

淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 基因的引物设计 and 应用^{*}

黄志坚, 徐晓鹏, 唐晶晶, 张 颢, 郑锦卿, 李桂峰, 何建国
(中山大学生命科学学院//海洋学院, 广东 广州 510275)

摘 要: 线粒体 DNA 测序已广泛应用于鉴定和区分种类以及解决系统进化关系问题。本文选取已测定的主要淡水鱼类的线粒体 DNA D-loop 基因序列进行同源性比较, 寻找保守序列, 利用简并性原则设计一对通用的简并引物。利用设计的引物对广东省珠江流域主要的淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 控制区基因进行扩增, 均能获得单一的目的 DNA 片断, 特异性扩增产物大小为 1 kb 左右。经测序及与 GenBank 同源序列的比较, 证实为包含线粒体控制区全序列的扩增产物。本研究所设计的引物和应用的方法可以快速地对多种鱼类进行大规模的遗传背景分析, 鉴定某些难于鉴别的近缘物种, 为我国鱼类的种类鉴定、地理种群鉴别及种质资源的评估提供重要的工具。

关键词: 淡水鱼类; 线粒体 DNA D-loop; 引物设计; 遗传分析

中图分类号: S917 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2009) 04-0084-05

Application and Primer Design of Mitochondrial DNA D-loop of Freshwater Fishes

HUANG Zhijian, XU Xiaopeng, TANG Jingjing, ZHANG Ju, ZHENG Jinqing, LI Guifeng, HE Jianguo
(School of Life Sciences, School of Marine Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Mitochondrial DNA (mtDNA) sequencing was widely used to identify, distinguish species and resolve phylogenetic relationships. In this studies, some published mitochondrial DNA D-loop sequences of major freshwater fishes were downloaded and made alignment. A pair of degenerate primers that targeted a portion of transfer RNA (tRNA) -pro and tRNA-phe were designed and used in a polymerase chain reaction (PCR) to amplify the control region. The primers can amplify mtDNA D-loop of 38 freshwater fishes in Zhujiang river area of Guangdong province. The size of amplification product is about 1kb. It is shown that the primers amplify a D-loop product of correct size only with the mtDNA which was extracted from the species with which the primers were designed to work. This result clearly demonstrates the efficiency and specificity of the primer pairs. The PCR fragments were all cloned and sequenced to confirm that they were indeed D-loop sequences. All mtDNA D-loop sequences were deposited in GenBank. The methods and the primers in this studies are very helpful for large-scale genetic analysis, molecular identification and phylogenetic analysis of freshwater fishes.

Key words: freshwater fish; mitochondrial DNA D-loop; primer design; genetic analysis

动物线粒体 DNA (mtDNA) 由于具有拷贝数高、相对分子质量小、无组织特异性、一级结构进化速度快等特点, 在遗传上具有自主性, 是严格的母系遗传, 已成为保护生物学和进化生物学研究一

^{*} 收稿日期: 2008-10-21

基金项目: 广东省科技计划资助项目 (2005A20105001, 2006A2060349, 2006B20701002); 广东省海洋与渔业局科技兴渔项目 (B200601G02)

作者简介: 黄志坚 (1970 年生), 男, 博士; 通讯作者: 何建国; E-mail: lsshjg@mail.sysu.edu.cn

个强有力的工具^[1]。线粒体基因组由 37 个编码基因及一段主要的非编码区(控制区)组成,不同序列区域的进化速率不同。位于编码脯氨酸 Pro-tRNA 和苯丙氨酸 Phe-tRNA 基因之间的区域是 mtDNA 上主要的非编码区,又称为控制区(control region)或 D-loop 区。一般认为, D-loop 区是线粒体基因组上进化最快的部分,它的变异速率约为 mtDNA 完整分子或 mtDNA 分子上其它区域的 5~10 倍^[2],适于亲缘关系较近的群体间的比较研究,是进行鱼类群体遗传结构揭示、濒危物种的遗传多样性程度鉴定等研究方面的重要遗传标记。目前运用 mtDNA D-loop 进行鱼类遗传分析大多是针对每一种鱼类设计一对对应的引物,不能适应鱼类种质资源大规模的调查和大规模样品的分析。本研究设计的鱼类线粒体 DNA 控制区扩增引物可以快速地对多种鱼类进行大规模的遗传背景分析,准确鉴定某些难于鉴别的近缘物种,为我国鱼类的种类鉴定、地理种群鉴别及种质资源的评估提供重要的工具。

