

魁蚶线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段序列测定及其应用前景 *

孔晓瑜¹ 姜艳艳¹ 相建海² 喻子牛¹ 刘亚军¹

(¹ 青岛海洋大学教育部海水养殖重点实验室 266003)

(² 中国科学院海洋研究所 青岛 266071)

关键词 魁蚶(*Scapharca broughtonii*), 16S rDNA, COI, 序列测定

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)是蚶科贝类的一种大型经济种类,主要分布于我国、日本和朝鲜半岛及俄罗斯东南部沿海。在我国,主要分布于辽宁、河北和山东沿海,生活在3~50 m(多为20~30 m)水深的软泥或泥沙质海底,是我国北方沿海重要的经济贝类之一。但有关其自然群体的遗传变异及群体间遗传分化等方面的研究不多;同时,作者和日本研究者发现,中国、韩国和日本魁蚶群体在形态和遗传上差异明显,差异和分化达到了何种水平,这是人们广泛关注的问题;另外,中国、韩国和日本魁蚶之间存在一定程度的引种和相互扩散,这会给种质资源的管理与养殖生产带来一定不良后果。因此,本文对魁蚶的线粒体16S rRNA和COI基因片段进行了PCR扩增和测序,并讨论它们用于研究上述问题的潜在应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

魁蚶样品采自青岛即墨,鉴定后取肌肉组织提取DNA。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA提取 取大约0.1 g肌肉组织,尽量剪碎,用DNA提取试剂盒(Pure Gene, Gentra公司)提取基因组DNA, TE溶解后-20℃保存备用。

1.2.2 PCR扩增 16S rDNA和COI基因分别用引物16sarL/16sarH和COIL1490/COIH2198,序列如下:16sarL/16sarH: GCCTG T T TATCAAAAACAT/CCGGTCTGAATC AGATCACGT; COIL1490/COIH2198: GGTCACAAATCATAAAGATATTGG/ TAAACTT

CAGGGTGACCAA AAAATCA。用PTG100 PCR仪扩增;25 μl反应体积内含:2.0 mmol/L MgCl₂;200 mmol/L各种dNTP;0.2 μmol/L每个引物;1 μl模板DNA;1单位Taq聚合酶及1×缓冲液(上海生工)。采用热启动PCR,PCR反应程序:35循环94℃/45 s;48℃(COI),50℃(16S)1 min,72℃/min;之后72℃延伸5 min。PCR产物用1.4%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,凝胶成像系统观察照像。

1.2.3 PCR产物克隆 用UNIQ5柱式PCR产物回收试剂盒纯化PCR产物,将产物与pMD18-T载体连接(大连宝生物);连接反应液10 μl,其中载体1 μl, Ligation Solution I 5 μl,PCR产物4 μl,16℃连接1 h或4℃过夜,然后连接液转化感受态大肠杆菌JM09,涂平板,蓝-白斑筛选阳性克隆,液体培养基培养,Pharmacia EasyPrep Kit提纯质粒,插入片段经EcoR I和Hind III酶切检测或PCR检测。

1.2.4 测序 使用Perkin Elmer公司的ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle sequencing Ready Reaction Kit及Ampli Taq DNA polymerase在PCR仪上进行测序反应,产物纯化后在ABI PRISM377XL DNA测序仪上测序;为保证测序的可靠性和准确性,每一样品均采用双向测序。测序后进行人工核对校正。

