

三种鳖线粒体 DNA 细胞色素 b 基因序列的比较分析

陈合格 刘文彬 李建中 张轩杰

(湖南师范大学生命科学学院,长沙 410081)

摘要:对中华鳖、砂鳖和山瑞鳖线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因进行了引物设计、PCR 扩增、序列测定和 PCR-RFLP (Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism) 分析。研究结果表明中华鳖、砂鳖与山瑞鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因的序列全长相同,均为 1140bp,其 A、C、G、T 含量相似,分别为 378 个(33.2%)、322 个(28.2%)、122 个(10.7%)、318 个(27.9%)、373 个(32.7%)、324 个(28.4%)、124 个(10.9%)、319 个(28.0%)、380 个(33.3%)、330 个(28.9%)、127 个(11.1%)、303 个(26.7%)。同源性及序列差异率分析表明:中华鳖与砂鳖 *b* 基因序列的同源性为 92.3%,中华鳖、山瑞鳖的为 85.0%,砂鳖、山瑞鳖的为 84.1%;中华鳖与砂鳖 *b* 基因核苷酸序列间的差异率为 7.7%,中华鳖、山瑞鳖间的序列差异率为 15.0%,砂鳖、山瑞鳖间的序列差异率为 15.9%,而中华鳖、砂鳖、山瑞鳖各自个体间的序列差异率分别为 2.37%、0.88% 和 0.18%,种间差异显著。用内切酶酶切分析其扩增产物,结果表明:用内切酶 *Nde* 可准确鉴别砂鳖,而用内切酶 *Bam*H 则可准确鉴别山瑞鳖。内切酶 *Nde* 和 *Bam*H 的联用分析,可使这三种鳖在分子水平都得到明确的鉴定。从三种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因核苷酸序列的显著差异和酶切位点的变化,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;山瑞鳖;细胞色素 *b*;PCR-RFLP 分析;分子鉴定标记

中图分类号:Q173 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-3207(2006)04-0380-06

中华鳖 (*Pelodiscus sinensis*) 是中国重要的特种经济动物,其隶属于龟鳖目 (Testudinata)、鳖科 (Trionychidae)、鳖属 (*Pelodiscus*)。山瑞鳖^[1] (*Palea steindachneri*) 俗称瑞鱼、山瑞,在国家重点保护野生动物名录中被列为国家级保护动物,其一般形态与中华鳖极为相似,隶属于龟鳖目、鳖科、山瑞鳖属 (*Palea*)。传统观点认为,中国鳖属动物仅有中华鳖一种。1991 年,周工健等在对湖南省鳖资源进行实地调查时,发现了一种与现有鳖种资料介绍完全不同的新种——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—300g,且在外形、骨骼、繁殖习性和生活习性,以及生化遗传学指标等方面与中华鳖均存在明显的差异,并判定砂鳖为鳖属一新种^[2]。如能从分子水平进一步予以证实并找到一个准确可靠的鉴别方法来有效区分中华鳖、砂鳖与山瑞鳖,对于这 3 个不同种鳖的种苗区分、资源保护及合理开发利用具有重要意义。

动物线粒体 DNA (mtDNA) 呈严格的母性遗传方式,这样 1 个个体就能代表一个母系集团,因而只需少量材料就能反映群体的遗传结构,便于进行群体分析。随着分子生物学的发展,动物线粒体 DNA 上的细胞色素 *b* (cytochrome *b*, *Cytb*) 基因因其进化速度适中被认为是探讨近缘种间和种内遗传分化程度的良好指标,近年来被广泛应用于两栖类、爬行类、鱼类等的系统发育、种类鉴别等的研究^[3-5]。本研究以中华鳖、砂鳖和山瑞鳖为研究材料,进行了 mtDNA *Cytb* 基因的引物设计、PCR 扩增及其序列测定,分析了 3 种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因核苷酸序列间的差异及其酶切位点的差异情况,为确定它们的种间遗传关系和分子方法分类提供了实验依据,获得了 3 种鳖的分子鉴定标记。

