

# 卵形鲳鲹线粒体 16S rRNA 基因全长序列的克隆与分析

彭金霞, 彭敏, 陈秀荔, 蒋伟明, 杨春玲, 李咏梅

(广西水产研究所, 广西南宁 530021)

**摘要:**根据近源物种线粒体序列的同源比对,在 16S rRNA 基因上、下游保守区域各设计 1 对通用引物。PCR 扩增获得特异的 DNA 片段,经克隆、测序和比对证实,该片段包含了卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus* Linnaeus)线粒体 16S rRNA 全长序列 1 725 bp。对 5 个个体分别测序比对,发现卵形鲳鲹 16S rRNA 基因在钦州湾种群个体间存在至少 7 个变异位点,使 5 个个体分别具有 5 种不同的单倍型。将卵形鲳鲹与鲹科其它种的 16S rRNA 序列进行比对,构建鲳鲹科的系统进化树,支持鲹科下设 4 个亚科(鲹亚科、鲷亚科、鲳鲹亚科、鲳鲹亚科)的分类系统。研究表明,16S rRNA 基因既可用于卵形鲳鲹种群遗传多样性分析,又适用于鲹科鱼类的系统进化分析。

**关键词:**卵形鲳鲹;线粒体;16S rRNA 基因;克隆

**中图分类号:**Q503 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2010)04-0081-05

卵形鲳鲹(*Trachinotus ovatus* Linnaeus)隶属于鲈形目(Perciformes)、鲹科(Carangidae)、鲳鲹亚科(Trachinotinae)、鲳鲹属(*Trachinotus*) (成庆泰和郑葆珊, 1987);卵形鲳鲹又被称为金鲳、短鲳、黄腊鲳,广泛分布于太平洋、大西洋和印度洋,属暖水性中上层鱼类,其含肉率高、肉质细嫩、味道鲜美,为名贵海产经济鱼类。该鱼是海洋捕捞对象,但渔获稀少。近 10 多年来,台湾、海南等地卵形鲳鲹人工育苗相继获得成功,因而成为我国新开发的养殖品种(舒琥等, 2007;农新闻等, 2008;刘楚斌和陈锤, 2009)。线粒体 16S rRNA 基因由于其序列变异丰富,常被用来阐明种内、种间的遗传多样性和系统进化关系(孔晓瑜等, 2001;孔晓瑜等, 2002;郭天慧等, 2004;王庆容和李黛, 2008;林琪等, 2008;王庆容和李黛, 2009)。本文通过 PCR 扩增、序列测定与分析,对卵形鲳鲹的线粒体 16S rRNA 基因进行了初步研究,以期今后种质资源保护、遗传育种等工作提供基础资料和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

2008 年 9 月,从广西钦州市钦南区尖山镇陈龙养殖户池塘采集养殖 123 d 的卵形鲳鲹 50 尾,取肌

肉组织保存于超低温冰箱(-80℃)备用。

### 1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 提取 取肌肉约 100 mg,在 1.5 mL Eppendorf 管中剪碎,用含蛋白酶 K 的裂解液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 2 mmol/L EDTA; 1% SDS)于 37℃ 硝化过夜;次日分别以饱和酚、饱和酚:异戊醇:氯仿(25:24:1)、氯仿:异戊醇(24:1)各抽提 1 遍,然后以 100% 冰乙醇(-20℃)沉淀 DNA,干燥后溶于 TE 缓冲液中,置 -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计 从 NCBI 数据库下载了甲若鲹(*Carangoides armatus*)、黑尻鲹(*Caranx melampygus*)、竹夹鱼(*Trachurus japonicus*)等已经完成线粒体测序鱼类的 16S rRNA 基因区段序列,用 Dnaman 软件进行比对。在这些物种 16S rRNA 基因上游 55 bp 和下游 16bp 位置设计保守引物(16SF: 5'-AGAAAAGCATCTCCCTTACAC-3'; 16SR: 5'-GCTCTGCCACTCTAACATGC-3'),以扩增包含 16S rRNA 基因的卵形鲳鲹线粒体片段。

1.2.3 PCR 扩增与片段克隆 以提取的 50 个卵形鲳鲹 DNA 为模板,用引物 16SF 和 16SR 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为:50 μL 体系中模板 DNA 约 100 ng, Taq 酶(TaKaRa LA Taq)2U, 10×PCR 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTY, 0.5% Tween-20, 0.5% NP-40, 50% Glycerol, pH 8.0)5 μL, dNTPs 2 μL (2.5 μmol/mL), 16SF/16SR 引物各 1 μL。

PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环,最

收稿日期:2010-02-09

基金项目:国家科技支撑计划农业领域课题(编号 2007BAD29B03)。

通讯作者:李咏梅。E-mail:liyongmei915@163.com

作者简介:彭金霞,1981 年生,女,安徽潜山人,博士,助研,研究方向为水产遗传育种。

后 72 °C 延伸 10 min; 同时设不含 DNA 模板的空白对照, 扩增产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物电泳后, 对目的片段进行割胶回收。目的片段经凝胶纯化试剂盒纯化后, 溶于去离子水中, 再与 PGEM - Teasy 载体 4 °C 连接过夜。取 5  $\mu$ L 连接产物转化 Top10 感受态细胞, 通过蓝白斑和 PCR 相结合筛选阳性克隆。

1.2.4 序列测定与分析 每个体选取 3 个阳性克隆提取质粒, 用 T7、SP6 引物在自动测序仪 (Applied Biosystems 3730, 联合基因) 上进行正反双向测序, 再在 T7、SP6 引物测序结果的 600 bp 左右分别设计与 T7、SP6 同向的引物继续测序, 1.8 kb 序列共测 4 个反应, 序列拼接时每个反应取 600 bp 以前的序列并对照测序峰图, 以保证序列的准确性。

序列的多重比对采用生物学软件 CLUSTAL W (version 1.83) 来完成。采用生物学软件包 Mega molecular evolutionary genetic analysis software package (version 4.0), 用最大似然法来构建卵形鲳鲹与其它物种 16S rRNA 基因的进化树, 并且通过重复测试 1 000 次来评估该进化树的每一个分支的置信度。

## 2 结果

### 2.1 DNA 片段扩增与克隆

随机选取 1 个个体 DNA 样本进行 PCR 扩增, 产物经琼脂糖凝胶电泳, 显示为大小约 1.8 kb 的清晰条带, 与预期大小一致; 然后以 50 个卵形鲳鲹个体的 DNA 为模板分别进行扩增, 均获得预期大小的片段 (目的片段约 1.8 kb), 部分电泳结果见图 1。随机抽取其中 5 个个体, 对其目的条带回收, 连接到 PGEM - Teasy 载体上, 转化筛选阳性克隆, 均筛选到 80% 以上的阳性克隆, 每个个体选择 3 个阳性克隆进行测序。

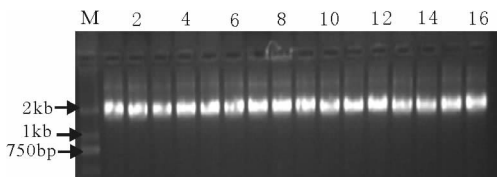


图 1 卵形鲳鲹不同个体的 16S rRNA 基因扩增后的电泳结果

Fig. 1 Gel electrophoresis image of 16S rRNA gene amplified from different *Trachinotus ovatus* individuals

### 2.2 序列分析

拼接测序后, 经 blast 比对发现, 引物 16SF 和

16SR 扩增的片段包含了卵形鲳鲹 16S rRNA 基因全长 1 725 bp 及上游 55 bp、下游 16 bp 的侧翼序列, 如图 2 所示, 箭头显示上下游引物位置。16S rRNA 基因序列中 4 种碱基含量分别为 A - 33.7%、C - 25.1%、G - 19.8%、T - 21.4%; A/T 含量高于 C/G, 与其它鱼类一致。

共测定了 15 个个体的 16S rRNA 基因全长。比较发现, 个体内不同克隆间无序列差异, 而 5 个个体间存在第 71、769、1 150 位等 3 个 A/G 转换位点, 578、1 104 位等 2 个 C/T 转换位点, 1 071 位的 1 个 C/A 颠换位点及 1 644 位的 1 个 T 碱基插入突变 (图 3)。综合来看, 5 个个体分别具有 5 种不同的基因型。因此, 16S rRNA 基因的序列在种群内个体间存在丰富的变异, 适用于种群内遗传多样性分析。