2 结果与讨论

2.1 测序

经过PCR条件的优化,两个片段均得到了清晰的

* 中国科学院实验海洋生物学开放实验室课题资助。

收稿日期:2001-09-18;修回日期:2001-09-24

16S rDNA (GenBank accession No: AF305058)

```

1   CGCCTCTTTA   TCAAAAACAT   AGCACTGTGC   AAAATCGCAA   GATGACGTAT   ACGCTCTGAC
61  GCCTGCCCGG   TGGCGGAAGG   TTAATTGATT   GGCTTATCTT   CGGAGAAGCT   CATGATCGAA
121 GCCCCGGTAA   ACGGCGGCCG   TAACTATAAC   AGTCCTAAGG   TAGCGAAATT   CCTTGTCCGG
181 TAAGTTCCGA   CCTGCACGAA   TGGCGTAATG   ATGGCCACGC   TGTCTCCCGC   CGAGACTCAG
241 TGAAGTTGAA   ATTGCGGTGA   AGATGCCGTA   TACCGCGCGC   TAGACGGAAG   GACCCCGTGA
301 ACCTTTACTA   TAGCTTGGCA   CTGAACATTG   AACCTACATG   TGTAGGATAG   GTGGGAGACT
361 TTGAAGCTTG   GACGCTAGTC   TGAGTGGAGT   CAATCTTGAA   ATACCACCTT   TGTAGTTTTG
421 ATGTTCTAAC   TCTGGCCCCC   TATCGGGGTT   GAGGACAGTC   CCTGCTGGCT   AGTTTGACTG
481 GGGCGGTCTC   CTCCCAAAGA   GTAACGGAGG   AGCAGGAAGG   TTGGCTAAGT   ACGGTCCGAC
541 ATCGTACGGT   TAGTGCAATG   GCATAAGCCA   CCTTAAGTGC   GAGACATACA   CGTCGAACAG
601 GTACGAAAGT   AGGTCAATAG   GATCCGGTGG   TTCTGAATGG   AAGGGCCATC   CCTCAACGGA
661 TAAAGGTAC   TCCGGGGATA   ACAGGCTGAT   ACCGCCAAG   AGTTCATATC   GACGGCGGTG
721 TTTGGCACCT   CGATGTCCGC   TCATCACATC   CTGGGGCTGA   AGTCGCTCCC   AAGGGTATGG
781 CTGTTCCGCA   TTTAAAGTGG   TACGTGATCT   GAGTTCAGAC   CGG

```

COI (GenBank accession No: AF305059)

```

1   GGTCAACAAA   TCATAAAGAT   ATTGGCTCGC   TGTACTTATG   GTTTAGTTTT   ATTATGTTTC
61  TCACTGCTGG   CGCCATGGCA   ATGGTCATTC   GGGCAGAGTT   ATTCAGCCT   GGATTACAGC
121 TAGTAGAACC   TAACTTTTTT   AATCAAATGA   CCACGGTTCA   TCGTCTTATC   ATGGTATTTG
181 GCGCACTGAT   CCGCGCTTTT   ACCGGATTAG   CTAATTGGTT   AATTCCAATG   ATGATCGCTC
241 CACCAGACAT   GGCTTTACCG   CGGATGAATA   ATTGCAGCTT   TTGGATTTTA   CCGTTCGCGT
301 TTACCATATT   ACTCAGTTCG   CTATTCATGG   AAGGCGGTGG   TCCTAACTTT   GGTTCGACAT
361 TCTACGCACC   GCTATCAACC   ACTTATAGCC   CTGATAGCAC   CGCTCTATTT   GTATTGCECA
421 TCCATATCAT   GGGTATCAGC   TCGATAATGG   GCGCGATTAA   CGTTATCGTG   ACCATTGTTA
481 ACTTGGGTGC   TCCTGGCATC   ACATGCATGA   AACTGCCTTT   GTTTGTGTGG   ACTTGTTTAA
541 TTAATGCCTT   TTTATTAATT   GCGGTGATGC   CAGTGCTCGC   AGCCGCACTG   ACTATGCTGT
601 TAACCGACAA   GTTTTTCGGT   ACCAGCTTTT   TCGATACTGC   AGGTGGCGGT   GACCCAGTGA
661 TGTTCAGCA   TATTTTCTGA   TTTTTTGGTC   ACCCTGAAGT   TTA

```

图 1 魁蚶 16S rDNA 和 COI 基因片段的核苷酸序列

Fig.1 The nucleotide sequences of partial 16S rDNA and COI genes in Bloody clam *Scapharca broughtonii*

PCR 扩增产物, 从电泳凝胶上看, 16S rDNA 大小为 810 pb 左右, COI 大小为 700 pb 附近。同一样品进行正反向测序后, 将正反链进行互补配对后即可得到该扩增片段完整的核苷酸序列 (图 1), 其大小分别为 823 pb 和 703 pb (含引物), 4 种碱基含量分别为: 24.79% (A), 22.48% (C), 29.16% (G) 和 23.57% (T) (16S rDNA); 22.05% (A), 20.77% (C), 23.33% (G) 和 33.85% (T)。

进行基因 (片段) 间的比较和遗传多样性研究时, 序列分析和比较是最灵敏的手段, 它可以检测到基因 (片段) 间碱基的替换、缺失及插入, 但也存在费用较高的缺点; 本文扩增的 16S rDNA 和 COI 片段, 对测序来说显得稍长, 但比较适合做 RFLP 分析, 通过

