

中华假磷虾线粒体 DNA CO I 基因 片段序列分析

林元烧, 曹文清, 方旅平, 刘茜茜, 李少菁

(厦门大学海洋学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 采用苯酚-氯仿提取、异丙醇沉淀提取中华假磷虾基因组 DNA; 以相应引物经 PCR 扩增得到线粒体 DNA COI 片段; PCR 产物采用化学法与载体 (pGEM-T Easy Vector) 重组基因、热休克法转化重组质粒至感受态大肠杆菌 (JM109)、氨苄 LB 培养基扩大培养; 测序. 结果表明, 中华假磷虾线粒体 CO I 碱基 709bp, 其碱基组成 A、T、G、C 含量分别为 28.59%、35.35%、17.61% 和 18.45% (国际基因库索引号 AY754819); 与同科内其它 3 属 10 种磷虾的 mtCO I 基因片段核苷酸组成相似.

关键词: 中华假磷虾; 线粒体 DNA; mtCO I; 厦门

中图分类号: Q 344

文献标识码: A

中华假磷虾 (*Pseudeuphausia sinica* Wang et Chen) 属于海洋浮游高等甲壳动物中的磷虾目磷虾科假磷虾属, 是暖温性沿岸种, 主要分布于我国东海和南黄海的近岸低盐水域. 向北, 在北黄海未见分布; 向南, 可以分布到台湾海峡, 冬季的几个月份在粤东沿岸一带有少量出现, 一般不出现在南海^[1]. 中华假磷虾蛋白质含量很高, 是许多中上层鱼类、特别是幼鱼的重要饵料, 具有较高的营养价值和经济价值. 此外, 中华假磷虾的分布与水团、海流有关, 因此它在探讨海流和水团的来龙去脉等海洋学研究领域也具有重要意义.

线粒体 DNA 中的一些基因如 CO I 和 16S rRNA 等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发生和遗传进化研究领域及疑难种类或地理种群鉴别中常作为分子标记而得以广泛应用. Jarman et al. (2000) 对全球分布的 9 种磷虾进行了分子系统发生学研究以来^[2], 迄今尚无关于磷虾类线粒体 DNA 序列研究的报道. 中华假磷虾定名^[1]以来, 有关中华假磷虾的生物学

研究, 国内已有研究报道, 曾见于幼体形态描述^[3]及生化组成分析^[4], 生态能学研究^[5], 而种群遗传学方面的研究则乏人问津. 本文对厦门港中华假磷虾线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I 亚基因 (mtCO I) 片段序列进行分析, 以期中华假磷虾的种群遗传学研究的进一步开展、物种间的亲缘关系和系统进化及种质资源管理与保护等提供资料.

1 材料与方法

1.1 材料来源

中华假磷虾于 2002 年 5 月 2 日 7:00~8:30 pm 采自厦门港. 用大型浮游生物网水平拖网约 10 min, 将收集于底管中的动物稀释于约 10 000 mL 的现场自然海水中. 水平拖网一般重复 5 次. 动物带回实验室后, 立即分离、挑取中华假磷虾, 镜下确认种类后, 将活泼游动、无寄生虫的实验动物用吸管转移至盛有 200 mL 过滤海水 (海水取自厦门大学海滨, 经砂滤, 黑暗环境中沉淀 1 d) 的结晶皿中暂养过夜. 暂养期间不间断微弱充气.

取出暂养后的动物, 经蒸馏水洗涤 2~3 次后, 去除体表多余水分, 固定于纯酒精中, 24 h 后用纯酒精更换等量固定液. 样品保存于 4℃ 环境中.

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

收稿日期: 2003-10-28

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目 (973) (G1990437-08) 资助

作者简介: 林元烧 (1953-), 男, 教授.

E-mail: yslin@xmu.edu.cn

将中华假磷虾去头后置入 1.5 mL Eppendorf 微管中,尽量捣碎.依次经提取缓冲液处理、酚-氯仿抽提 2~3 次、异丙醇沉淀,70%乙醇洗涤,TE 溶液溶解后,保存于 -20℃ 环境中.