1 材料和方法

1.1 样品采集、来源

鱼类样品来源于广东省珠江流域主要江段,取肌肉、鳍条等组织保存于 $\varphi=90\%$ 酒精或液氮中。

1.2 基因组 DNA 提取和鉴定

参考文献^[3]采用 E. Z. N. A.[®]试剂盒(Omega)提取基因组 DNA。提取的基因组 DNA 在 Amersham Biosciences 紫外分光光度计上测定 OD260 nm 和 OD280 nm 的光吸收值以及 DNA 的质量浓度。凝胶电泳检测 DNA 纯度,紫外检测仪下观察并用 Alphamager™ IS-2200 (Alpha Innotech)凝胶成像系统拍照。

1.3 引物设计方法和原则

登陆 GenBank 搜索目前已测定线粒体 DNA 全序列的 161 种鱼类的线粒体控制区(D-loop)基因^[4],去掉不完全和部分的序列,主要选取淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 基因序列进行同源性比较,寻找保守序列。采用 Primer Premier 5 引物设计软件,利用简并性原则,获得一对通用的简并引物(MitDI-F 和 MitDI-R)^[5],扩增片段大小在 1 kb 左右。

1.4 PCR 扩增

1.4.1 PCR 扩增目的片段 将提取的基因组 DNA 用于 PCR 扩增。PCR 反应体系为 28 μL ,内含 dNTP (1 mmol/L)、buffer (10 $\times$)、10 $\mu\text{mol/L}$ 的引物 1 和引物 2、Taq 酶 (5 U/ μL)、含 50~150 ng 的 DNA 模板溶液。扩增条件为:92 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5

min,然后 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,共 33 个循环,最后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 充分延伸 10 min。扩增产物用 $w=1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测其大小、纯度及亮度。

1.4.2 分子克隆和测序 PCR 扩增产物经 $w=1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳检测后,采用 Omega 公司的 E. Z. N. A.[®] Gel Extraction Kit 进行割胶纯化。胶回收纯化的 PCR 扩增产物在连接酶的作用下与 pMD19-T vector 载体 (Takara) 进行连接反应。同时选用大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 采用 CaCl_2 法制备新鲜感受态细胞,热激法进行转化,用蓝白斑显色筛选阳性克隆,并应用菌落 PCR 扩增以确证真正的阳性克隆。阳性克隆经扩大培养后的菌液或提取质粒后委托公司进行双向直接测序。测序引物为扩增引物 MitDI-F (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 MitDI-R (10 $\mu\text{mol/L}$)。序列分析仪为 ABI3730 型全自动 DNA 测序仪。

1.5 应用

通过调查和采集广东省珠江流域的主要淡水鱼类,选取有代表性的重要经济鱼类和野生鱼类提取基因组 DNA,PCR 扩增 mtDNA D-loop,进行分子克隆和测序,验证和比对序列并提交 GenBank 数据库。

2 结果

2.1 基因组 DNA

提取的基因组 DNA 用琼脂糖凝胶电泳检测,DNA 条带清晰明亮、完全、整齐,纯度较高,无降解,无杂质,没有拖带现象产生(见图 1)。提取的基因组 DNA 可用于进一步的分子生物学研究。