筛选合适的内切酶, 进行 PCR/RFLP 研究。

2.2 应用前景分析

线粒体 16S rDNA 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及种类鉴别中广泛应用。Garcia Machado 等用 16S rDNA 片段检测出了两个类似种美菲对虾 (*Penaeus notialis*) 和南方白对虾 (*P. schmitti*) 之间较明显的变异。Banks 等利用 16S rDNA 基因片段的 PCR/RFLP 方法也把太平洋牡蛎 (*Crassostrea gigas*) 和 (*C. sikamea*) 这两个相近种区分开来。作者曾比较了近缘种中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 和日本绒螯蟹 (*E. japonica*) 的 COI 序列, 也发现两者差异较明显, 能较容易地区分二者。Foighil 用 COI 序列比较了葡萄

牙牡蛎 (*C. angulata*) 和太平洋牡蛎等日本牡蛎, 也证实两者各自一些单倍型有很多相似之处, 亲缘关系比较密切, 说明前者可能起源于亚洲。

喻子牛等^[1]在研究秦皇岛、大连、青岛和韩国釜山魁蚶样本时, 检测到它们的平均杂合度观察值分别为 0.087 ± 0.024 , 0.123 ± 0.038 , 0.105 ± 0.023 和 0.091 ± 0.031 。3 个中国群体之间平均遗传距离为 0.027 7, 而它们与韩国釜山群体的平均遗传距离为 0.042 8, 明显较高, 而且形态和生长率差异也很明显, 因此, 作者认为两者处于一个亚种分化过程中。Yokogawa 1997 年研究了中、日两国魁蚶的形态和遗传差异(等位基因酶), 计算得到的遗传距离达 0.108; 形态学上的比较也显示出显著差异, 认为两国魁蚶在形态和遗传上差异非常明显, 已完全达到亚种甚至种的水平。这样看来, 似乎中-韩-日间魁蚶存在随着地理距离的增大遗传分化也变大的趋势。由于等位基因酶电泳技术本身的一些局限性, 进一步的研究有赖

于更加灵敏的遗传多样性检测技术, 也是魁蚶种质资源管理、保护与合理利用的必要前提。由于养殖业的需求, 日本曾多次从我国引进苗种和成贝; 近几年来我国也从韩国引进过亲贝进行繁殖。引种将不可避免地引起不同种群的混杂, 这给种质资源的管理与保护及养殖生产带来困难。同时, 中、日、韩及俄罗斯海参崴地区的魁蚶遗传关系如何? 差异和分化达到了何种水平? 是否存在地理亚种或种的分化, 也是系统学和进化学上令人感兴趣的问题。

由于人们很难对海洋生物的行为、繁殖及迁移模式等进行直接观察, 分子标记已成为物种鉴定及野生种群分析日益重要的工具之一。由以上讨论可以期望, 16S rRNA 和 COI 会成为研究魁蚶群体遗传变异与分化及亲缘关系等相关研究很好的基因片段。

参考文献

- 1 喻子牛、孔晓瑜等。青岛海洋大学学报, 1998, 28(1): 51 ~ 58

SEQUENCING AND POTENTIAL USES OF MITOCHONDRIAL 16S rRNA AND COI GENE FRAGMENTS IN BLOOD CLAM *Scapharca broughtonii*

KONG Xiaoyu¹ JIANG Yan-yan¹ XIANG Jian-hai² YU Zi-miu¹ LIU Ya-jun¹

(¹ The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of Qingdao, 266003)

(² Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071)

Received: Sep. 18, 2001

Key Words: *Scapharca broughtonii*, 16S rDNA, COI, Sequencing

Abstract

Mitochondrial gene(16S rRNA and COI) fragments of Blood clam *Scapharca broughtonii* were amplified via PCR, the PCR products were ligated into T-vectors, cloned and sequenced. 823 bp and 703 bp nucleotide sequences of partial 16S rRNA gene and partial COI gene were obtained respectively. The contents of A, T, G and C were 24.79%, 23.57%, 29.16% and 22.48% in 16S rDNA; 22.05%, 33.85%, 23.33% and 20.77% in COI. The potential uses of these two sequences were discussed for genetic variation, differentiation and relevant research of different geographic populations in the species.

(本文编辑:刘珊珊)