

文章编号: 0529-6579 (1999) 01-0012-15

孑遗动物新疆北鲵的分子特征及其 进化生物学研究 (I)^{*}

屈良鹄¹, 王秀玲², 陈月琴¹, 王 宁¹, 周 惠¹

(¹中山大学生物工程研究中心, 广州 510275; ²新疆师范大学生物系)

摘 要: 通过对孑遗两栖动物新疆北鲵 (*Ranodon sibiricus*) 核糖体 18S rRNA 基因全序列的测定与分析, 从基因水平揭示北鲵的特征, 为进一步探讨孑遗动物的发生及其演化的分子机制研究奠定了基础. 首次对新疆北鲵核糖体 18S rRNA 基因进行报道.

关键词: 新疆北鲵 *Ranodon sibiricus* 分子特征, rDNA

分类号: Q 959.52, Q 751 **文献标识码:** A

新疆北鲵 (*Ranodon sibiricus*), 一种仅分布于中国西部阿拉套山和天山西部的世界珍稀动物, 自从 1866 年被俄国科学家偶然发现后, 100 多年以来我国再未发现. 该种隶属两栖纲有尾目隐鳃鲵亚目小鲵科的北鲵属, 是延续了 1 个世纪的单属种, 在小鲵科的分类、系统演化等方面有重要学术研究价值, 已被列入国际保护自然和自然资源联合会红皮书. 由于标本的缺乏, 国内有关新疆北鲵基础理论研究几乎为空白. 1989 年, 我国科学工作者王秀玲等^[1]于新疆温泉县发现了新疆北鲵的栖息地, 并采集到活标本. 这一发现引起了动物学家们的极大兴趣和关注. 从对新疆北鲵染色体组型的初步研究结果来看, 该种为两栖类小鲵科中原始的类群^[2]. 因此, 开展北鲵的分子生物学研究, 将能揭示北鲵的遗传特征, 进一步从分子水平探讨孑遗动物的发生及其演化过程. 本研究首次对新疆北鲵核糖体 18S rRNA 基因进行报道.

1 材料与方法

1.1 材 料

新疆北鲵于 1990 年采自新疆温泉县, 取酒精浸泡的肝脏组织进行 DNA 提取.

1.2 总 DNA 的制备及 18S rDNA 的 PCR 扩增

取 1 g 酒精浸泡的肝脏组织, 采用 CTAB 法^[3]提取总 DNA. 所得到的总 DNA 原液经简单稀释后, 直接用于目的片断的 PCR 扩增. 18S rDNA PCR 引物为: 18N1: 5' GGATCA

* 基金项目: 国家自然科学基金 (39560015); 国家杰出青年基金 (39525007); 华南生物科学与技术研究中心基金

收稿日期: 1998-10-15 第一作者简介: 屈良鹄, 男, 45 岁, 教授

GAATTCTATCTGGTTGATCCTGCCAG 3', 18N11R: 5' CTCAGTAAGCTTGATCCTTCCGCAGG TTCACC 3', 分别对应于 18S rDNA 5' 末端和 18S rDNA 3' 末端的一段保守序列. rDNA ITS 区扩增引物为 LH2: 5' GTCGAATTGCTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCA 3', D1a: 5' TTCCCTGT TCACTCGCCGTTACT 3', 分别对应于 18S rDNA 3' 末端和 26S rDNA 5' 端的保守序列. PCR 反应程序为: 94 °C 2 min, 然后 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环. 扩增完成后, 取 2 μ L 于 ρ 为 1% 的琼脂糖凝胶上电泳检查, 其余 -20 °C 保存备用.

1.3 18S rDNA 的序列测定与分析

PCR 扩增产物经 DNA 纯化系统纯化 (NaI, 玻璃粉, 中山大学真核生物分子生物学实验室制备), 377 型自动测序仪 (ABI PRISM) 进行序列测定. 测序引物分别为: 18N1, 18N5: 5' TGGTGCCAGCAGCCGCGTA 3', 18N7R: 5' TCCGTCAATTCCTTTAAGTT 3', 18N11R.