2.2 PCR 扩增结果

以提取的基因组 DNA 为模板,PCR 扩增主要淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 控制区基因,均能获得单一的目的 DNA 片段,目的条带清晰、明亮,特异性扩增产物大小为 1 kb 左右。经测序及与 GenBank 上同源序列的比较,证实为包含线粒体控制区全序列的扩增产物。因此设计的一对简并引物能针对多数淡水鱼类,扩增理想的目的片段,具有较好的效果,可进行鱼类种类鉴定和分析。主要扩增的淡水鱼类包括以下 38 种:线纹尖塘鳢、云斑尖塘鳢、厚颌鲂、餐条、方正银鲫、叉尾斗鱼、金鲫、鲫鱼、海南拟餐、鲤鱼、鳊鱼、鲢鱼、似鲃、小鰾、银鲃、瓦氏黄颡鱼、马口鱼、长脂拟鲮、福建纹胸鮡、大鳍鮡、鲃吻鮡、乌鲢、伍氏华吸鳅、东陂拟腹吸鳅、方氏拟腹吸鳅、贵州细尾爬岩鳅、平舟原缨口鳅、横纹南鳅、桂林薄鳅、美丽沙鳅、

壮体沙鳅、美丽小条鳅、中华花鳅、泥鳅、奥尼罗非鱼、罗非鱼、中国花鲈、圆尾拟鲮等。其电泳图谱如图 2 所示。

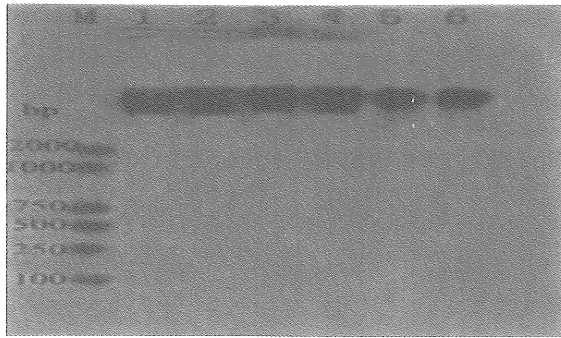


图 1 提取的基因组 DNA 凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of extracted genomic DNA

1-6: 分别为线纹尖塘鳢、云斑尖塘鳢、鲫鱼、鲤鱼、东陂拟腹吸鳅、贵州细尾爬岩鳅等鱼类样品;

M: DNA 相对分子质量标准 DL-2000

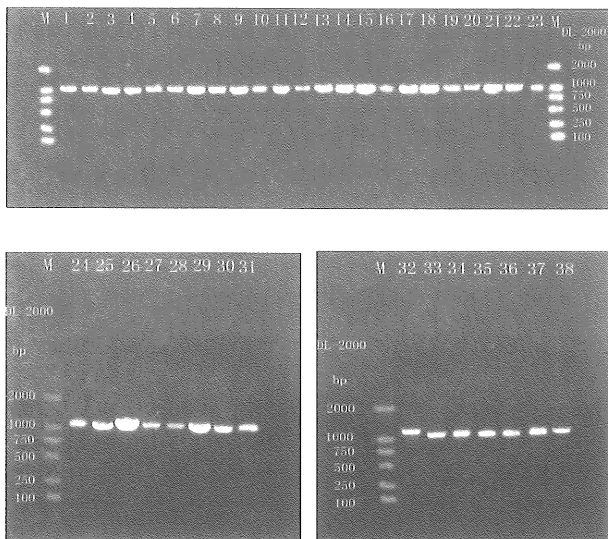


图 2 部分淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 基因
PCR 扩增电泳图谱

Fig. 2 PCR amplification of mitochondrial DNA
D-loop of some freshwater fishes

1-38: 分别为线纹尖塘鳢、云斑尖塘鳢、厚颌鲂、餐条、方正银鲫、叉尾斗鱼、金鲫、鲫鱼、海南拟鲮、鲤鱼、鳊鱼、似鲃、小鳊、银鲃、瓦氏黄颡鱼、马口鱼、长脂拟鲮、福建纹胸鳅、大鳍鱮、鲃吻鲃、乌鲢、伍氏华吸鳅、东陂拟腹吸鳅、方氏拟腹吸鳅、贵州细尾爬岩鳅、平舟原缨口鳅、横纹南鳅、桂林薄鳅、美丽沙鳅、壮体沙鳅、美丽小条鳅、中华花鳅、泥鳅、奥尼罗非鱼、罗非鱼、中国花鲈、圆尾拟鲮样品; M: DNA 相对分子质量标准 DL-2000

