

文章编号:1000 - 0615(2005)03 - 0318 - 05

中华鳖与砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因序列 的比较分析和分子鉴定标记

陈合格, 刘文彬, 张轩杰

(湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081)

摘要:对中华鳖和砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因进行了引物设计、PCR 扩增、序列测定和 PCR-RFLP 分析。研究表明:中华鳖、砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的碱基序列长度相同,均为 562bp,其 A、T、C、G 含量相似,分别为 209 个(37.2%)、121 个(21.5%)、145 个(25.8%)、87 个(15.5%)和 207 个(36.8%)、120 个(21.4%)、145 个(25.8%)、90 个(16%)。两序列间共有 13 处碱基不同,序列差异率为 2.31%,中华鳖与砂鳖各自个体间的平均核苷酸序列差异率分别为 0.53% 和 0.36%,种间差异显著;用内切酶 *MspI* 酶切两种鳖的 12S rRNA 基因片段,在砂鳖中可得到大小为 519 bp 和 43 bp 两个片段,而中华鳖无此酶切位点,这可作为准确鉴别中华鳖和砂鳖的分子鉴定标记。从两种鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段碱基的显著差异和 *MspI* 酶切位点的变化,可以进一步证明砂鳖是不同于中华鳖的鳖属一新种。

关键词:中华鳖;砂鳖;12S rRNA 基因;PCR-RFLP 分析;分子鉴定标记

中图分类号:S917 文献标识码:A

Comparative analysis of mitochondrial DNA 12S rRNA region between *Pelodiscus sinensis* and *Pelodiscus axenaria* and their molecular marker for identification

CHEN He-ge, LIU Wen-bin, ZHANG Xuan-jie

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

Abstract: The primers for *Pelodiscus sinensis* and *Pelodiscus axenaria* were designed by using the sequences of mitochondrial DNA 12S rRNA region of *Dogania subplana*, *Chrysemys picta* and *Chelonia mydas*, 562 base pairs of mitochondrial DNA were amplified and sequenced. The results show that the length of their sequence is the same, the A, T, G, C contents are similar, the number of A, T, G, C is 209(37.2%), 121(21.5%), 145(25.8%), 87(15.5%) in *Pelodiscus sinensis* and 207(36.8%), 120(21.4%), 145(25.8%), 90(16%) in *Pelodiscus axenaria*. Based on their sequence data, we found there are 13 different nucleotide sites (percentage divergence is 2.31%) between *Pelodiscus sinensis* and *Pelodiscus axenaria* by using the software of ClustalW, whereas the average number of different nucleotide sites is 3 (percentage divergence is 0.53%) in *Pelodiscus sinensis* and 2 (percentage divergence is 0.36%) in *Pelodiscus axenaria*. The nucleotide percentage divergence is obvious between species, so it suggests *Pelodiscus axenaria* is a new species in *Trionyx*. Restriction endonuclease analysis based on sequence data of this DNA fragment revealed the presence of polymorphic sites for *MspI* endonuclease, there is one site for *MspI* endonuclease in *Pelodiscus axenaria*, but none in *Pelodiscus sinensis*. The restriction profiles obtained by agarose gel electrophoresis when amplicons were cut with *MspI* enzyme allowed the unequivocal identification of *Pelodiscus sinensis* and *Pelodiscus axenaria*.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; *Pelodiscus axenaria*; 12S rRNA gene; PCR-RFLP analysis; molecular marker for identification

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 是我国重要的特种经济动物,其隶属于龟鳖目 (Testudinata)、鳖科

收稿日期:2004-03-19

资助项目:农业部“中华鳖标准”项目资助(1999 - Q - 1603161)

