼虾个体	ITS-1 片段长度/bp	日本沼虾个体	ITS-1 片段长度/bp
H1	1738	Q1	1861
H2	1732	Q2	1919
H3	1842	Q3	1840
H4	1827	Q4	1813
H5	1834	Q5	1902
H6	1733	Q6	1814
H7	1799	Q7	1865
H8	1785	Q8	2020
平均	1786.25	平均	1879.25

注:H1~H8 表示海南沼虾 1~8 号个体;Q1~Q8 表示日本沼虾 1~8 号个体;表 2 同。

表 2 海南沼虾个体 ITS-1 序列碱基组成

海南沼虾个体	A		G		T		C		G+C	
	碱基含量	比例/%								
H1	486	27.6	529	30.44	471	27.1	252	14.5	781	44.94
H2	481	27.77	528	30.48	469	27	254	14.67	782	45.15
H3	521	28.28	548	29.75	484	26.28	289	15.69	837	45.44
H4	540	29.56	511	27.97	510	27.91	266	14.56	777	42.53
H5	518	28.24	551	30.04	482	26.28	283	15.43	834	45.47

(续表 2)

海南 沼虾个体	A		G		T		C		G+C	
	碱基含量	比例/%								
H6	488	28.16	527	30.41	466	26.89	252	14.54	779	44.95
H7	529	29.41	509	28.29	495	27.52	266	14.79	775	43.08
H8	481	27.25	520	29.46	474	26.86	252	14.28	772	43.74
变化范围	481~540	27.25~29.56	509~551	27.97~30.48	466~510	26.28~27.91	252~289	14.28~15.69	772~837	42.53~45.47
变化幅度	59	2.31	42	2.51	44	1.63	37	1.41	65	2.94
平均含量及 平均百分比	505.5	28.28375	527.875	29.605	481.375	26.98	264.25	14.68143	792.125	44.4125

表 3 海南沼虾 ITS-1 标准序列

```

A---CGACGG-TCAGTGCCA-GCTTGC-ATGCCTGCAGGTGCGACGATTCACAC
CGCCCGTCGCTACTACCGATTGAATGATTAGTGAGGCCTTCGGACTGGCGG
TCTTGGACTGGGTGCGGTGGTTACTTCCAGCAATGGGGTGCCGTCGACTCG
CCTAGACGGGCCGGAAGATGTCCAACTTGATCATTAGAGGAAGTAAAA
GTCGTAACAAGGTTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTATAGTTGA
CTTT TAAAGTGTATGTGTGTATGTGAGA-----G---CATGCACACAAC
TTTGAAGAGAGAA-TTTAGAGAGATAGAGA-----GAGAGAGAGA-----GAG
AGAGAGA-----AAAAAGTATGCAA
GTTTGAACGGTCT-CAAGTCAGTCA-----AGTATTGGAGAAAACG
TCTCGAAAGCTACTGCTGAGCCAATGATGGTTGGTGTGAGAGCAAAGTGTCA
AGCTCAAATGGTTGTG TGACTGTTTGTGCGATGGCCAAAGTTGGAGAGGAC
GTTGGACTGTGAATGAGAGAGAGAGA-----CATTAAAGAGGTGTGTAGATG
GAGGGAGGAAGAAAGTAGTAGTAGTAG---CAGTCTGTGGAGGGGAGATAGTG
TCTAGTATAGTTTGTGTTGTTGGATGTGGTGGACTGGTATCAGTGTGGGAC
GTCTCGAAAGCGAAGAGCCAATGTTTGTTCATGAAAAGGTGGTGTGAGAGAGC
CGCCATGATATAACAAGCTCAACTCACAAGAGTGCTCTTAAAGAGGGGCTTT
TGTGAGGGTTGGAGATGACGGAAGTGGTATTGGTTAGCCTGATTACAGCA
CAATGATAATTTTGTGTGGTGGTTGTTTGTGTAAGCTTTTAGATTGGAA-
GC-----AG-----CCAAAC-----TAGCAAGGGTGCTCTTGAAGA
GGGGCTCTTGTTTAGTATGTGAGAGAGAAAAGAAATGCTACTAACTCTGATT
GTTTTGACAAGGCAATGG-ATCTGTACACAGTATACATGGTGGGGACACTT
TTGCAAGAAATGAGAAAGAAAGAAAGAA-----AATCTGCACAGGTATTGTG
TTGGTGTGGTGGACTGGTATCAGTGTGGGACGTCTCGAAAGCGAAGAGCC
AATGTTTTTGAGGTGGTGGTGGAGAGCCATGATATTATAA-TAACAAAGC T
CAACTCACAAGAGTGCTCTTGAAGAGGGGCTCTTGTGAGGGTTGGAGATGA
CGGAAACTGGTATTGGTTGGCCTGGCATCAACCAACGCTTTGCACGAAAAA-
-TGTTCAAGTTA---CTTTTGAT-----G---TTGCGGT-----GTGGTCATCCT
TGT----T---TTAGGGATGAAGAAGAATAAATATTTGATTGGACTCCCTGTTAG
GGATTGAAGATGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGA-----ACAG
TGTGTGTA CTCTATGCGGTGCTCTTGAAGAGGGGCCGTGGCGAGTGTGCAT
GTTGTTG-TACAAATGAGAGAAGAAG---AAA-----GTGTCTGTACAAGAA
TTTGTAATTGAACATTGATGGTGTGTAGA--TGATGA--
----TGACTGGCTAG-CTGTTTTGAGCGAGTTGCTTTTTTTTGGGGATGCGGA
GAATGCCCATCCTACATTTTGTGTTTCAAATGTTGTAGACCTTAATCT-GTT
TTTGAGCACTTAATCTAACTAATTTGACAACCTTCTAATGGTGGATCGCTCGG
CTCGTGGGTGCGATGAAGACCGCAGCTAAATAATCTCTAGAGGATCCCCGGG
TACCGAGCTCGAAT-CGTAAT-CATGTCATXTX XXXX