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增与序列分析结果

北鲈 18S rRNA 基因和 rDNA ITS 区 PCR 扩增结果见图 1. 18S rRNA 基因和 ITS 区全长基本一致, 为 1 900 碱基对. 18S rRNA 基因的 PCR 扩增产物经 DPS 纯化系统纯化后, 直接于自动测序仪进行序列测定. 共测得 1 912 碱基对核苷酸序列. 序列中除 1 个位点 G 或 C 外, 所有核苷酸峰值清晰可辨.

将所测得序列输入国际分子生物学数据库, 以 Blast 程序进行比较分析, 发现该序列与鱼类中总鳍亚纲的矛尾鱼 (*Latimeria chalumnae*) 同源性非常高. 我们对国际分子生物学数据库进行检索, 并通过 Internet 从国际分子生物学数据库 (Genbank) 中获取 *Latimeria chalumnae* 及两栖类 3 个代表种即非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、*Hyla cinerea* 及鳗螈 (*Siren intermedia*) 的 18S rRNA 基因序列, 前两者为两栖类无尾目的代表; 鳗螈为有尾目的代表, 也是数据库中有尾目唯一的 18S rRNA 基因序列. 采用 PC gene 6.0 和 Phylip 3.5 计算机分析软件包对所获得的序列进行比较. 序列中引入适量的空格, 以便达到最大的同源性 (序列比较图略). 序列比较结果表明, 北鲈与矛尾鱼、非洲爪蟾的同源性基本一致, 序列间核苷酸相似值高达 96% ~ 97%. 相对来说, 与鳗螈科的 *Siren intermedia* 和雨蛙科的 *Hyla cinerea* 同源性略低.

2.2 新疆北鲈原始性与特殊性的分子特征

组织学与细胞学研究结果表明^[2,4], 新疆北鲈肺结构简单, 为一对长卵圆形薄壁囊, 仅基部具有为数不多的肺泡; 皮肤出现丰富的粘液腺及颗粒腺. 染色体数目多、核型不对称等原始特征. 这些特征说明了新疆北鲈仍脱离不了对水及湿地的依赖. 我们对新疆北鲈核糖体基因的研究也支持该种类的原始性. 从序列比较结果来看, 新疆北鲈 18S rRNA 基因与鱼类中总鳍亚纲的矛尾鱼 *Latimeria chalumnae* 的相似性可达 97%. 矛尾鱼为一古老的



图 1 新疆北鲈 18S rDNA 及 ITS 区 PCR 扩增结果

Fig. 1 18S rDNA and ITS PCR amplification of *Ranodon sibiricus*
0 空白对照; M 2 kb marker;
1 18S rDNA; 2 rDNA ITS; 3 frog rDNA ITS