作者简介:陈合格(1979 -),男,湖南邵阳人,硕士研究生,主要从事水生动物遗传与育种研究

通讯作者:张轩杰, Tel:0731 - 8872552, E-mail:zh603@tom.com

(Trionychidae)、鳖属(*Pelodiscus*)。以前我国鳖属仅有中华鳖一种。周工健等^[1]在对湖南省鳖资源进行实地调查时,发现了一新种——砂鳖(*Pelodiscus axenaria*),又称铁壳、灰壳。其与中华鳖体形较相似,但个体较小,体重一般为 100~300 g,且在外形、骨骼、繁殖习性和血清蛋白的电泳带谱、乳酸脱氢酶同工酶的电泳带谱等方面与中华鳖均存在明显的差异,判定砂鳖为鳖属一新种。

本研究以中华鳖和砂鳖为研究材料,进行了 mtDNA 12S rRNA 基因片段的引物设计、PCR 扩增及其序列测定,分析了中华鳖和砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段核苷酸序列间的差异和 *MspI* 酶切位点差异,为确定鳖属动物种间遗传关系和分子方法分类提供实验依据,获得中华鳖与砂鳖的分子鉴定标记。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验所用的中华鳖 12 只取自湖南省中华鳖原种场,5 只购于新一佳超市,8 只野生砂鳖全部取自郴州市安仁县的永乐江。

1.2 引物设计

参照平鳖(*Dogania subplana*, 登录号 NC_002780)、海龟^[2](*Chrysemys picta*, 登录号 AB012104)及锦龟^[3](*Chrysemys picta*, 登录号 AF069423)线粒体 DNA 12S rRNA 序列,设计用于扩增中华鳖和砂鳖 12S rRNA 的引物 12S_F: AGCCAGTGAAA (T/C) GCCCTAAA 和 12S_R: CTGG (A/T) TTGGC AA (A/G) AGATGGT,由上海生物工程公司(Sangon)合成。

1.3 基因组 DNA 的提取及线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

将中华鳖、砂鳖放血后,立即取肝脏进行基因组 DNA 的提取,具体操作参照张辉和吴清江^[4]的方法稍有改进,沉淀溶于 TE,测定浓度后 4℃ 存放。dNTP, *Taq* 酶及反应的 Buffer 和内切酶 *SalI*、*XbaI* 均购自北京华美生物工程公司(Sino-American Biotechnology Company),PCR 反应的体积为 25 μL ,其中:*Taq* 酶 1U;浓度为 1 mmol L^{-1} 的 dNTP 5 μL ;20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 的上、下游引物各 1.0 μL ;DNA 模板约 100 ng。使用美国 AB 公司的 GeneAmp PCR System2700 PCR 仪进行扩增,循环参数为 95℃ 预变性 5 min,然后进入如下循环:

94℃ 40 s,52℃ 40 s,72℃ 50 s,循环 35 次,循环结束后,72℃ 延伸 10 min,于 4℃ 保存。取 5 μL PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶,5 V cm^{-1} ,进行电泳检测。

1.4 连接、转化反应及序列测定

将凝胶纯化后的 PCR 产物与 PMD 18-T 载体(宝生物工程(大连)有限公司产品)进行连接,连接及转化反应均按 PMD 18-T 载体试剂盒的要求进行。碱裂解法提纯质粒,用 PCR 方法和 *SalI*、*XbaI* 双酶切法确认片段的正确插入。挑选插入正确的克隆送往上海生物工程公司进行序列测定。

1.5 限制性位点分析与 PCR-RFLP 检测

基于中华鳖、砂鳖间的序列差异,用 Jellyfish (version 1.4) 软件分析其 12S rRNA 片段的酶切位点差异情况,确定 *MspI* 是可用于 PCP-RFLP 方法鉴别中华鳖与砂鳖的限制性内切酶。并通过 12S rRNA 片段中 *MspI* 的识别位点在序列中所处的位置,计算酶切后的片段长度。用内切酶 *MspI* 对 17 只中华鳖和 8 只砂鳖扩增后的 12S rRNA 产物进行酶切分析,酶切体系为 20 μL ,其中:10 \times Buffer 2 μL ,乙酰化 BSA 2 μL ,PCR 产物 4 μL ,*MspI* 内切酶 5 U,余用灭菌 $dd\text{H}_2\text{O}$ 补足,37℃ 酶切 3~4 h,酶切产物用 2.0% 琼脂糖凝胶,5 V cm^{-1} 进行电泳分离约 2 h,EB 染色,然后用凝胶成像系统扫描并保存结果。