1 材料与方法

1.1 材料来源 中华鳖 12 只取自湖南省中华鳖原种场,5 只购买于新一佳超市;17 只野生砂鳖中的 7

收稿日期:2005-10-29;修订日期:2006-01-14

基金项目:农业部《中华鳖标准》(编号:1999-Q-1603161)项目资助

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

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

只取自常德市,其余 10 只取自郴州市安仁县永乐江;3 只野生山瑞鳖全部取自广西省南宁市。

1.2 引物设计 参照平鳖(*Dogania subplana*, 登录号 NC-002780)、海龟(*Chelonia mydas*, 登录号 AB012104)及锦龟(*Chrysemys picta*, 登录号 AF069423)线粒体 DNA *Cytb* 基因两侧 *tRNA-Glu*、*tRNA-Thr* 基因序列,选取其保守区设计用于扩增 3 种鳖 *Cytb* 基因的引物 C-F: GGACTYTAACCAAGACCAATG 和 C-R: TCAA-TCTTTGGTTTACAA GACC,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 *Cytb* 基因的 PCR 扩增 将中华鳖、砂鳖和山瑞鳖放血后,立即取新鲜的肝脏进行基因组 DNA 的提取,具体操作参照张辉等^[6]的方法稍有改进,测定浓度后 4 ℃ 存放。dNTP, *Taq* 酶及反应的 Buffer 和内切酶 *Sal*、*Xba* 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 μ L,其中: *Taq* 酶 1U;浓度为 1mmol/L 的 dNTP 5 μ L;20mol/L 的上、下游引物各 1.0 μ L;DNA 模板约 100ng。使用美国 AB 公司的 GeneAmp PCR System2700 PCR 仪进行扩增,循环参数为:94 ℃ 预变性 5min,然后进入如下循环:94 ℃ 50s,52 ℃ 45s,72 ℃ 1min 20s,循环 35 次,循环结束后,72 ℃ 延伸 10min,于 4 ℃ 保存。取 5 μ L PCR 产物用 1.2% 琼脂糖凝胶,5V/cm,进行电泳检测。

1.4 连接、转化反应及序列测定 将割胶纯化后的 PCR 产物分别与 PMD 18-T 载体(大连宝生物产品)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 *Sal*、*Xba* 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(Sangon)进行序列测定。

1.5 限制性内切酶酶切位点分析与 PCR-RFLP 检测 基于中华鳖、砂鳖和山瑞鳖 *Cytb* 基因间的序列差异,用 Jellyfish(version 1.4)软件分析三种鳖的酶切位点差异情况,确定 *Nde* 是可用于 PCR-RFLP 方法鉴别砂鳖的限制性内切酶,*Bam*H 可被用来鉴别山瑞鳖。并通过分析限制性核酸内切酶 *Nde*、*Bam*H 的识别位点在各自序列中所处的位置,分别计算 3 种鳖 PCR 产物酶切后的片段长度。用内切酶 *Nde*、*Bam*H 分别对 17 只中华鳖、17 只砂鳖和 3 只山瑞鳖扩增后的 PCR 产物进行酶切分析,酶切体系为 20 μ L,其中:10 \times Buffer 2 μ L,乙酰化 BSA 2 μ L,PCR 产物 5 μ L,内切酶 5U,余用灭菌 ddH₂O 补足,37 ℃ 酶切 3—4h,酶切产物用 1.2% 的琼

脂糖凝胶,5V/cm 进行电泳分离约 1h,EB 染色,然后用凝胶成像系统扫描并保存结果。在经过 PCR-RFLP 检测的中华鳖、砂鳖和山瑞鳖中,各选取一只进行 *Cytb* 基因的克隆测序,以检测 PCR-RFLP 鉴定标记的可靠性。

2 结果

2.1 中华鳖、砂鳖和山瑞鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因的 PCR 扩增

利用参照平鳖、海龟、锦龟线粒体 DNA *tRNA-Glu*、*tRNA-Thr* 基因相应序列的保守区设计的引物进行中华鳖、砂鳖和山瑞鳖 mtDNA *Cytb* 全基因的 PCR 扩增,得到了高效扩增的清晰的目的条带,且空白对照实验未出现扩增(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应该具有普遍性,从而为本研究提供了分子基础。

