

文章编号: 1000-5471(2008)05-0095-04

鲇细胞色素 b 基因序列分析^①

卵 丹^{1,2}, 王庆容¹

1. 遵义师范学院 生物系, 贵州 遵义 563003; 2. 北京农林科学院 植物营养与土地资源研究所, 北京 100097

摘要: 对 4 个种群的鲇(*Silurus asotus*)的线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)细胞色素 b(cytochrome b, Cyt b)基因片段的 500 bp 序列进行测定, 经 Clustal X 同源排序后得 400 bp 序列. 结果表明: 鲇种群内碱基的变异较低, 雅砻江和濠阳河种群均为 0, 岷江种群为 0.25%, 乌江种群为 1.25%. 雅砻江和濠阳河种群只有 1 种单倍型, 岷江和乌江种群有 2 种单倍型但单倍型间变异位点很少. 雅砻江和濠阳河种群内无变异位点, 岷江种群仅有 1 个变异位点, 乌江种群有 5 个变异位点. 结论: 细胞色素 b 基因在鲇种群内是比较保守的, 种群间的变异较大.

关键词: 鲇; 线粒体 DNA; 细胞色素 b

中图分类号: S965.1

文献标识码: A

鲇(*Silurus asotus*)属于鲇形目(Siluriformes)、鲇科(Siluridae)、鲇属(*Silurus*), 分布于长江水系及长江以南较大的江河中^[1]. 从 20 世纪 80 年代初开始, 我国对鲇的生殖与人工繁殖、营养等方面的研究已逐步展开^[2-5]. 到目前为止, 有关鱼类 mtDNA Cyt b 基因序列的研究已有较多报道, 而从细胞色素 b 基因分析不同种群的鲇序列变异则未见报道.

本研究通过测定鲇 4 个种群 17 个个体的细胞色素 b 基因部分序列, 并以此分析鲇不同地理种群内和种群间序列变异, 以期对鲇的种质资源保护、分子进化研究和遗传育种等方面提供分子遗传学基础.

1 材料与方 法

1.1 材 料

鲇标本于 2006 年 6-9 月分别采自四川省境内的攀枝花、岷江, 贵州省境内乌江和沅江上游的濠阳河(表 1). 所有标本活体取肌肉、肝脏、卵巢(雌体), 置于液氮保存, 运回实验室后置于 -20 °C 保存备用.

表 1 材料来源、数量、在文中的代号及样品编号

产地及来源	样品数	代号	样品编号
四川雅砻江	4	YLJ	YLJ1 YLJ2 YLJ3 YLJ4
四川岷江	3	MJ	MJ1 M2 J MJ3
贵州乌江	5	WJ	WJ1 WJ2 WJ3 WJ4 WJ5
贵州濠阳河	5	WYH	WYH1 WY2 WYH3 WYH4 WYH5

1.2 总 DNA 的提取

取 100 mg 肝脏或 200 mg 肌肉, 用含蛋白酶 K 的裂解液(30 mmol/L tris-hcl, pH 8.0, 0.1 mol/L EDTA, 0.1 mol/L NaCl, 1% SDS)于 55 °C 水浴 2~4 h, 用饱和酚: 氯仿: 异戊醇(25: 24: 1)抽提 2 次, 氯仿: 异戊醇(24: 1)抽提 1 次, 随后用低温无水乙醇(-20 °C)沉淀 DNA, 干燥后溶于 TE 中, 置 -20 °C 保存备用.

1.3 细胞色素 b 基因片段的扩增及序列测定

用于 PCR 扩增的细胞色素 b 基因的特异性引物为 L14724: 5'-GACTTGAAAAA CCACCGTTG-3'和

① 收稿日期: 2007-10-22

基金项目: 贵州省自然科学基金资助项目(黔教科 2005219); 遵义师范学院基金资助项目(200520).

作者简介: 卵 丹(1972-), 女, 贵州织金人, 助理研究员, 主要从事遗传毒理学研究.

通讯作者: 王庆容.