2 结果

2.1 中华鳖和砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

利用参照平鳖、海龟、锦龟的线粒体 DNA 12S rRNA 相应序列设计的引物进行了中华鳖与砂鳖 mtDNA 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增,得到了高效扩增的清晰的基因片段,且空白对照实验未出现扩增产物(图 1),说明利用近缘种动物 mtDNA 的同源性,可以设计龟鳖目动物的相应片段引物,且以此方法设计的引物具有普遍性。

2.2 中华鳖、砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段序列的测定

测定出的中华鳖与砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段碱基序列长度相同,均为 562 bp,其 A、T、C、G 含量相似,分别为 209 个(37.2%)、121 个(21.5%)、145 个(25.8%)、87 个(15.5%)

和 207 个 (36.8%)、120 个 (21.4%)、145 个 (25.8%)、90 个 (16%)。利用 BLAST 与 GenBank 中线粒体 DNA 序列进行比较,结果表明其与其它物种相同基因片段序列有较高的同源性,中华鳖与砂鳖间此序列的同源性为 97.69%,差异率为 2.31%。这两个序列(图 2)已提交 GenBank(登录号分别为 A Y304497 和 A Y389697)。

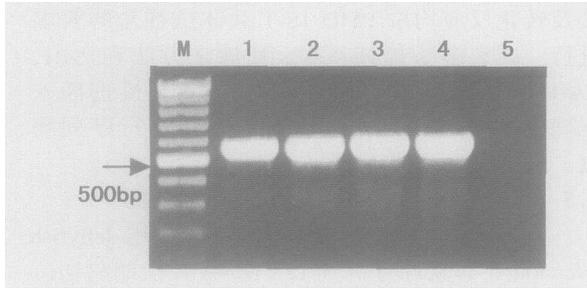


图 1 MtDNA 12SrRNA 基因片段 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of mitochondrial DNA 12S rRNA region

M:100 bp DNA 分子量标准,箭头所示为 500 bp;

1,2:中华鳖;3,4:砂鳖;5:空白对照

M:100 bp DNA ladder marker, the arrow shows band of 500 bp;

Lane 1,2: *Pelodiscus sinensis*; Lane 3,4: *Pelodiscus axenaria*;

Lane 5:blank control

2.3 PCR-RFLP 检测与固定碱基替换位点确定

PCR-RFLP 的检测结果见图 3。酶切结果表明:所有中华鳖的 12S rRNA 片段均无 *MspI* 的酶切位点,砂鳖因发生一固定位点的变异而形成了 1 个 *MspI* 的酶切位点,从而使得砂鳖的 12S rRNA 基因片段能被 *MspI* 切成大小不同的 2 个片段:大片段长 519 bp,小片段长 43 bp。这和用 Jellyfish 软件分析的结果相一致。在经过 PCR-RFLP 检测的中华鳖、砂鳖中,随机选取 6 只中华鳖和 3 只砂鳖的 12S rRNA 基因片段进行克隆测序,以检测 PCR-RFLP 鉴定标记的可靠性。同时,用 ClustalW (1.82) 进行序列间的在线比对 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>),比对结果表明:中华鳖个体间碱基变异范围为 0~6 个,平均为 3 个,而砂鳖个体间碱基变异范围为 1~3 个,平均为 2 个,平均核苷酸序列差异分别为 0.53% 和 0.36%;中华鳖与砂鳖在 44 bp、61 bp、164 bp、227 bp、229 bp、251 bp、315 bp、329 bp、337 bp、340 bp 和 341 bp 处为固定碱基的替换(图 2)。