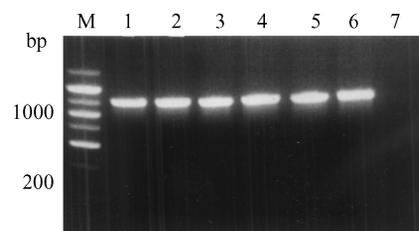


图 1 mtDNA *Cytb* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of mitochondrial DNA *Cytb* gene
M:200bp DNA 分子量标准 200bp DNA ladder marker;1—2. 中华鳖 *Pelodiscus sinensis*; 3—4. 砂鳖 *Pelodiscus axenaria*; 5—6. 山瑞鳖 *Palea steindachneri*; 7. 空白对照 blank control

2.2 三种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因全序列的测定及分析

经测序中华鳖、砂鳖和山瑞鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因扩增序列长度相同,均为 1253bp (base pair,包括 *tRNA-Glu*、*tRNA-Thr* 基因的部分序列和 *Cytb* 基因序列),其中 *Cytb* 基因全长均为 1140bp。统计结果显示其 A、C、G、T 含量相似,分别为 378 个(33.2%)、322 个(28.2%)、122 个(10.7%)、318 个(27.9%);373 个(32.7%)、324 个(28.4%)、124 个(10.9%)、319 个(28.0%);380 个(33.3%)、330 个(28.9%)、127 个(11.1%)、303 个(26.7%)。用 Jellyfish 软件分析三种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因全序列的同源性、种间及种内个体间核苷酸的差异率,结果显示:中华鳖与砂鳖此基因序列的同源性为 92.3%,中华鳖、山瑞鳖的为 85.0%,砂鳖、山瑞鳖的为 84.1%;中华鳖、砂鳖序列

间的差异率为 7.7%，中华鳖、山瑞鳖间的序列差异率为 15.0%，砂鳖、山瑞鳖间的序列差异率为 15.9%；而中华鳖、砂鳖、山瑞鳖各自个体间的序列差异率分别为 2.37%、0.88% 和 0.18%。利用 BLAST 与 GenBank 中线粒体 DNA 序列进行比对，结果表明其与其

他物种 *Cytb* 基因序列有很高的同源性。用 ClustalW (1.82) 进行 *Cytb* 基因全序列间的在线比对 (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/index.html>)，比对结果见图 2。目前这三个序列已提交 GenBank (登录号分别为：AY583692、AY583693 和 AY743417)。

```

a      .....60 ATGGCCACCAATCTACGAAAACCCACCCAATAATTAATAATCATTAACTACTACTAATT 120
b      .....60 ATGGCCACCAATCTACGAAAATCCCACCCAATGATTAATAATCATTAACTACTACTAATT 120
c      .....60 ATGGCCATCAACCTACGAAAATCCCACCCAATAATTAATAATCATTAACTACTACTAATC 120
                * * * * *
a      121 GACCTACCAAGTCCATCCAACATTTCCATTTGATGAACTTTGGATCATTATTAGGAGCC 180
b      121 GACCTACCAAGTCCATCCAACATTTCCATTTGATGAACTTTGGATCACTATTAGGAGCT 180
c      121 GACCTACCAAGGCCATCCAACATCTCCACTTGATGAACTTCGGATCCCTATTAGGTGCC 180
                * * * * *
a      .....301 CGAACATACACGCCAACGGAGCCTCACTATTCTTCATGTGTATCTACCTACATATTGGA 360
b      .....301 CGAACATACATGCTAATGGCGCCTCACTATTCTTCATATGATTTATCTACACATTGGA 360
c      .....301 CGAACACACATGCAAATGGAGCCTCACTATTCTTCATGTGCATCTACCTTCACATCGGA 360
                * * * * *
a      361 CGAGGCCTATACTATGGATCCTACCTTTATAAACAACCTGAAACATTGGTGTAAATCCTC 420
b      361 CGAGGTCTATACTACGGATCCTACCTTTATAAACAACCTGAAACATTGGTGTAAATCCTC 420
c      361 CGGGGCCTATATTACGGCTCATACTGTATAAACAACCTGAAACACAGGAGTAATCCTC 420
                * * * * *
a      .....1141 TTTATCCTACTAGTATTAATACCAATCTCAAACATAATTGAAAATAAAAACAACCAATTA 1200
b      .....1141 ATAATCCTATTAGTACTAATACCAATCTCAAACATAATTGAAAATAAAAACAACCAACTAA 1200
c      .....1141 ACAATTTACTCATACTCATAACCAATCTCAAACATAATTGAAAACAAAATCATAAACTAA 1200
                *** ** * ** * * * * *