```

2.1.2 简单重复序列(SSR)及分析 ITS-1全序列中含有5种微卫星序列(SSR),分别为(AG)_n, (GA)_n, (AGT)_n, (AGC)_n, (GCA)_n。(AG)_n和(GA)_n在所有个体都有分布,且前者的多态性高于后者。(AGT)_n, (AGC)_n, (GCA)_n都不是多态性位点。在该群体中, (AGT)_n出

现比例为25%, (AGC)_n和(GCA)_n出现比例都为12.5%。在SSR序列中,重复次数最低为5次,最高为17次。(AG)_n在307 bp和402 bp分别有4个和2个等位基因。(GA)_n在515 bp和1316 bp分别有3个和6个等位基因(表4)。

表4 SSR多态位点

起始位置/bp	微卫星序列	等位基因数	等位基因
307	(AG) _n	4	(AG)19, (AG)10, (AG)12, (AG)9,
402	(AG) _n	2	(AG)12, (AG)18
515	(GA) _n	3	(GA)8, (GA)7, (GA)6
1316	(GA) _n	6	(GA)17, (GA)15, (GA)15, (GA)15, (GA)10, (GA)16

2.2 BLAST结果及分析

将海南沼虾ITS-1标准序列(表3)BLAST分析,结果显示:其分别与刀额新对虾(NCBI登录号:EU118287.1)及日本沼虾(NCBI登录号:EU118285.1)的18S核糖体RNA基因的部分序列、ITS-1的全序列、5.8S核糖体RNA部分序列具有同源性。且同刀额新对虾的同源性高于日本沼虾。

3 讨论与结论

3.1 海南沼虾ITS-1片段长度

目前关于水产经济品种的ITS-1片段测序结果也有所报道,泥蚶、金焰笛鲷属的几种鱼类、珍珠贝、中华豆蟹、太平大眼蟹等ITS-1片段长度分别为418, 566, 550, 739, 769 bp^[5-7]。同以上几种水产经济品种相比,海南沼虾ITS-1片段较长,但是同日本沼虾相比,其ITS-1片段较短。

3.2 海南沼虾碱基组成

从碱基组成情况来看,不同个体A, G, C, T 4种碱基含量有所不同,但是4种碱基含量在不同个体之间相差并不大,这也可以说明海南沼虾群体是处于相对稳定状态。同张洪伟等^[4]研究所得出的日本沼虾碱基含量情况相比,除碱基A之外,其余碱基变化范围均大于后者,但变化幅度均小于后者。