3 讨论

3.1 中华鳖、砂鳖 12S rRNA 基因片段序列间的比较分析

12S rRNA 基因是线粒体的 2 个 rRNA 基因之一,在进化上较为保守,通常被用于分子进化和系统发生的研究^[5]。本研究对中华鳖、砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的测序结果表明,其长均为 562 bp,同源性高达 97.69%,但两序列间共有 13 处碱基的差异(图 2),在 419 bp 处为碱基间的颠换,其余各处为碱基间的转换,其中 T/C 互换 10 次,G/A 转换 2 次。在线序列间的比对显示,44 bp、61 bp、164 bp、227 bp、229 bp、251 bp、315 bp、329 bp、337 bp、340 bp 和 341 bp 处为固定碱基的替换。A + T 含量的统计结果显示,中华鳖与砂鳖 mtDNA 12S rRNA 基因片段序列中 A + T 含量与本研究设计引物所用的平鳖、海龟及锦龟的相应序列 A + T 含量相似,均为 A + T > G + C(表 1)。这与其它物种有一致的结果^[6]。因此在今后若进行线粒体 DNA 的限制性内切酶片段长度 RFLP 分析时有必要选用识别富含 AT 序列的内切酶,这样更利于多态性的揭示^[7]。

3.2 分子鉴定标记方法分析

目前,用于鉴定亲缘关系较近的不同种的方法有形态学判别、同工酶鉴别和 RAPD 鉴别等,但由于技术等方面的问题,这些方法在实际应用中都存在一定的局限。早期的分子鉴定大多采用同工酶技术,但由于这种鉴定标记存在个体特异性和组织特异性,直接影响到检测结果的可靠性。20 世纪 90 年代末,随着 RAPD 技术的广泛应用,RAPD 标记引起了许多学者的关注。但由于 RAPD 技术的重复性较差,对 DNA 模板的质量要求很高,待测样品之间的模板质量的差异会直接影响到检测结果的准确性。

基于物种间 DNA 序列的核苷酸多态性而发展起来的分子技术为种的鉴定提供了无限的遗传标记资源^[8]。一旦目的 DNA 片段得以扩增,就可以方便地用限制性内切酶进行分析且易于获得酶切片段长度多态性,目前 mtDNA 在鱼类中已被广泛用作物种间鉴别的遗传标记^[9]。建立在 PCR 基础上的 RFLP 标记(PCR-RFLP),可以通过 PCR 方法方便地控制 DNA 片段的大小,从而有效地限