```

图 2 中华鳖、砂鳖和山瑞鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因全序列(1140bp)

a. 中华鳖 *Pelodiscus sinensis*; b. 砂鳖 *Pelodiscus axenaria*; c. 山瑞鳖 *Palea steindachneri*

GGATCC 示 *BamH* 的识别序列, CATATG 示 *Nde* 的识别序列, * 表示不同的核苷酸位点

Fig. 2 The complete nucleotide sequence (1140bp) of mitochondrial DNA *cytb* gene of a, b and c GGATCC shows the recognize sequence of *Msp* enzyme, CATATG shows the recognize sequence of *Nde* enzyme, * shows different nucleotide sites

2.3 内切酶酶切扩增产物片段大小的计算和 PCR-RFLP 检测

用 Jellyfish 软件对三种鳖 *Cytb* 基因的核苷酸序列进行限制性酶切分析, 预测结果显示在测定的 1253bp 片段中(图 2): 中华鳖、山瑞鳖的序列中无 *Nde* 酶的识别位点, 从而将在电泳图上仅能见到一个片段, 而砂鳖的在 336—341bp 处有一个 *Nde* 酶的识别位点, 使得砂鳖的 PCR 产物经 *Nde* 酶切后, 将会形成大小分别为 916bp、337bp 的 2 个片段(图 3, 泳道 2 和 3 最后面的条带为 PCR 产物未被完全酶切的结果); 中华鳖、砂鳖的序列中在 376—381bp 处均有一个 *BamH* 酶的识别位点, 使得酶切后将会形成大小分别为 877bp、376bp 的 2 个片段, 而山瑞鳖的 *BamH* 酶的识别位点位于其序列的 163—168bp 处, 使酶切后形成的 2 个片段的大小

将分别为 1090bp、163bp, 这有别于中华鳖、砂鳖的相应片段被酶切后的结果(图 4)。三种鳖的 PCR-RFLP 检测结果(图 3 和图 4, 最前面的带为引物二聚体)显示, 这和用 Jellyfish 软件预测的结果相一致。

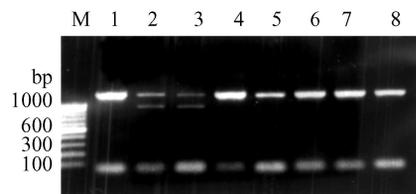
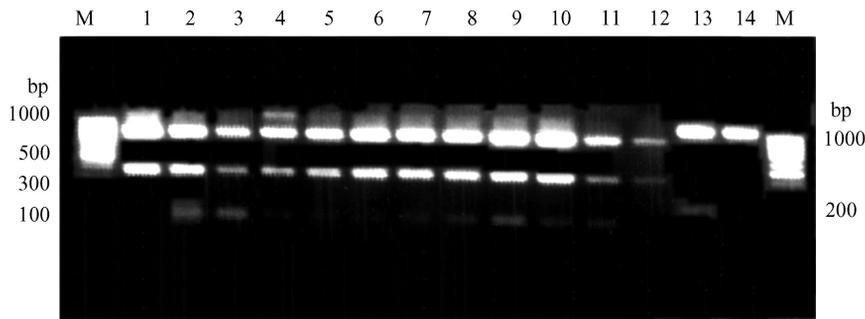


图 3 MIDNA *Cytb* 基因 *Nde* 酶切图

Fig. 3 Restriction results of *Cytb* gene by using *Nde*

M: 100bp DNA 分子量标准 100bp DNA ladder marker; 1. 中华鳖的 PCR 产物 PCR amplification results of *P. sinensis*; 2—3. 砂鳖 *P. axenaria*; 4—5. 山瑞鳖 *P. steindachneri*; 6—8. 中华鳖 *P. sinensis*