### 2.3 基于 16S rRNA 序列的鲳鲹科鱼类进化关系

用 Dnaman 软件对卵形鲳鲹及其它鲳鲹科鱼类 16S rRNA 序列进行比对, 参与比对的各物种及序列信息见表 1。根据比对结果, 运用最大似然法构建了系统发育进化树。基于 16S rRNA 序列的鲳鲹科各亚科、属系统进化关系如图 4 所示。枝长表示分歧度, 枝上的数值是 1 000 次重复抽样检验的置信度值。从图 4 可以看出, 参与构建进化树的鲳鲹科鱼类形成 4 个分支, 各自都形成单系群, 分别代表鲳鲹亚科、鲳亚科、鲳亚科、鲳亚科。鲳亚科和鲳亚科形成 1 个姐妹群, 然后与鲳鲹亚科相聚, 这 3 个亚科最后再与鲳亚科聚到一起, 与用鲳鲹科鱼类线粒体 DNA 控制和 *Cyt b* 基因构建的进化树结果一致 (朱世华等, 2007a; 朱世华等, 2007b; Reed et al, 2001)。

## 3 讨论

### 3.1 16S rRNA 基因在卵形鲳鲹种质资源评价中的应用

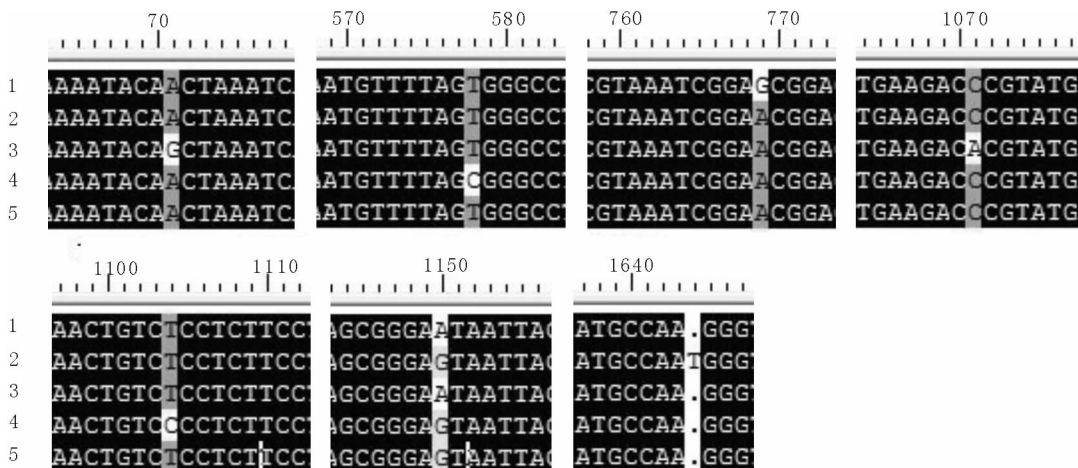
卵形鲳鲹作为新开发的海水养殖品种, 池塘和深水网箱养殖都取得了良好的效益。由于其对盐度适应范围广, 甚至可以在淡水中生存, 具有广泛的推广养殖价值和良好的产业发展前景。但国内养殖卵形鲳鲹的亲本均是野外捕捞驯化后繁殖下来的, 经过多代繁育, 出现了遗传趋同和种质退化严重的问题。找到一个合适的分子标记, 进行养殖和野生群体的种质资源调查, 然后收集尽量丰富的种质, 通过遗传选育获得优良养殖品种是卵形鲳鲹养殖产业可持续发展的必由之路。

```

1      AGAAAAGCAT CTCCTTACA CTGAGAAGCC ACCCGTGCAA ATCGGGTCAC CCTGACGCCC
61     ATCAGCTAGC CCCACCCCA AATCTCAATA AACCCTATT ATTTAACCCC AAAAACACAA
121    AATACAGCTA AATCAAACCA TTTTCCATC CAAGTACGGG CGACGGAAAA GAAACCCGAG
181    GAGCAATAGA GAAAGTACCG CAAGGGAACG CTGAAAGAGA AATGAAATAA ACCAGTAAAG
241    CCTAAAAAAG CAGAGATTTT TCCTCGTACC TTTTGCATCA TGATTTAGCC AGAATCCTTT
301    AAGCAAAGAG AACTTTAGTT TAAAACCCCG AAAGTGTG AGCTACTCCA AGACAGCCTA
361    AAAATAGGGC GAACCCGTCT CTGTGGCAA AGAGTGGGAC GAGCTTCGAG TAGAGGTGAC
421    AGACCTATCG AACTCAGTTA TAGCTGGTTG CCTGTGAATT GGATAGAAGT TCAGCCTCTC
481    GGCTTCTCCC TTCACCCCAA CATGGTTTTT AACCATACCC AATGATACAA GAGAAACCGC
541    GGGAGTTAGT CAAAGGAGGA ACAGCTCCTT TGAACAAAGA CACAACITTA CCAGGAGGGT
601    AAAGATCATA ATCTCAAGG CAAAATGTTT TAGTGGGCCT AAAAGCAGCC ATCCTAATAG
661    AAAGCGTTAA AGCTCAAACA TATCTACCC CCTCATATCC TGATAACTCA ATCTAAACCC
721    CCTAATTCTA CCAGGCCGCC CCATGCAATA CATGGGGGCG ACTATGCTAA TATGAGTAAT
781    AAGAGGGCCT AAAAAGCTCT CTCCCTGCAC ACGCGTAAAT CGGAACGGAC CCACCACCGA
841    GCATTAACGG CCCCAAACAA AGAGGGTACT GGATATATAC TAATCAAAC AGAAATTCAT
901    CCATCACATT ACCGTTGACC CTACACAGGT GTGCTATTAA GGAAAGACCG AAAGGAAGAG
961    AAGGAACTCG GCAAACACTT CAAGCCTCGC CTGTTTACCA AAAACATCGC CTCTTGCAAA
1021   ACCAAAGAAT AAGAGGTCCC GCCTGCCCGG TGACAATAAA AGTTTAAACGG CCGCGGTATT
1081   TTGACCGTGC AAAGGTAGCG TAATCACTTG TCTTTTAAAT GAAGACACGT ATGAATGGCA
1141   TAACGAGGGC TTAAGTGTCT CCTCTTCTTA GTCAATGAAA TTGATCTTCC CGTGCAGAAG
1201   CGGGATAAAT TACATAAGAC GAGAAGACCC TATGGAGCTT TAGACACTAA GACAGACCAT
1261   GTTAATTAAC CCTAAACAAA GAATTAARCT AAATGACACC CTGTCCTACT GTCTTCGGTT
1321   GGGGCGACCA TGGGAAACA CAAAACCCCC ACGCGGAATG AGAGGACTAA CCCCTATCC
1381   CACCCTCCCA CAATTAAGAG TTACAACCTT AACCAACAGA ACTTCTGACC AAACATGATC
1441   CGGCACCGCC GATCAACGAA CCAAGTTACC CTAGGGATAA CAGCGCAATC CCCTTTTAGA
1501   GTCCATATCG ACAAGGGGGT TTACGACCTC GATGTTGGAT CAGGACATCC TAATGGTGCA
1561   GCGCTATTA AGGGTTCGTT TGTTCAACGA TTAAAGTCCT ACGTGATCTG AGTTCAGACC
1621   GGAGTAATCC AGGTCACTT CTATCTATGA AATGATCTT TCTAGTACGA AAGGACCGAA
1681   GAGAAAGAGC CCATGCCAAG GGTACGCCTC CCCCTCACCT AATGAAATCA TATAAATAG
1741   GTAAAAGGGC ATACTCCCTT AATGCCTCAG AAAACGGCAT GTTAGAGTGG CAGAGC
    
```