3.3 SSR序列

SSR(Simple Sequence Repeat),又称简单重复序列,具有非常丰富的多态性,其中以双核苷酸重复最为常见^[8],当前主要被应用于亲缘关系鉴定^[8-10]、遗传图谱构建^[11]等领域。目前,对于ITS-1序列研究主要采用序列比对及BLAST分析两种方法。张洪伟等^[4]首次对日本沼虾ITS-1序列中的SSR序列进行了分析,共发现2个具有多态性的微卫星序列,分别为位于695 bp的(GA)_n序列和位于1446 bp的(AGC)_n序列。同时,分

析了太湖日本沼虾、选育日本沼虾及其杂种ITS-1序列中的微卫星位点,结果表明,日本沼虾三个群体均出现微卫星多态位点,仍位于695 bp和1446 bp之处,这一结果对于一定意义上的种质资源鉴定有参考作用。从此研究来看,海南沼虾ITS-1序列中的SSR位点,以(GA)_n最多,其次是(AG)_n,这与Powell, etc研究结论基本一致^[8]。只有较少的海南沼虾个体出现了三碱基的SSR位点。同张洪伟等^[4]研究结果不同的是,海南沼虾多态性SSR位点除了(GA)_n之外,还有(AG)_n,这也表明其较日本沼虾遗传内容更为丰富。

3.4 BLAST结果

从BLAST结果来看,海南沼虾与日本沼虾及刀额新对虾都有着较高的同源性。与日本沼虾有较高的同源性,是因为两者都同属于沼虾属。与刀额新对虾较高的同源性,可能是因为两者都需在河口附近繁殖。在水生生物资源日益退化和衰竭的今天,获得遗传多样性和系统分类的资料,进行生物多样性的保护是非常有必要的^[12]。该研究首次对海南沼虾ITS-1序列进行了分析并得出了相应的结论。这些结论一方面为开展海南沼虾SSR分子标记研究提供了理论参考,另一方面,有利于其单核苷酸多态性(SNP)分析试验开展。此研究得到的海南沼虾核心序列可以作为海南沼虾种质资源鉴定的依据。

参考文献

- [1] 黄富友,陈彩仙,姚子亮,等.海南沼虾后期苗种的冬季暂养技术[J]. 水产养殖,1996(6):7-8.
- [2] 郑闽泉,丁桂枝,刘伯仁.海南沼虾胚胎发育及初孵幼体的观察[J]. 海洋湖沼通报,1991(2):78-81.
- [3] 王凯伟,黄富友.海南沼虾人工繁殖研究[J]. 水利渔业,1990(2):48-49.
- [4] 张洪伟.青虾ITS-1序列SNP位点筛选及其在杂交遗传分析中的

- 应用[D].保存地点:南京农业大学,2008:23-53.
- [5] 林昕,王鹏,杜琦,等.福建沿海不同养殖区泥蚶的 ITS-1 基因片段序列分析[J].福建水产,3(1):61-65.
- [6] 徐田军,刘楚吾,刘丽,等.金焰笛鲷 rDNA 基因转录间隔区 ITS-1 序列分析[J].南方水产,2006,2(5):61-64.
- [7] 张代臻,唐伯平,张华彬,等.中华豆蟹与太平大眼蟹 ITS-1 区较研究[J].安徽农业科学,2008,36(11):4465-4466.
- [8] Wayne Powell, Michele Morgante, Chaz Andre, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. Mol Breed, 1996, 12:223-225.
- [9] Einar E Nielsen L, Michael M Hansen, Lars A Bach. Looking for a needle in a haystack: discovery of indigenous Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in stocked populations [J]. Conservation Genetics, 2001, 2:219-232.
- [10] 张于光,李迪强,饶力群,等.东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用[J].动物学报,2003,49(1):118-123.
- [11] Nichols K M, young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. AnitaGenet, 2003, 34(2):102-105.
- [12] 王献溥.生物多样性保护与利用的主要研究方向[J].自然资源, 1994(4):1-6.