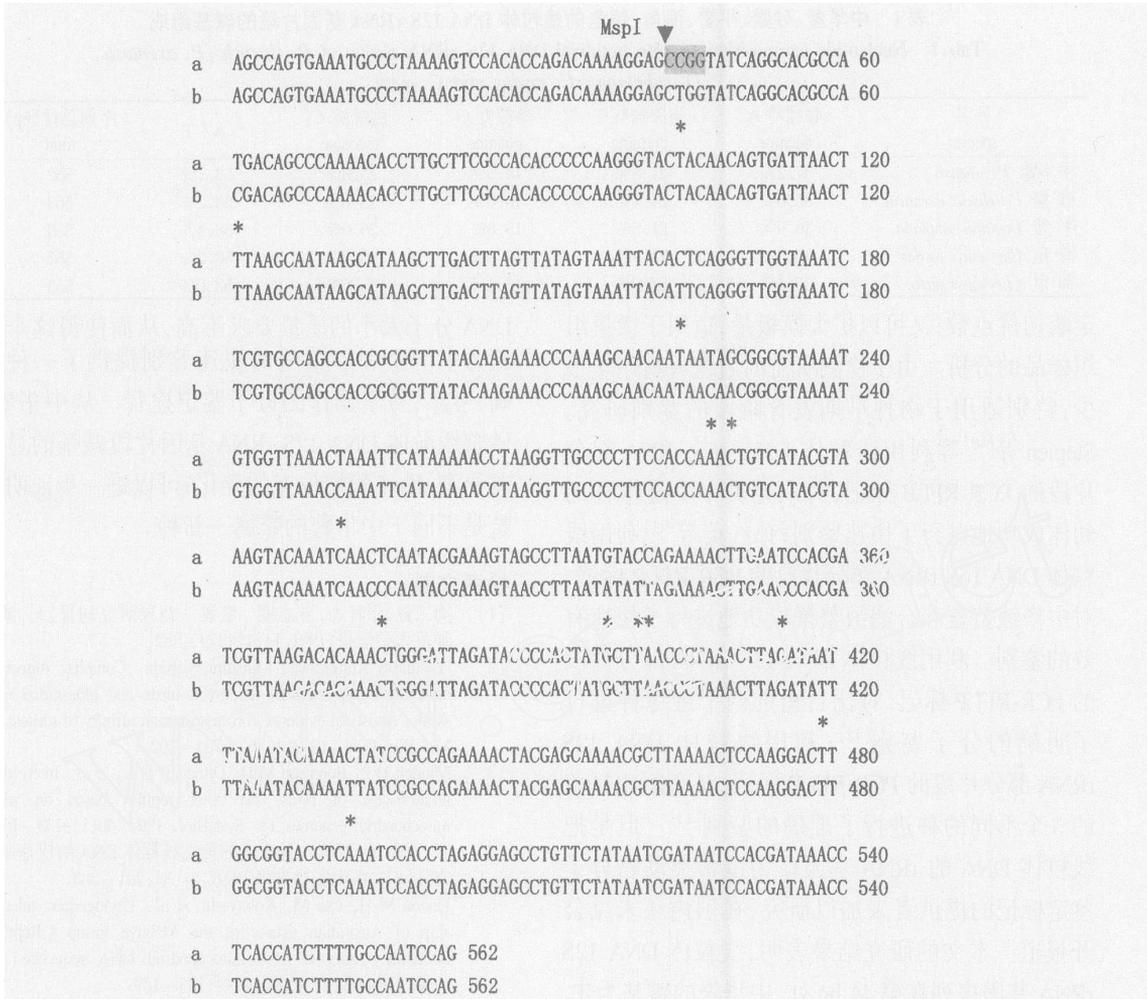


图 2 砂鳖、中华鳖的线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段序列(562 bp)

Fig. 2 Nucleotide sequence (562 bp) of mitochondrial DNA 12S rRNA region of *P. axenaria* and *P. sinensis*

▼为 *MspI* 的识别序列; *表示不同的核苷酸位点;a 砂鳖;b 中华鳖

▼shows the recognized sequence of *MspI* enzyme; * shows the different nucleotide sites;a. *Pelodiscus axenaria*; b. *Pelodiscus sinensis*

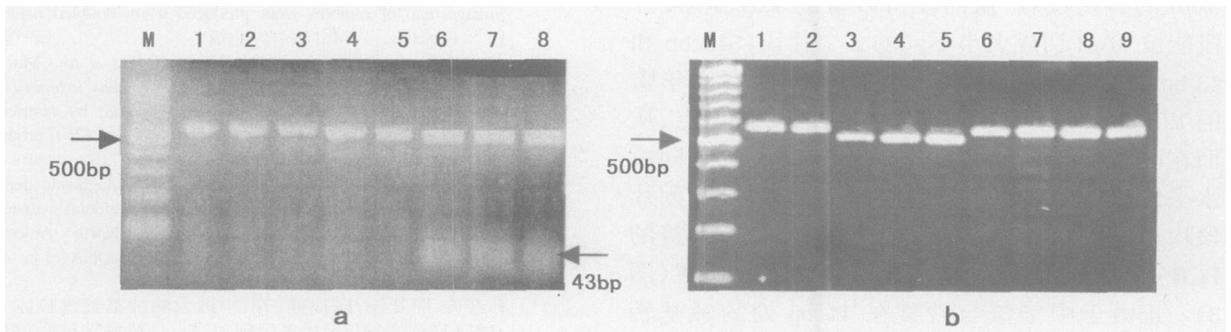


图 3 mtDNA 12S rRNA 基因片段 *MspI* 酶切结果图

Fig. 3 Both a and b are restriction results of mitochondrial DNA 12S rRNA by using *MspI* enzyme