图2 引物16SF和16SR扩增片段的测序结果

Fig.2 Sequence of the DNA amplified by primers 16SF and 16SR



标尺示各位点在16S rRNA 基因全长中的位置;1,2,3,4,5 代表个体编号

图3 卵形鲳鲹5个个体间的变异位点

Fig.3 Variation sites among different *Trachinotus ovatus* individuals

The scale show positions of variation sites in the 16S rRNA whole sequence, 1,2,3,4,5 are individual numbers

表1 用于序列比对和进化树构建的信息

Tab. 1 Information of the sequences used for alignment and phylogenetic tree construction

亚科 Subfamily	属 Genera	种 Species	登录号 Genebank accession	
鲳鲈亚科 Trachinotinae	鲳鲈属 <i>Trachinotus</i>	卵形鲳鲈 <i>T. ovatus</i>	HM241652	
		狮鼻鲳鲈 <i>T. blochii</i>	EF613263.1	
		北美鲳鲈 <i>T. carolinus</i>	AY857952.2	
鲈亚科 Caranginae	鲈属 <i>Caranx</i>	长面鲈 <i>C. hippos</i>	DQ532847.1	
		六带鲈 <i>C. sexfasciatus</i>	DQ427055.1	
		黑尻鲈 <i>C. melampygus</i>	DQ427053.1	
	细鲈属 <i>Selaroides</i>	金带细鲈 <i>S. leptolepis</i>	EF613270.1	
		副叶鲈属 <i>Alepes</i>	及达副叶鲈 <i>A. djedaba</i>	EF613269.1
		丽叶鲈 <i>A. kleinii</i>	EF613264.1	
	丝鲈属 <i>Alectis</i>	长吻丝鲈 <i>A. indica</i>	EF613265.1	
	圆鲈属 <i>Decapterus</i>	蓝圆鲈 <i>D. maruadi</i>	EF613266.1	
		罗氏圆鲈 <i>D. russelli</i>	DQ660428.1	
	竹荚鱼属 <i>Trachurus</i>	竹荚鱼 <i>T. declivis</i>	GQ412302.1	
		大西洋马鲛 <i>T. trachurus</i>	AB096007.1	
	鲷亚科 Seriolinae	鲷属 <i>Seriola</i>	黄尾鲷 <i>S. lalandi</i>	AY820734.2
	鲭鲈亚科 Chorineminae	鲭鲈属 <i>Scomberoides</i>	康氏似鲭 <i>S. commersonianus</i>	EF613268.1
逆钩鲭 <i>S. lysan</i>			DQ027922.1	