2.3 GenBank 序列号

所有测定的序列均提交 GenBank 数据库 (序列号见表 1)。

3 讨 论

目前,有许多分子标记方法和技术应用于鱼类研究中,这些技术主要包括随机扩增的多态性 DNA (RAPD)、限制性片段长度多态性 (RFLP)、DNA 指纹标记 (DFP)、PCR 扩增子长度多态性 (ALP)、微卫星 DNA、同功酶、扩增片段长度多态性 (AFLP)、线粒体 DNA (mtDNA) 测序等^[6-9]。动物线粒体 DNA 多态性分析是保护生物学和进化生物学研究的一个强有力的工具。mtDNA 作为分子标记的广泛应用,使得系统进化、生物地理、群体遗传、人类学及法医鉴定等领域的研究得到前所未有的发展。线粒体 DNA 由于具有进化速度快、母系遗传和分子简单易于分析等特点而成为研究近缘种间和种内群体间遗传分化的有力工具,广泛应用于水产养殖和渔业的遗传学研究^[10-11]。线粒体 DNA 序列非常适合阐明种间差异,有利于解决淡水鱼类分类中易混淆和有争议的问题。线粒体 DNA D-loop 是整个 mtDNA 序列和长度变异最大的区域,是 mtDNA 变化最复杂,被了解最少,也最吸引人的区域。由于是线粒体基因组上进化最快的部分,mtDNA D-loop 序列适合阐明亲缘关系十分接近的种类的相互关系。mtDNA D-loop 序列分析方法在鱼类遗传和资源保护中应用较广泛^[12-19],但在进行遗传背景研究时,大多针对一种鱼类设计一对引物进行基因扩增,有一定局限性,不适合大规模的鱼类遗传背景研究和分析。在鱼类资源标本采集过程中,多数是野生鱼类,鱼类在幼鱼等阶段,由于个体小,形态相似,有些种类很难在形态上加以区分,需要借助分子生物学的技术和方法来鉴定和印证。本研究利用设计的一对简并引物,能有效扩增 38 种主要淡水鱼类 mtDNA D-loop,扩增目的片段为 1 kb 左右,测序并进行同源序列比对,证实为包含线粒体控制区全序列的扩增产物,能有效鉴定鱼类种类。因此,本研究将为主要淡水鱼类大规模遗传分析和种类鉴定提供重要的工具和手段,同时也证明了 mtDNA D-loop 是进行遗传分析的良好分子标记。

表 1 已测序鱼类 mtDNA D-loop 递交 GenBank 序列号
Table 1 Accession number of freshwater fish mtDNA D-loop sequence