图4 MtDNA *Cytb* 基因 *Bam*H 酶切图Fig. 4 Restriction results of Mt DNA *Cytb* gene by using *Bam*HM:100bp DNA 分子量标准 100bp DNA ladder marker; 1—6. 中华鳖 *P. sinensis*; 7—12. 砂鳖 *P. axenaria*; 13—14. 山瑞鳖 *P. steindachneri*

3 讨论

3.1 三种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因序列间的比较分析

对中华鳖、砂鳖和山瑞鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因的测序结果表明,其全长均为 1140bp。A + T 含量的统计结果显示,三种鳖 mtDNA *Cytb* 基因序列中 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)。这与其他物种有一致的结果,这提示在今后若进行线粒体 DNA 的限制性片段长度多态性(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。用 Jellyfish 软件分析三种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因全序列的差异率,结果表明中华鳖、砂鳖序列间的差异率为 7.7%,中华鳖、山瑞鳖间的序列差异率为 15.0%,砂鳖、山瑞鳖间的序列差异率为 15.9%;而中华鳖、砂鳖、山瑞鳖各自

个体间的序列差异率分别为 2.37%、0.88% 和 0.18%,这明显低于种间的序列差异率,且种间差异显著;其差异程度和将中华鳖、砂鳖归为一属,而将山瑞鳖归为另一属相一致。中华鳖个体间的序列差异率较大(2.37%),这可能与中华鳖分布的范围广、存在不同的地方种群及部分中华鳖取自养殖群体等有关。李思发等^[7]对华东地区中华鳖 3 个地方种群的 mtDNA *Cytb* 基因进行分析时,就发现浙江绍兴、江苏南京和山东青岛中华鳖群体间存在显著的遗传差异($P < 0.05$);刘至治等^[8]对 5 个不同水系的中华鳖进行 RAPD 分析时,亦发现不同种群之间存在较丰富的遗传多样性。而砂鳖和山瑞鳖个体间的序列差异率较小,分别为 0.88% 和 0.18%,这与它们的分布范围相对较窄和材料来源于相邻或同一个地方,且这些资源遭大量捕杀而导致的遗传多样性贫乏有关。

表 1 中华鳖、砂鳖、山瑞鳖、平鳖、海龟、锦龟线粒体 DNA *Cytb* 基因的碱基组成(%)Tab. 1 Nucleotide composition of mitochondrial DNA *Cytb* gene of *T. sinensis*, *T. axenaria*, *P. steindachneri*, *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> | 33.2 | 27.9 | 10.7 | 28.2 | 61.1 | 1140 |
| 砂鳖 <i>P. axenaria</i> | 32.7 | 28.0 | 10.9 | 28.4 | 60.7 | 1140 |
| 山瑞鳖 <i>P. steindachneri</i> | 33.3 | 26.7 | 11.1 | 28.9 | 60.0 | 1140 |
| 平鳖 <i>D. subplana</i> | 33.5 | 24.9 | 10.6 | 31.0 | 58.4 | 1140 |
| 海龟 <i>C. mydas</i> | 31.6 | 25.5 | 11.5 | 31.4 | 57.1 | 1143 |
| 锦龟 <i>C. picta</i> | 31.0 | 27.1 | 11.2 | 30.7 | 58.1 | 1140 |

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原因,这些方法在实际应用中都存在一定的局限。如同工酶鉴定标记存在个体特异性