a. 砂鳖酶切后的 43 bp 的小片段, b. 3~5 示酶切后的 43 bp 的小片段已跑出胶外。M:100 bp DNA 分子量标准,箭头所示为 500 bp; 1~2 均依次为中华鳖、砂鳖的 PCR 产物;a. 3~5:中华鳖,6~8:砂鳖;b. 3~5:砂鳖,6~9:中华鳖

a. lane 6 - 8 shows the frangment of 43 bp when amplicons of *T. axenaria* was cut with *MspI*enzyme , b. lane 3 - 5 shows the fragment of 43 bp is out of the agarose gel. M:100 bp DNA ladder marker ,the arrow shows band of 500 bp ; a,b lane 1 - 2 : PCR amplification results of *Pelodiscus sinensis* , *Pelodiscus axenaria*; a lane 3 - 5 : *Pelodiscus sinensis* , lane 6 - 8 : *Pelodiscus axenaria*; b lane 3 - 5 : *Pelodiscus axenaria* , lane 6 - 9 : *Pelodiscus sinensis*

表 1 中华鳖、砂鳖、平鳖、海龟、锦龟的线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的碱基组成
 Tab.1 Nucleotide composition of mitochondrial DNA 12S rRNA region of *P. sinensis*, *P. axenaria*,
D. subplana, *C. mydas* and *C. picta*

种名 species	腺嘌呤 A adenine	胸腺嘧啶 T thymine	鸟嘌呤 G guanine	胞嘧啶 C cytosine	A + T	序列总计(bp) total
中华鳖 <i>P. sinensis</i>	37.2 %	21.5 %	15.5 %	25.8 %	58.7 %	562
砂鳖 <i>Pelodiscus axenaria</i>	36.8 %	21.4 %	16.0 %	25.8 %	58.2 %	562
平鳖 <i>Dogania subplana</i>	36.9 %	21.5 %	15.6 %	26.0 %	58.4 %	558
海龟 <i>Chrysemys mydas</i>	36.8 %	21.4 %	15.8 %	26.0 %	58.2 %	557
锦龟 <i>Chrysemys picta</i>	37.1 %	20.9 %	16.4 %	25.6 %	58.0 %	555

定酶切位点数;又可以扩大模板量,适用于微量组织样品的分析。由于检测所需的组织材料用量很少,特别适用于物种早期发育阶段的鉴别研究。Stepien 等^[10]利用线粒体 DNA 16S rRNA 部分片段的 PCR-RFLP 标记,对双壳类 4 个近缘种的幼体成功地进行了快速鉴别;孙红英等^[11]利用线粒体 DNA 16S rRNA 部分片段的 PCR-RFLP 标记,对中华绒螯蟹和合浦绒螯蟹成功地进行了快速有效的鉴别。利用线粒体 DNA 12S rRNA 部分片段的 PCR-RFLP 标记,对比目鱼的两个近缘种进行了明确的分子鉴别^[12];利用线粒体 DNA 12S rRNA 部分片段的 PCR-RFLP 标记,对商用比目鱼的 5 个不同的种进行了准确的鉴别^[13]。但是把线粒体 DNA 的 rRNA 基因作为龟鳖类动物分子鉴定标记的提供者来加以研究,在国内还未见公开报道。本文的研究结果表明,线粒体 DNA 12S rRNA 基因序列在第 44 bp 处,中华鳖的碱基为 T,内切酶 *MspI* 所识别的序列为 C[▼]CGG/GGC C,从而使得扩增的 12S rRNA 片段缺失 *MspI* 的识别位点;而砂鳖在此位置的碱基为 C,形成了一个 *MspI* 的酶切位点,从而使得砂鳖的 12S rRNA 片段能被 *MspI* 切成大小不同的 2 个片段:519 bp 和 43 bp。PCR-RFLP 的检测结果表明:所有中华鳖的 12S rRNA 基因片段均无 *MspI* 的酶切位点,从而在电泳时与中华鳖、砂鳖的 PCR 产物处于同一水平位置(图 2);而所有砂鳖的 12S rRNA 基因片段均有 1 个 *MspI* 的识别位点,从而使得砂鳖的 PCR 产物酶切后的大片段总处于稍前的位置(图 3)。正由于中华鳖与砂鳖在 44 bp 处的碱基转换,形成了在经 *MspI* 酶切后的片段多少的差异及 562 bp 与 519 bp 的长度差异,因而可以作为准确鉴别中华鳖与砂鳖的分子鉴定标记。对标记鉴定结果的测序检测显示,该标记的鉴定结果准确可靠,可重复性好且未发现有个体特异性。由于扩增的片段长度仅 562 bp,因而扩增反应对模板