H15149: 5'- CCTCAGAAGGATATTTGTCCTC - 3')^[6], 由上海生工生物技术服务有限公司合成, 使用美国 PTC-100 PCR 扩增仪, 反应总体积 50 μ L, 其中包括模板 DNA 1 μ L, 两种引物各 1 μ L, 10 \times Buffer 5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 补足灭菌双蒸水至终体积, 其上加 2 滴消毒石蜡油. 扩增反应程序如下: 92 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 92 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 再 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min. PCR 扩增产物上样至 2% 琼脂糖凝胶(含溴乙锭 0.5 μ g/mL)电泳, 于紫外灯下观察、照相.

PCR 产物用 UNIQ-10 柱式 PCR 纯化试剂盒(上海生工)纯化后作为测序反应的 DNA 模板, 测序试剂为 Bigdye terminator 2.0(上海生工), 用 ABI 377 全自动测序仪进行正反链双向测序. 测序在上海生工生物技术服务有限公司进行.

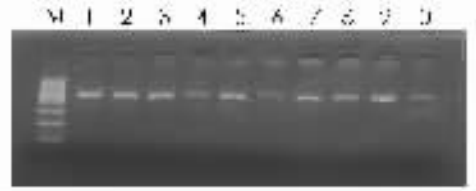
1.4 数据分析

测序结果使用 Clustal X 排定 DNA 序列, 再进行人工核对, 选 400 bp 同源片段.

2 结果与讨论

2.1 细胞色素 b 基因扩增结果

不同种群的鲇细胞色素 b 基因扩增出约 500 bp 的片段(图 1), 扩增产物不存在长度变异.



分子量标准: 100 bp ladder

图 1 鲇细胞色素 b 基因扩增产物

2.2 细胞色素 b 基因片段序列的比较

PCR 产物直接测序得到了 420 bp 左右的 Cyt b 片段, 测序结果使用 Clustal X 排定 DNA 序列, 再进行人工核对, 选 400 bp 同源片段(图 2).



注: “-”表示碱基相同

图 2 鲇的细胞色素 b 基因序列

2.3 鲇 Cyt b 基因片段的碱基组成 (表 2)

表 2 4 个种群鲇 Cyt b 基因片段的碱基组成

种群	A	T	G	C	A+T	G+C	C-3	G-3
雅砻江	0.282 5	0.297 5	0.135	0.285	0.58	0.42	0.473 7	0.055 6
岷江	0.277 5	0.298 8	0.14	0.283 7	0.576 3	0.423 7	0.475 8	0.071 4
乌江	0.268 7	0.295	0.148 8	0.287 5	0.563 7	0.436 3	0.400 1	0.109 1
濠阳河	0.275	0.31	0.142 5	0.272 5	0.585	0.415	0.440 4	0.052 6
平均值	0.275 9	0.300 3	0.141 6	0.282 2	0.576 2	0.423 8	0.447 5	0.072 2

注: C-3、G-3 表示第 3 密码子的 C、G 含量。

3 讨 论

从图 2 可见, Cyt b 基因在鲇种群内比较保守. 雅砻江和濠阳河 2 个种群 9 个个体仅有 1 种单倍型, 没有变异位点; 岷江 3 个个体只有 2 种单倍型, 变异位点 1 个; 乌江种群 5 个个体中, 有 2 种单倍型, 变异位点 5 个. 在不同种群间比较, 雅砻江种群与乌江种群间的变异平均为 36 个碱基; 岷江种群与濠阳河种群间有 35 个碱基的变异; 雅砻江种群与岷江种群间有 7 个碱基的变异. 岷江种群与乌江种群间的变异平均为 35 个碱基; 濠阳河种群与乌江种群间的变异为 6 个碱基. 在 4 个种群的鲇中, Cyt b 基因片段的序列均无碱基的插入或缺失, 所有的变异均为 T 和 C、A 和 G 间的转换, 没有碱基的颠换. 亲缘关系很近的物种往往转换会远远大于颠换, 同一种内不同群体的遗传变异很小, 故未出现颠换是合理的. 这与刘红艳等^[8]报道的鲷科鱼类线粒体细胞色素 b 基因序列变异相似. 可以看出, 在 Cyt b 基因片段上, 不同地理种群的鲇在种群内的变异很小, 种群间的分化程度较高.