和组织特异性,会直接影响到检测结果的可靠性;RAPD 鉴别技术重复性较差,对 DNA 模板的质量要求很高,待测样品之间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。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^[9-16]。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的量很少,尤其适用于物种早期发育阶段的鉴别研究。孙红英等^[17]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;Angel s comesa a 等^[18]利用线粒体 DNA 12S rRNA 部分片段的 PCR-RFLP 标记,对商用比目鱼 5 个不同种进行了准确的鉴别。Carrera E 等^[12]和 Céspedes A 等^[13-14]利用细胞色素 *b* 基因的 PCR-RFLP 标记,分别对大西洋鲑、虹鳟和不同种的比目鱼进行了准确的鉴别。王加连等^[19]在测定中国水域真海豚 mtDNA 细胞色素 *b* 基因和控制区部分序列的基础上,发现中国水域的真海豚在分类上归属于长喙真海豚;杨光等^[20]在测定采自浙江瑞安市的一头须鲸类标本 mtDNA 细胞色素 *b* 基因和控制区部分序列的基础上,发现其可能是所罗门群岛的小布氏鲸。但是把线粒体 DNA *Cytb* 基因作为龟鳖类动物不同种的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。*Nde*、*Bam*H 两种酶的并用分析,可形成三种鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因经 *Nde* 酶切后片段多少及经 *Bam*H 酶切后片段大小的差异,因而可对中华鳖、砂鳖和山瑞鳖进行准确的鉴别。用 PCR-RFLP 方法对三种鳖进行检测,结果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为 1253bp,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、砂鳖和山瑞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、砂鳖和山瑞鳖线粒体 DNA *Cytb* 基因全序列的碱基显著差异和内切酶 *Nde*、*Bam*H 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] Zhao E M. Coloured atlas of Sichuan reptiles[M]. Beijing: Chinese Forestry Publishing House. 2003[赵尔宓. 四川爬行类原色图鉴.

北京:中国林业出版社. 2003]

- [2] Zhou G J, Zhang X J, Fang Z G. An original research on a new species in *Pelodiscus* [J]. *Acta Sci. Nat. Univ. Normal Hunan*, 1991, **14**(4):379—382[周工健,张轩杰,方志刚. 鳖属一新种研究初报. 湖南师范大学学报,1991, **14**(4):379—382]
- [3] Meyer A, Kocher T D, Basasibwaki P. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequence[J]. *Nature*, 1990, **347**:550—553
- [4] Song C B, Near T J, Page L M. Phylogenetic relations among percoid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence data[J]. *Mol. Phylogenet Evol.*, 1998, **10**(3):343—353
- [5] Bernardi G, Powers D A. Molecular phylogeny of the prickly shark, *Echinorhinus cookei*, based on a nuclear (18S rRNA) and a mitochondrial (cytochrome *b*) gene [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1992, **1**(2):281—283
- [6] Zhang H, Wu Q J. Modified method for the rapid isolation of mitochondrial DNA from fishes[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, **21**(3):281—283[张辉,吴清江. 一种改进的鱼类线粒体 DNA 的快速制备方法. 水生生物学报,1997, **21**(3):281—283]
- [7] Li S F, Lü G Q, Li C H, et al. MtDNA polymorphism analysis of local populations of soft-shelled turtle from East China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 1997, **4**(3):1—6[李思发,吕国庆,李晨虹,等. 华东地区中华鳖地方种群 mtDNA 多态分析. 中国水产科学,1997, **4**(3):1—6]
- [8] Liu Z Z, Cai W Q, Li S F. Analysis of genetic variations of five populations in *Trionyx senensis* by RAPD[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2004, **28**(2):119—126[刘至治,蔡完其,李思发. 中华鳖五群体遗传变异的 RAPD 分析. 水产学报,2004, **28**(2):119—126]
- [9] Xiao W, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(4):384—391[肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 2000, **24**(4):384—391]
- [10] Cronin M A, Spearman W J, Wilmut R L, et al. Mitochondrial DNA variation in Chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products[J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1993, **50**:708—715
- [11] Bouchon D, Souty-Grosset C, Raimond R. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Panaeus monodon* Fabricius and *Panaeus japonicus* Bate [J]. *Aquaculture*, 1994, **127**:131—144
- [12] Carrera E, Garcá T, Céspedes A, et al. Identification of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using PCR amplification and restriction analysis of the mitochondrial cytochrome *b* gene[J]. *Food Prot*, 1998, **61**:482—486
- [13] Céspedes A, Garcá T, Carrera E, et al. Identification of flatfish species using polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis of the cytochrome *b* gene[J]. *Food Sci*, 1998, **63**:206—209
- [14] Céspedes A, Garcá T, Carrera E, et al. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a short fragment of the cytochrome *b* gene for identification of flatfish species[J]. *Food Prot*, 1998, **61**:1684—1685