1.2.2 目的基因片段的 PCR 扩增及检测

PCR 反应体系总体积为 25 μ L,其中含:DNA 模板 40 ng;MgCl₂,1.0 μ L(25 mmol/L);dNTPs,0.25 μ L(各 2.5 mmol/L);引物(forward),1.0 μ L(60 mmol/L);引物(reverse),1.0 μ L(60 μ mol/L);Taq,0.5 μ L(5 u/ μ L);10x buffer,2.5 μ L;适量纯水补足至 25 μ L.

PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min 后,94℃ 变性 1 min,41℃ 退火 2 min,72℃ 延伸 3 min,循环 40 次,最后 72℃ 续延伸 10 min.

PCR 引物引用 Jarman 等人^[2]用于扩增磷虾属 mtCO I 的引物,其序列为:

HCO:5' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3';

LCO:5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'.

PCR 产物纯化、回收后,1% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,紫外灯下观察鉴定目的基因纯化情况.

1.2.3 目的基因克隆

纯化后的 PCR 产物使用 Promega 公司的试剂盒(A1360)进行连接和转化:其中载体为 pGEM-T Easy Vector,4℃ 环境中连接过夜.重组质粒经热休克转化至感受态大肠杆菌 JM109,于氨苄 LB 固相平板培养基上 37℃ 培养 14 h,挑取单菌落,氨苄 LB 液体培养基中 37℃ 环境中振荡培养 15~16 h.收集细菌,经蛋白酶 K 消化,纯化质粒.

1.2.4 测序

质粒 DNA 提纯后,经限制性内切酶 Eco R I 酶切、提纯目的 DNA 片段,经凝胶电泳检验确定为目的基因片段;转化反应后的质粒交由上海博亚生物技术公司进行测序.同一样品进行正反向测序,将正反链进行互补配对后得到该扩增片段完整的核苷酸序列.

1.3 序列分析

采用 ClustalX 1.81 软件进行序列比对,Gene Runner 3.05 软件进行 DNA 序列反转和互补,DNAMAN 4.11 软件计算碱基组成及百分比.

2 结 果

2.1 中华假磷虾 mtCO I 基因片段大小

中华假磷虾基因组 DNA 在本 PCR 条件下经特异性引物扩增的线粒体 CO I 基因片段大小为

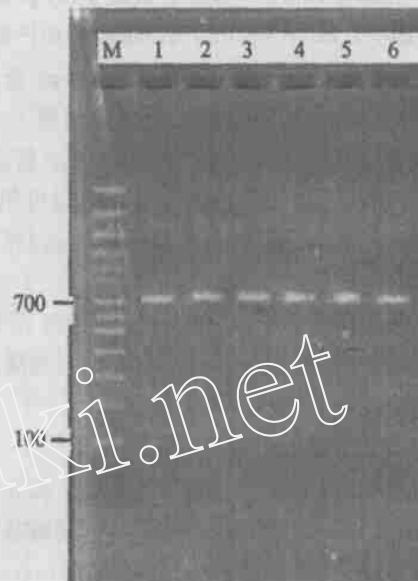


图 1 中华假磷虾 mtCO I 基因片段

M:100 bp DNA 分子量标志;
泳道 1~6:中华假磷虾样品 1~6

Fig. 1 mtCO I gene fragment of *P. sinica* collected from Xiamen waters



图 2 中华假磷虾 mtCO I 重组质粒 Eco R I 酶切电泳图像

M:100 bp DNA 分子量标志;泳道 1~2:样品 1;泳道 3~4:样品 2;泳道 5~6:样品 3;泳道 7~8:样品 4;泳道 9~10:样品 5;泳道 11~12:样品 6

Fig. 2 Electrophoresis diagram of mtCO I recombinant plasmid endoenzymed by Eco R I of *P. sinica*

730 bp 左右,图 1 为采自厦门港的 6 只中华假磷虾 mtCO I 基因片段的凝胶电泳图像(1%琼脂糖凝胶, 1x TBE 电泳介质,6 V/cm 恒压下电泳 90 min;EB 溶液染色 25~30 min).