编号	鱼类名称	Species	Accession Numbers
1	线纹尖塘鳢	<i>Oxyeleotris lineolatus</i> X10	EU177615
2	云斑尖塘鳢	<i>Oxyeleotris marmorata</i> isolate Y1 D-loop	EU177621
3	厚颌鲂	<i>Megalobrama pellegrini</i> mitochondrial DNA D-loop MP8	EU697089
4	餐条	<i>Hemiculter leucisculus</i> mitochondrial DNA D-loop isolate 4	EU697092
5	方正银鲫	<i>Carassius auratus</i> gibelio mitochondrial DNA D-loop H2	EU697096
6	叉尾斗鱼	<i>Macropodus opercularis</i> mitochondrial DNA D-loop S2	EU697093
7	金鲫	<i>Gold Crucian Carp</i> mitochondrial DNA D-loop DG18 - 1	EU697145
8	鲫鱼	<i>Carassius auratus</i> mitochondrial DNA D-loop YC34 - 1 - 1	EU697109
9	海南拟鲮	<i>Pseudohemiculter Hainanensis</i> mitochondrial DNA D-loop PH3	EU697147
10	鲤鱼	<i>Cyprinus carpio</i> mitochondrial DNA D-loop C13	EU697111
11	鳙鱼	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i> mitochondrial DNA D-loop Y25 - 2 - 2	EU697130
12	鲢鱼	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i> mitochondrial DNA D-loop YC36 - 3 - 1	EU697115
13	似鲃	<i>Pseudogobio vaillanti</i> mitochondrial DNA D-loop PV5	EU697126
14	小鯮	<i>Sarcocheilichys parvus</i> mitochondrial DNA D-loop SP13 - 2	EU697143
15	银鲃	<i>Squalidus argentatus</i> mitochondrial DNA D-loop SA26 - 1	EU697146
16	瓦氏黄颡鱼	<i>Pelteobagrus vachellii</i> D-loop	EU697128
17	马口鱼	<i>Opsariichthys bidens</i> mitochondrial DNA D-loop d5	EU697120
18	长脂拟鲮	<i>Pseudobagrus adiposalis</i> mitochondrial DNA D-loop PA4	EU697137
19	福建纹胸鮡	<i>Glyptothorax fokiensis</i> mitochondrial DNA D-loop GF7	EU697088
20	大鳍鱮	<i>Mystus macropterus</i> mitochondrial DNA D-loop MM2	EU697135
21	鲃吻鲃	<i>Leiocassis crassirostris</i> Regan mitochondrial DNA D-loop LC6	EU697148
22	乌鳢	<i>Channa argus</i> mitochondrial DNA D-loop YD11 - 2 - 3	EU697129
23	伍氏华吸鳅	<i>Sinogastromyzon wui</i> Fang - 10. Mit D-loop	EU380231
24	东陂拟腹吸鳅	<i>Pseudogastromyzon changtingensis tungpeiensis</i> - 1. MitD-loop	EU380223
25	方氏拟腹吸鳅	<i>Pseudogastromyzon fangi</i> mitochondrial DNA D-loop PF7	EU697136
26	贵州细尾爬岩鳅	<i>Beaufortia kweichowensis gracilicauda</i> Chen et Zheng - 15 - 1 D-loop (6)	EU380208
27	平舟原缨口鳅	<i>Vanmanenia pingchowensis</i> (Fang) - 5. MitD-loop	EU380235
28	横纹南鳅	<i>Schistura fasciolata</i> 8. mitD-loop	EU380229
29	桂林薄鳅	<i>Leptobotia guiiinensis</i> Chen - 17. MitD-loop	EU380215
30	美丽沙鳅	<i>Botia pulchra</i> Wu - 12. MitD-loop	EU380213
31	壮体沙鳅	<i>Botia robusta</i> Wu - 6. mitD-loop	EU380209
32	美丽小条鳅	<i>Micronoemacheilus pulcher</i> (Nichols et Pope) - 9 - 1 D-loop	EU380211
33	中华花鳅	<i>Cobitis sinensis</i> - 29-MitD-loop	EU380210
34	泥鳅	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i> S4. D-loop	EU380222
35	奥尼罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i> mitochondrial DNA D-loop HZ1 - 3	EU697118
36	莫桑比克罗非鱼	<i>Oreochromis mossambicus</i> mitochondrial DNA D-loop DG19 - 1	EU697117
37	中国花鲈	<i>Lateolabrax maculatus</i> mitochondrial DNA D-loop LM7	EU697133
38	圆尾拟鲮	<i>Pseudobagrus tenuis</i> mitochondrial DNA D-loop PT13	EU697132

参考文献:

- [1] BROWN W M. Evolution of animal mitochondrial DNA [M]// NEI M, ROEHN R K. Evolution of Gene and Proteins. Sunderland: Sinauer, 1983: 62 - 88.
- [2] BROWN W M. The mitochondrial genome of animals [M]// MACLENTYRE R J. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Plenum Press, 1985: 95 - 130.
- [3] 黄志坚, 张颢, 唐晶晶, 等. 线纹尖塘鳢和云斑尖塘鳢基因组 DNA 和线粒体 DNA 不同提取方法的比较 [J]. 华南农业大学学报, 2007, 28: 103 - 106.
HUANG Zhijian, ZHANG Ju, TANG Jingjing, et al. Extraction of genomic DNA and mitochondrial DNA of *Oxyeleotris lineolatus* and *Oxyeleotris marmorata* [J]. Journal of South China Agriculture University, 2007, 28: 103 - 106.
- [4] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展 [J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 983 - 1000.
GUO Xinhong, LIU Shaojun, LIU Qiao, et al. New progress on mitochondrial DNA in fishes [J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 31: 983 - 1000.
- [5] 黄志坚, 徐晓鹏, 唐晶晶, 等. 鱼类线粒体 DNA 控制区扩增引物及其设计方法和应用: 中国, 200710028242.1 [P]. 2007 - 05 - 25.
HUANG Zhijian, XU Xiaopeng, TANG Jingjing, et al. Primer design and application of fish mitochondrial DNA D-loop region: China, 200710028242 [P]. 2007 - 05 - 25.
- [6] WILLIAMS J G, KUBELIK A R, LIVAK K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl Acids Res, 1990, 18: 6531 - 6535.
- [7] WELSH J, PETERSEN C, MCCLELLAND M. Polymorphisms generated by arbitrarily primed PCR in the mouse: application to strain identification and genetic [J]. Nucl Acids Res, 1991, 19: 303 - 306.
- [8] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKE A, LABUDA D. Genome finger printing by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genome, 1994, 20: 178 - 183.
- [9] ZABEAU M, VOS P. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application: Holland, 0534858A1 [P]. 1993.
- [10] WARD R D, GREWE P M. Appraisal of mitochondrial genetic techniques in fisheries [M]// PITCHER T J. Molecular Genetic in Fisheries. UK: Chapman & Hall, 1994: 29 - 54.
- [11] AVISE J C. Phylogeography the history and formation of species [M]. USA: Harvard University Press, 2000: 447.
- [12] LEE W J, CONROY J, HOWELL W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions [J]. J Mol Evol, 1995, 41: 54 - 66.
- [13] LOCKHART P J, PENNY D, MEYER A. Testing the phylogeny of swordtail fishes using decomposition and spectral analysis [J]. J Mol Evol, 1995, 41: 666 - 674.
- [14] TAKAHASHI K, NISHIDA M, YAMA M, et al. Retro-position of the AFC family of SINES (short interspersed repetitive elements) before and during the adaptive radiation of cichlid fishes in Lake Malawi and related inferences about phylogeny [J]. J Mol Evol, 2001, 53(4/5): 496 - 507.
- [15] KITAGAWA T, WATANABE M, KOBAYASHI T, et al. Two genetically divergent groups in the Japanese spined loach, *Cobitis takatsuensis*, and their phylogenetic relationships among Japanese *Cobitis* inferred from mitochondrial DNA analysis [J]. Zool Sci, 2001, 18: 249 - 259.
- [16] MIYAKE K, TACHIDA H, OSHIMA Y, et al. Genetic variation of the cytochrome b gene in the resy bitterling, *Rhodeus ocellatus* (Cyprinidae) in Japan [J]. Ichthyol Res, 2001, 48: 105 - 110.
- [17] OKAZAKI T, JEON S R, KITAGAWA T. Genetic differentiation of piscivorous chub (genus *Opsarichthys*) in Japan, Korea and Russia [J]. Zool Sci, 2002, 19: 601 - 610.
- [18] TAKEHANA Y, UCHIYAMA S, MATSUDA M, et al. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in wild population of medaka (*Oryzias latipes*) from Korea and China [J]. Zool Sci, 2004, 21: 483 - 491.
- [19] YAMAMOTO S, MORITA K, KITANO S, et al. Phylogeography of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) inferred from mitochondrial DNA sequence [J]. Zool Sci, 2004, 21: 229 - 240.