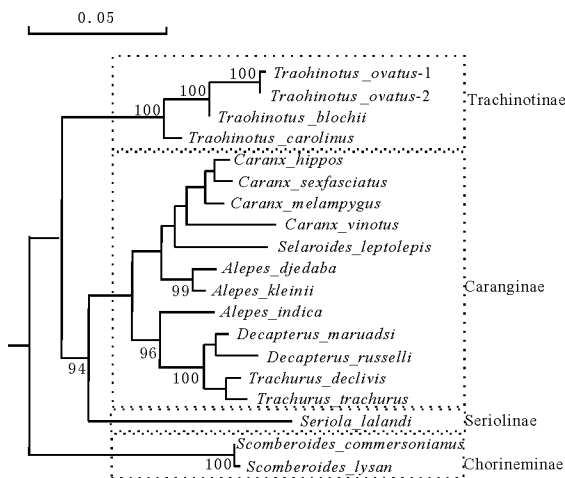


图4 基于鲭科鱼类 16S rRNA 序列运用最大似然法构建的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed by maximum likelihood method based on the 16S rRNA gene sequence of Carangidae fishes

16S rRNA 基因是进行水产动物种内和种间进化关系分析最常用的线粒体基因之一。如在甲壳动物中, Machado 等 (1993) 和邱高峰等 (2000) 通过序列测定发现, 16S rRNA 基因具有丰富的变异位点, 适用于对虾种群遗传多样性研究。鱼类线粒体序列更是广泛应用于研究种内和种间系统学关系、物种起源及遗传分化、母系演化、种内多态和地理分布关系、种质评估、种群遗传结构研究、原种鉴定等 (周先文等, 2009)。前期关于鲭科鱼类 16S rRNA 基因的研究都是克隆了其变异程度最大的区段 (600 bp

左右), 本研究克隆了卵形鲳鲈 16S rRNA 基因全长序列, 为遗传分析提供了更多变异位点。比较测定的 5 个个体的序列发现, 其分别具有 5 种不同的单倍型, 这些丰富的变异是进行卵形鲳鲈种群遗传多样性分析、进而进行种质资源评价的有效工具。由于测序成本高, 对全长序列测序比对来进行种质资源评价是不合适的, 鉴于卵形鲳鲈 16S rRNA 基因序列中存在丰富的变异位点, 我们正在探索 16S rDNA PCR - RFLP 进行种质资源评价的技术, 但不同地理种群的材料收集尚未完成, 以此技术进行种质资源评价的准确性尚待进一步验证。

### 3.2 16S rRNA 基因在鲳鲈科鱼类进化关系中的应用

早期基于形态学特点推断的鲳科下各亚科的进化关系一直存在争议 (Smith - Vaniz, 1984; Gushik- en, 1988)。现代分子生物学技术发展起来后, 研究者通过线粒体 *Cyt b* 全序列和控制区序列构建了分子系统发育关系树。本研究以鲳科 18 种鱼的 16S rRNA 基因序列构建了系统发育树, 结果与以线粒体 *Cyt b* 全序列和控制区序列构建的分子系统发育关系树一致, 支持鲳科鱼类形成 4 个分支, 即鲳亚科、鲷亚科、鲳鲈亚科、鲭鲈亚科, 各亚科都形成了各自的单系类群。鲳亚科与鲷亚科形成姐妹群, 再与鲳鲈亚科聚合, 鲭鲈亚科处于类群的基部, 最后与前面 3 个亚科聚在一起。表明 16S rRNA 基因进化速度适中, 其变异既可用于物种内遗传多样性分析, 又可用于阐明鲳科鱼类的系统发育进化关系。