- [15] Meyer R, H felein C, L thy J, *et al.* Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food[J]. *AOAC Int*, 1995, **78**:1542—1551
- [16] Unseld M, Beyermann B, Brandt P, *et al.* Identification of the species origin of highly processed meat products by mitochondrial DNA sequences[J]. *PCR Meth Appl*, 1995, **4**:241—243
- [17] Sun H Y, Zhou K Y, Lu J J, *et al.* Sequence divergence of mitochondrial DNA 16S rRNA of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis* and their molecular marker for identification[J]. *Progress in Natural Science*, 2002, **12**(5):485—490 [孙红英, 周开亚, 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. 自然科学进展, 2002, **12**(5):485—490]
- [18] 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* (online), 2003, **83**:752—759
- [19] Wang J L, Yang G, Liu H, *et al.* Application of Mitochondrial DNA Sequences in the Species Identification of Common Dolphins (*Genus Delphinus*) in Chinese Waters[J]. *Acta Theriologica Sinica*, 2003, **23**(2):120—126 [王加连, 杨光, 刘海, 等. 线粒体 DNA 序列分析在中国水域真海豚物种鉴定中的初步应用. 兽类学报, 2003, **23**(2):120—126]
- [20] Yang G, Liu H, Zhou K Y, *et al.* Identification of a *Balaenoptera edeni* Specimen by Using Mitochondrial DNA Sequences[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2002, **37**(4):35—38 [杨光, 刘海, 周开亚, 等. 用 MtDNA 序列鉴定一头小布氏鲸标本. 动物学杂志, 2002, **37**(4):35—38]

COMPARATIVE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL DNA CYTB GENE AND THEIR MOLECULAR IDENTIFICATION MARKERS IN THREE SPECIES OF SOFT TURILES

CHEN He-Ge, LIU Wen-Bin, LI Jian-Zhong and ZHANG Xuan-Jie

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

Abstract: The primers for *Pelodiscus sinensis*, *Pelodiscus axenaria* and *Palea steindachneri* were designed by using the sequences of mitochondrial DNA tRNA-Glu, tRNA-Thr gene of *Dogania subplana*, *Chrysemys picta* and *Chelonia mydas*, 1140 base pairs of mitochondrial DNA *cytb* gene were amplified and sequenced. The results show that the length of their sequences is the same, A, C, G, T contents are similar, the number of A, C, G, T is 378(33.2%), 322(28.2%), 122(10.7%), 318(27.9%) in *Pelodiscus sinensis*; 373(32.7%), 324(28.4%), 124(10.9%), 319(28.0%) in *Pelodiscus axenaria* and 380(33.3%), 330(28.9%), 127(11.1%), 303(26.7%) in *Palea steindachneri*. Based on their sequence data, analysis with the software of Jellyfish, we can know: the nucleotide percentage homology is 92.3% between *Pelodiscus sinensis* and *Pelodiscus axenaria*, 85.0% between *Pelodiscus sinensis* and *Palea steindachneri*, 84.1% between *Pelodiscus axenaria* and *Palea steindachneri*; the nucleotide percentage divergence is 7.7% between *Pelodiscus sinensis* and *Pelodiscus axenaria*, 15.0% between *Pelodiscus sinensis* and *Palea steindachneri*, 15.9% between *Pelodiscus axenaria* and *Palea steindachneri*, whereas the individual nucleotide percentage divergence is 2.37% in *Pelodiscus sinensis*, 0.88% in *Pelodiscus axenaria* and 0.18% in *Palea steindachneri*. Restriction endonuclease analysis based on sequence data of their DNA fragments revealed the presence of polymorphic sites for *Nde* and *Bam*H endonucleases. The restriction profiles obtained by agarose gel electrophoresis when amplicons were respectively cut with *Nde* and *Bam*H enzymes allowed the unequivocal molecular identification of *Pelodiscus axenaria*, *Palea steindachneri* and *Pelodiscus sinensis*. Based on their obvious nucleotide percentage divergence and the changes of polymorphic sites for *Nde* and *Bam*H endonucleases in their sequences, it from the molecular level suggests *Pelodiscus axenaria* is a new species in *Pelodiscus*.

Key words: *Pelodiscus sinensis*; *Pelodiscus axenaria*; *Palea steindachneri*; *Cytb* gene; PCR-RFLP assay; Molecular identification marker