从表 2 可知, 在所选择的 400 bp 序列中, 平均碱基组成 T 为 30.03%, C 为 28.22%, A 为 27.59%, G 为 14.16%; 其中 C 的含量约为 G 含量的 2 倍. 此外, 第 3 密码子的碱基组成存在较大偏差, 第 3 密码子 C 和 G 的平均碱基组成 C-3 为 44.75%, G-3 为 7.22%, 表明第 3 密码子 G 碱基组成极低. 在 Nicolas 等^[7]报道的爬行动物蝮蛇亚科中、周发林等^[8]报道的笛鲷属鱼类中也发现 Cyt b 基因的第 3 密码子 G 碱基组成极低的现象.

雅砻江种群、岷江种群、乌江种群都是长江上游支流, 但乌江与岷江和雅砻江在地理位置上相隔较远, 故雅砻江种群与岷江种群间相比较分化较小, 乌江种群与前 2 个种群间相比较分化较大. 濠阳河位于沅江上游和长江干流中间相隔一个洞庭湖, 与长江上游支流的各地理种群间在地理位置上相隔甚远, 因此, 濠阳河种群与其他种群之间的分化较大. 鲇通常土著性地生活在各支流的某些江段中, 个体较小, 迁移趋向弱, 地理隔离较明显, 各种群间基因交流少, 不同地理种群间出现较大变异.

参考文献:

- [1] 陈湘舜. 我国鲇(鲇)科鱼类的总述 [J]. 水生生物学集刊, 1977, 6(2): 197-216.
- [2] 魏 刚, 陈怀辉. 鲇卵巢发育组织学的初步研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1994, 19(5): 517-521.
- [3] 魏 刚, 黄 林. 鲇人工繁殖试验的研究·四川经济鲇类研究 [M]. 重庆: 西南师范大学出版社, 1998: 294-298.
- [4] 李 懋, 万松良, 黄二春, 等. 大口鲇和普通鲇的同工酶研究初报 [J]. 湖北农业科学, 1998, 3: 54-57.
- [5] 魏 刚, 黄 林, 戴大临, 等. 鲇卵膜形成的显微和超显微结构比较的研究 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(1): 25-28.
- [6] 刘红艳, 苏天凤, 周发林, 等. 4 种鲷科鱼类线粒体细胞色素 b 基因序列及分子系统学分析 [J]. 中国水产科学, 2003, 10(3): 184-188.
- [7] Nicolas V, Guillaume L. Weightion and Congruence: A Case Study Based on Three Mitochondrial Genes in Pitvipers [J].

Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 9(3): 366 – 374.

[8] 周发林, 江世贵, 苏天凤, 等. 6 种笛鲷属鱼类 Cyt b 基因片段序列的比较 [J]. 热带海洋学报, 2004, 23(4): 87 – 91.

The Sequence Analysis of Mitochondrial DNA Cytochrome b Gene of *Silurus asotus*

MAO Dan^{1,2}, WANG Qing-rong¹

1. Department of Biology, Zunyi Normal College, Zunyi Guizhou 563003, China;

2. Institute of Plant Nutrition and Resources, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China

Abstract: The 500 bp fragments of cytochrome b gene were obtained by PCR method from the mitochondrial DNA of *Silurus asotus* from four species groups, and a mitochondrial cytochrome b DNA of 400 bp sequence was successfully sequenced by Clustal X homologous sequence analysis. The three upper branch groups are from Yalongjiang river, Minjiang river in Sichuan Province and Wujiang river in Guizhou Province respectively. The middle branch group is from Wuyanghe river in Guizhou Province. Base substitutions in the four species groups are lower. No substitution in Yalongjiang river and Wuyanghe river. 0.25% substitutions in Minjiang River. 1.25% substitutions in Wujiang river. There are two haplotypes in Minjiang river and Wujiang river respectively. There is one haplotype in Yalongjiang river and Wuyanghe river respectively. Further more variable sites among haplotypes is quite low. No variable site in Yalongjiang river and Wuyanghe river. One variable site in Minjiang River. Five variable sites in Wujiang river. The result indicates that cytochrome b gene is very conservative in the four species groups of *Silurus asotus*. But there are some variations between each populations.

Key words: *Silurus asotus*; mitochondrial DNA; cytochrome b

责任编辑 夏 娟