2.2 mtCO I 重组质粒

中华假磷虾 mtCO I 基因片段经 PCR 扩增,与质粒(pGEM-T Easy Vector, Promega 公司产品)基因重组,转化至大肠杆菌(JM109, Promega 公司产品)中克隆培养,重组质粒经限制型内切酶 Eco RI 酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,获得图像如图 2 所示.图中,第 4、10 和 12 泳道的分别为中华假磷虾第 2、5 和 6 号样品,其它样品(第 1、3 和 4 号样品)在基因重组过程中未获成功.

比较图 1 和图 2 可以看出,中华假磷虾 mtCO I 基因片段经 PCR 扩增后的分子量大小与克隆后的分子量大小基本一致.

2.3 中华假磷虾 mtCO I 序列

厦门港中华假磷虾 3 个样品(第 2、5 和 6 号样品)的 mtCO I 基因片段长度为 709 bp,其碱基序列如表 1 所示[第 6 号样品 Ps6rc 系反转(reverse)和碱基互补(complement)之后得到的序列].其碱基组成中,A+T 含量达 63.94%,其中:A,28.59%;T,35.35%;G,17.61%和 C,18.45%.

从表 1 可以看出,本实验中的 3 只样品共有 4

表 1 中华假磷虾线粒体 DNA CO I 基因片段序列
Tab.1 Sequence of mtCO I gene fragment of *Pseudeuphausia sinica*

FILE: Multiple_Sequence_Alignment
,PROJECT:mtCO I Sequences Alignment of *Pseudeuphausia sinica* Collected from Xiamen Waters
NUMBER:3;MAXLENGTH:709;NAMES:Ps2,Ps5,Ps6rc

Ps2	GGTCAACAATAATATAAGATATTGGTACCCCTATATTTTAT	40
Ps5	-----	40
Ps6rc	-----	40
Ps2	CTTTGGTGCATGAGCTGGAATAGTAGGAACCTCCCTTAGT	80
Ps5	-----	80
Ps6rc	-----	80
Ps2	CTAATTATTCGAGCTGAATTAGGTCACCCAGGTAATTGA	120
Ps5	-----	120
Ps6rc	-----	120
Ps2	TTGGAGATGACCAAATTTATAATGTGGTTGTAACCTGCTCA	160
Ps5	-----	160

Ps6rc	-----	160
Ps2	TGCATTGTATAATTTTTTTTATAGTTATACCTATTATA	200
Ps5	-----	200
Ps6rc	-----	200
Ps2	ATTGAGGATTGGAAATTGATTGGTTCTCTTATACTAG	240
Ps5	-----	240
Ps6rc	-----	240
Ps2	GAGCTCCGGACATAGCATTTCCTCCGATAAACAATATAAG	280
Ps5	-----	280
Ps6rc	-----	280
Ps2	ATTTTGACTATTACCCCATCTCTAACTCTTCTTCTTGGGA	320
Ps5	-----	320
Ps6rc	-----	320
Ps2	AGAGGTTTAGTAGAAGAGGAGTTGGTACAGGATGGACAG	360
Ps5	-----	360
Ps6rc	-----	360
Ps2	TATACCCCTCTCTGCTAGATTGGTCATGCAGGAGC	400
Ps5	-----	400
Ps6rc	-----	400
Ps2	ATCTGTAGATATAGGAATCTTTTCACTTCATATTGCAGGA	440
Ps5	-----	440
Ps6rc	-----	440
Ps2	GCTTCACCAATTTTAGGAGCAGTGAATTTTATTACAACAG	480
Ps5	-----t-----	480
Ps6rc	-----t-----	480
Ps2	TAATTAACATACGATCTACTGGAATAAATATAGACCGAAT	520
Ps5	-----	520
Ps6rc	-----a-----	520
Ps2	CCCATTAATTTGTCTGATCAGTTTTTATTACTACCAATCTC	560
Ps5	-----t-----	560
Ps6rc	-----c-----	560
Ps2	CTTCTTTTATCTCTCCAGTTTTAGCAGGGCTATCACAA	600
Ps5	-----	600
Ps6rc	-----	600
Ps2	TACTATTAACAGACCGTAATTTAAATACATCGTCTTTGA	640
Ps5	-----	640
Ps6rc	-----	640
Ps2	TCCTGCAGGAGGAGATCCTATTCTTTATCAACTTA	680
Ps5	-----	680
Ps6rc	-----	680
Ps2	TTTTGATTTTTTGGTCACCCCTGAAGTTTA	709
Ps5	-----	709
Ps6rc	-----	709