TATCTGTTG ATCCTGCCAG TAGCATATGC TTGTCTCAA A GATTAAGCCA TGCACGTGTA	60
AGTACACACG GCCGGTACAG TGAAACTGCG AATGGCTCAT TAAATCACTT ATGTTCTCTT	120
TGATCGCTCC ATCTGTTACT TGGATAACTG TGGTAATTCT AGAGCTAATA CATGCCGACG	180
AGCGCTGACC TCCCGGGATG CGTGCATTTA TCAGACCAAA ACCAATCCGG GTCCGCCCGG	240
CCGCTTTGT GACTCTAGGA ATACGGGGCC GATCGCACCT CCCCGTGACG GGGACAATAC	300
ATTCGGATGT CTGCCATAT CCACTTTCGA TGTCACTCTC TGTGCTTACC ATGGTGACCA	360
CGGGTAACGG GGATTCAGGG TTCGATTCC GAGAGGAGCC TGAGAAACGG CTAACACATC	420
CAAGGAAGGC AGCGGGCGCG CAAATAACCC ATTCCCGACT CGGGGAGGTA GTGACGAAAA	480
ATAACAATAC AGGATTCTTT TCGAGGCCCT GTAATTGGA TGAGAACACT TTAAATCCTT	540
TAACGAGGAC CCATTGGAGG GCAAGTCTGG TGCCAGCAGC CGCCCTGTAA TTGGAATGAG	600
AACACTTTAA ATCCTTTAA C GAGGACCCAT TGGAGGGCAA GTCTGGTGCC AGCAGCCCGC	660
GTAATTCCAG CTCCAATAG C GTATATTA A GTTGCTGCAG TTAAAAAGTT CGTAGTTGGA	720
TCTTGGGATC GAGCTGGCGG TCCGCCGCGA GGCGAGATAC CGCCTGTCCC AGCCCTGCC	780
TCTCGGCGCC CCCTTGATGC TCTTGACTGA GTGTCCTGGG GGTCCGAAGC GTTTACTTTG	840
AAAAAATTAG AGTGTTCAAA GCAGGCCCGT CGCGTGAATA CTTCAGCTAG GAATAATGGA	920
ATAGGACTCC GGTTCATATT TGTGGTTTT CGGAAGTGGG GCCATGATTA AGAGGGACGG	980
CCGGGGGCAT TCGTATTGTG CCGCTAGAGG TGAATTATT GGACCGGCGC AAGACGAACC	1 040
AAAGCGAAAG CATTGCTCAA GAATGTTTTT ATTAATCAAG AACGAAAGTC GGAGGTTCTA	1 100
AGACGATCAG ATACCGTCGT AGTTCCGACC ATAAAACGAT GCGGACTAGC GATCCGCGG	1 160
CGTTATTTCC ATGACCCGCG GAGCAGTTCC GGGAAACCAA AGTTTTTGGT TCCGGGGGGA	1 220
GTATGGTTGC AAAGCTGAAA CTTAAAGGAA TTGACGGAAG GGCACCACCA GGAAGTGAGC	1 280
CTGCGGCTTA ATTTGATTTA ACACGGGAAA CTTACCCCGG CCGGACACG GAAAGGATTG	1 340
ACAGATTGAT AGCTCTTTCT CGATTCTGTG GGTGGTGGTG CATGCCGTT CTTAGTTGGT	1 400
GGAGCGATTT GTCTGGTTAA TTCCGATAAC GAAGGAGACT CCTCCATGCT AACTAGTTAC	1 460
GCGACCCCA GTGGTCGGCG TCCAATTTCT TAGAGGGACA AGTGGCGTTC AGCCACACGA	15 20
GATCGAGCAA TAACAGGTCT GTGATGCCCT TAGATGTCCG GGGCTGCACG CCGGTA CACT	1 580
GAACGGATCA GCGTGTGTAT ACCCTTCGCC GACAGGTGCG GGTAAACCGC TGAACCCCGT	1 640
TCTGTATAGC GATTGGGGAT AGCTTTTATT TCCGGTGGAC GAGGAATTCC CATTATTTCC	1 700
CATGAACGAG GAATTTCCAG TAAGTCGGG TCATAAGCTC GCGTTGATTA AGTCCGTGCC	1 760
CTTTGTACAC ACCGCCCCTC GTTATTACCG ATTGGATGGT TTAGTGAGGT CGTAGGATCG	1 820
GCCCCCGCG GTTCGGAAC GGCCTTCGCG GAGCCCGAG GAGACGATCA AACTTGACTA	1 880
TGTAGAGGAA AAAAAAGTCG TAACAGTTT C C	1 912