## 参考文献:

- 成庆泰,郑葆珊. 1987. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社: 341-342.
- 郭天慧,孔晓瑜,陈四清,等. 2004. 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, 34(1): 22-28.
- 孔晓瑜,刘亚军,喻子牛,等. 2002. 栉孔扇贝和海湾栉孔扇贝线粒体 16S rRNA 基因片段的比较研究[A]. 贝类学论文集(第1辑)[C]. 北京: 海洋出版社: 59-62.
- 孔晓瑜,喻子牛,刘亚军,等. 2001. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 COI 基因片段的序列比较研究[J]. 青岛海洋大学学报, 31(6): 861-866.
- 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[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 47(2): 268-273.
- 刘楚斌,陈锤. 2009. 卵形鲳鲹的生物学与养殖技术[J]. 齐鲁渔业, 26(6): 32-33.
- 农新闻,米强,朱瑜,等. 2008. 卵形鲳鲹的含肉率及肌肉营养价值的研究[J]. 中国水产, (9): 73-75.
- 邱高峰,常林瑞,徐巧婷,等. 2000. 中国对虾 16S rRNA 基因序列多态性的研究[J]. 动物学研究, 21(1): 35-40.
- 舒琥,何敏莲,张海发,等. 2007. 卵形鲳鲹染色体组型研究[J]. 广州大学学报: 自然科学版, 6(2): 23-25.
- 王庆容,李黛. 2008. 南方鲆 *Cyt b* 基因序列变异及遗传多样性分析[J]. 水利渔业, 28(3): 42-45.
- 王庆容,李黛. 2009. 鲆细胞色素 b 基因序列差异及遗传多样性分析[J]. 水生态学杂志, 2(1): 40-44.
- 周先文,王晓清,马晓. 2009. 16S rRNA 基因及其在水产动物分类研究中的应用[J]. 黑龙江水产, (2): 12-13.
- 朱世华,郑文娟,邹记兴,等. 2007a. 基于细胞色素 b 序列的鳊科分子系统发育[J]. 动物学报, 53(4): 641-650.
- 朱世华,郑文娟,邹记兴,等. 2007b. 鳊科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育关系[J]. 动物学研究, 28(6): 606-614.
- Gushiken S. 1988. Phylogenetic relationships of the Perciformes genera of the family Carangidae[J]. Jpn J Ichthyol, 34: 443-461.
- Machado E G, Dennebouy M, Suarez M O, et al. 1993. Mitochondrial 16S rRNA gene of two species of shrimps: sequence variability and secondary structure [J]. Crustaceana, 65(3): 279-286.
- Reed D L, deGravelle M J, Carpenter K E. 2001. Molecular systematics of *Selene* (Perciformes: Carangidae) based on cytochrome b sequences [J]. Mol Phylogenetics Evol. 21: 468-475.
- Smith-Vaniz W F. 1984. Carangidae: relationships [A]. // In: Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW, Richardson SL. Ontogeny and Systematics of Fishes[M]. Am Soc Ichthyol Herpetol: Spec Publ, 1: 522-533.

(责任编辑 万月华)

Cloning and Sequence Analysis of *Trachinotus ovatus* Mitochondrial 16S rRNA Gene

PENG Jin-xia, PENG Min, CHEN Xiu-li, JIANG Wei-ming, YANG Chun-ling, LI Yong-mei

(Guangxi Fishery Institute, Nanning 530021, China)

**Abstract:** Based on multiple alignment of mitochondrial sequence from neighbored species, a pair of conserved primers was designed on the flanking region of 16S rRNA gene. The PCR amplification product was cloned to PGEM-Teasy vector and sequenced. Blast on NCBI confirmed that the sequence contain whole 1 725 bp of 16S rRNA gene. Alignment of sequence from 5 fishes of the same population revealed 7 variation sites, which form 5 different genotypes. Based on the multiple alignment of 16S rRNA sequence of *Trachinotus ovatus* and other Carangidae species, a phylogenetic tree was constructed which supporting the idea that Carangidae could be divided into four subfamilies: Caranginae, Seriolinae, *Trachinotinae* and Chorineminae. So, 16S rRNA gene is a useful tool which can be used not only in genetic polymorphism analysis of *Trachinotus ovatus*, but also in phylogenetic analysis of Caranginae species.

**Key words:** *Trachinotus ovatus*; Mitochondrial; 16S rRNA gene; Cloning