(Ps2,Ps5 分别为第 2 和第 5 号样品的 mtCO I 基因片段序列;Ps6rc 为第 6 号样品 mtCO I 基因片段序列反转与互补后的序列)

表 2 磷虾科与中华假磷虾线粒体 CO I 碱基组成比较

Tab. 2 Comparison of mtCO I nucleotide composition among Euphausiidae and *Peudeuphausia sinica*

种类名称	A/%	T/%	C/%	G/%	A+T/%	C+G/%	Total/bp
<i>Euphausia pacifica</i> *	26.50	35.44	18.49	19.57	61.94	38.06	649
<i>E. longirostris</i> *	27.04	34.91	17.92	20.13	61.95	38.05	636
<i>E. lucens</i> *	24.70	33.54	21.34	20.43	58.23	41.77	656
<i>E. crystallorophias</i> *	24.92	33.02	20.48	21.59	57.94	42.06	630
<i>E. similis</i> *	27.17	35.07	18.33	19.43	62.24	37.76	633
<i>E. superba</i> *	26.10	34.12	20.44	19.34	60.22	39.78	636
<i>E. tricantha</i> *	26.05	38.17	16.62	19.16	64.22	35.78	668
<i>E. vallentini</i> *	25.50	32.92	20.87	20.71	58.42	41.58	647
<i>Meganctiphanes norvegica</i> *	28.90	35.85	16.94	18.31	64.75	35.25	661
<i>Nyctiphanes australis</i> *	29.16	35.34	17.27	18.23	64.50	35.50	631
<i>Pseudeuphausia sinica</i>	28.59	35.35	18.45	17.61	63.94	36.06	709

* 数据引自 GenBank; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

个突变位点,分别位于第 447,516,545 和 560 号碱基上。除了第 516 号突变碱基属于颠换突变(transversion mutation)类型外,其余 3 个突变均属于转换突变(transition mutation)类型。

3 讨论

由于目前尚无中华假磷虾任何线粒体基因片段的序列报道,故作者采用了 Jarman 等^[2]提供的广泛应用于甲壳动物的引物进行中华假磷虾线粒体 CO I 基因 PCR 特异性扩增,PCR 反应程序则根据情况作了调整,成功地获得中华假磷虾的 mtCO I 序列长度为 709 bp(表 1)。表 2 引用来自 GenBank 的数据,比较磷虾科内磷虾属(*Euphausia*)、*Meganctiphanes* 属和 *Nyctiphanes* 属 10 种磷虾和中华假磷虾的 mtCO I 核苷酸组成及分子量大小。从表 2 可看出,本实验所得的中华假磷虾 mtCO I 碱基组成中,A+T 碱基的百分含量占 63.94%,与表中所列出的其它 10 种磷虾的(范围 57.94%~64.75%)很相似,较高的 AT 含量是磷虾类浮游动物共同的现象。

基因突变的发生和 DNA 的复制、损伤修复、衰老和环境影响都有关系,基因突变也是生物进化的重要因素之一,所以研究基因突变除了本身的理论意义以外还有广泛的生物学意义。表 1 中,来自厦门港 2002 年 5 月份的中华假磷虾 3 个个体的 mtCO I 基因片段序列发现有 4 个突变点,其中 1 个属于颠