图 2 新疆北鲢 18S rDNA 全序列

Fig 2 18S rDNA sequence of *Ranodon sibiricus*

鱼类，最早出现于泥盆纪的淡水中，是动物界珍贵的“活化石”。有资料表明，矛尾鱼代表的总鳍鱼类是两栖类的直接祖先^[5]，近几年 DNA 水平的研究也证明了矛尾鱼类与两栖动物和其它陆生动物的亲缘关系^[6-7]。新疆北鲢的核糖体基因与矛尾鱼有高度的同源性，这是否意味着新疆北鲢是两栖类中最原始的代表？至少，从两者核苷酸的变化情况及 18S rRNA 基因的变化规律可以推断，新疆北鲢与矛尾鱼分歧的年代并不久远。因此，进一步开展新疆北鲢及相关类群的分子系统学研究，将有可能为两栖类的起源与演化提供新的线索。另外，值得注意的是，新疆北鲢 rDNA ITS 区长度特异性。根据已有的研究，两栖类及其它动物类群，ITS 区长度一般不大于 1 200 碱基对^[8]，但是从北鲢 rDNA ITS 扩增结果来看（图 1），该种类 ITS 区约 1 900 碱基对，比已知两栖类的 ITS 长几百个核苷酸。北鲢 ITS 所表现出的这一特殊性是否包含着其独特的生物学信息？

2.3 结 语

由于标本的缺乏，有关新疆北鲢基础理论研究目前仅有少量的研究。本文首次对新疆北鲢核糖体基因进行了报道。以期通过对北鲢基因水平的研究，探讨子遗动物的发生及其演化的分子机制。有关其分子特征及进化生物学研究将给予进一步的报道。

参考文献:

- [1] 王秀玲, 杜春华, 吴敏, 等. 一种珍稀动物—新疆北鲈研究初报. 动物学研究, 1990, 11 (2): 120
- [2] 王秀玲, 吴敏. 新疆北鲈染色体组型的初步观察. 动物学杂志, 1996, 31 (6): 16~18
- [3] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues. Phytochem Bull, 1987, 19: 11~15
- [4] 王秀玲, 吴敏. 新疆北鲈的形态学研究探讨. 见: 全国两栖爬行动物学术研讨会第四届年会大论文集, 1995, 7
- [5] FRITZSCH B. Inner ear of the coelacanth fish *Latimeria* has tetrapod affinities. Nature, 1987, 327: 153~154
- [6] GORR T, KLEINSCHMIDT T, FRICKE H. Close tetrapod relationships of the coelacanth *Latimeria* indicated by haemoglobin sequences. Nature, 1991, 351: 394~397
- [7] ZARDOPYA R, MEYER A. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of a “living fossil”, the coelacanth (*Latimeria chalumnae*). Genetics, 1997, 146: 995~1010
- [8] FURLONG J C, MADEN B E H. Patterns of major divergence between the internal transcribed spacers of ribosomal DNA in *Xenopus borealis* and *Xenopus laevis*, and of minimal divergence within ribosomal coding regions. EMBO, 1983, 2 (3): 443~448

Molecular Characteristics and Evolutionary Biology of Relic *Ranodon sibiricus* (Amphibia) (I)

QU Lianghu^{*}, WANG Xiuling, CHEN Yueqin, WANG Ning, ZHOU Hui

Abstract: The nuclear ribosomal DNA (18S rDNA and ITS) were amplified and sequenced from a relic amphibia *Ranodon sibiricus*. By comparison of sequence from Genbank database through Internet. It was surprisingly found that the 18S rDNA of *Ranodon sibiricus* had quite high sequence similarity with that of “living fossil” fish, the coelacanth (*Latimeria chalumnae*), which suggests the ancient origin of *Ranodon sibiricus*. In addition, the characteristic size of rDNA ITS (about 1 900 bp) in *Ranodon sibiricus*, which was 500 bp longer than that of most amphibians, indicates the specificity of this species. The molecular characteristics and evolutionary biology of relic *Ranodon sibiricus* need to be further studied.

Keywords: *Ranodon sibiricus*, molecular characteristics, rDNA

^{*} Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China