DNA 分子大小的质量要求不高,从而使得这个标记为中华鳖和砂鳖间的快速鉴别提供了一种准确、可靠、易于操作的分子鉴定途径。从中华鳖、砂鳖线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段碱基的显著差异和 *MspI* 酶切位点的变化,可以进一步证明砂鳖是不同于中华鳖的鳖属一新种。

参考文献:

- [1] 周工健,张轩杰,方志刚. 鳖属一新种研究初报[J]. 湖南师范大学学报,1991,14(4):379-382.
- [2] Yoshinori Kumazawa, Mutsumi Nishida. Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles[J]. Mol Biol Evol, 1999,16(6):784-792.
- [3] Mindell D P, Sorenson M D, Dimcheff D E, et al. Interordinal relationships of birds and other reptiles based on whole mitochondrial genomes[J]. Syst Biol, 1999, 48(1):138-152.
- [4] 张辉,吴清江. 一种改进的鱼类线粒体 DNA 的快速制备方法[J]. 水生生物学报,1997,21(3):281-283.
- [5] Honda M H, Ota M, Kobayashi, et al. Phylogenetic relationship of Australian skinks of the Mabuya group (Reptilia: Scincidae) inferred from mitochondrial DNA sequence [J]. Genes Genet Syst, 1999,74(4):135-139.
- [6] 张秀梅,高天翔,王溪宏. 冲绳日本绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 序列的研究[J]. 湛江海洋大学学报,2000,20(2):11-15.
- [7] Cann R C, Stoneking M, Wilson A C. Mitochondrial DNA and human evolution [J]. Nature, 1987,325:31-35
- [8] Young W P, Wheeler P A, Coryell V H, et al. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids [J]. Genetics, 1998,148:839-850.
- [9] Cronin M A, Spearman W J, Wilmot R L, et al. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) deleted by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1993, 50: 708-715.
- [10] Stepien C A, Hubers A N, Skidmore J L. Diagnostic genetic markers and evolutionary relationships among invasive dreissenoid and corbiculoid bivalves in North America: phylogenetic signal from mitochondrial 16S rDNA [J]. Mol Phylogenet Evol, 1999, 13(1):31-49.
- [11] 孙红英,周开压,陆健健,等. 中国大陆绒螯蟹线粒体 16S rDNA 序列变异与分子鉴定标记[J]. 自然科学进展,2002,12(5):485-490.
- [12] Ana c Ópedes, Teresa Garcia, Esther Carrera, et al. Genetic differentiation between sole (*Solea solea*) and Greenland halibut (*Reinhardtius hippoglossoides*) by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment[J]. Sci Food Agric, 2000, 80: 29-32.
- [13] Angel S Comesa a, Paz Abella, Andr é Sanjuan. Molecular identification of five commercial flatfish species by PCR-RFLP analysis of a 12S rRNA gene fragment [J]. Sci Food Agric, 2003, 83:752-759.