换突变,另外 3 个属转换突变类型,导致基因突变的不仅有自发突变,一些环境因素也能诱发基因突变。分析物种间或种群间的 mtDNA 某些基因片段的变异程度,是分子系统学研究和分子生态学研究的重要内容。Jarman 等^[2]通过线粒体 CO I 序列和 16S rRNA 基因片段序列对全球分布的磷虾科内 3 属 9 种磷虾进行了分子系统发生学研究;Bucklin^[4]也通过线粒体 CO I 和细胞色素 b(mtCYT b)序列对西北大西洋 4 个站点的 *Meganctiphanes norvegica* 进行了种群遗传结构和基因流的研究。假磷虾属是磷虾目的一个小属,属内仅有 2 个种类,宽额假磷虾(*P. latifrons*)和中华假磷虾。由于缺乏宽额假磷虾相关资料和 mtDNA 数据,对假磷虾属与其它磷虾属的分子系统学分析研究难免有牵强附会之嫌。而且,本文研究的中华假磷虾样品系来自厦门港 2002 年 5 月份的,有关其种群结构分析尚有待今后扩大研究领域,取得不同海域的样品后再进一步分析其种群结构及基因流模式。

参考文献:

- [1] 王荣,陈宽智.假磷虾一新种——中华假磷虾 *Pseudeuphausia sinica* sp. nov. 的描述[J]. 海洋与湖沼,1963, 5(4):353-359.
- [2] Jarman S N, Elliott N G, Nicol S. et al. Molecular phylogenetics of circumglobal *Euphausia* species (Euphausiacea, Crustacea)[J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 2000, 57(Sup. 3):51-58.

- [3] 王荣. 中华假磷虾的幼体形态[J]. 海洋与湖沼, 1965, 7(1): 35-38. -134.
- [4] 苏水全, 肖景霖. 几种海洋浮游甲壳动物的生化组成[J]. 台湾海峡, 1989, 8: 132-139.
- [5] 李少菁, 陈峰, 王桂忠. 中华假磷虾生长率的实验研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, 33(增刊): 129.
- [6] Bucklin A, Smolenack S B, Bentley A M, et al. Gene flow patterns of the euphausiid, *Meganyceti phanes norvegica* in the NW Atlantic based on mtDNA sequences for cytochrome B and cytochrome oxidase I[J]. J. Plankton Res. ,1997, 19: 1 763-1 781.

Analysis of Mitochondrial DNA CO I Gene Fragment of *Pseudeuphausia sinica*

LIN Yuan - shao , CAO Wen - qing , FANG Lv - ping , LIU Qian - qian , LI Shao - jing
(Dept. of Oceanography , Xiamen University , Xiamen 361005 , China)

Abstract : *Pseudeuphausia sinica* (Euphausiacea , Crustacea) is abundant in the coastal and neritic waters of the East China Sea and the Southern Yellow Sea all the year round , and is the important food for many fishes , especially for fish larvae . The genomic DNA of *Pseudeuphausia sinica* , collected from Xiamen waters in May of 2002 , was obtained by phenol : Chloroform : isoamyl alcohol (25 :24 :1) extraction and isopropyl alcohol precipitation . Mitochondrial DNA COI gene was successfully amplified and sequenced . 709 base pairs of mtCOI were obtained under our PCR conditions . The composition of A , T , G and C is 28.59 % , 35.35 % 17.61 % and 18.45 % , respectively , which are similar to the nucleotide composition of other ten species that belong to three genera in the same family Euphausiidae . Three specimen met in the study have four mutable sites including transversion mutation and transition mutation . Not only organism themselves but also environmental factors which might lead to the mutation are discussed in the paper .

Key words : *Pseudeuphausia sinica* ; mitochondrial DNA ; mtCO I ; Xiamen