

暗纹东方鲀线粒体细胞色素 b 及其侧翼 tRNA 基因的克隆与序列分析

邵爱华^{1,2}, 朱江¹, 陈葵¹, 史全良¹

(1. 苏州大学 生命科学学院, 江苏 苏州 215123; 2. 苏州科技学院 生物系, 江苏 苏州 215009)

摘要:以暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)肝脏的线粒体 DNA 为模板,按照红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)线粒体 DNA 序列设计合成特异引物进行 PCR 扩增,克隆并测定线粒体细胞色素 b(Cyt b)及其侧翼 tRNA 基因的全序列,结果显示,克隆的暗纹东方鲀 Cyt b 基因(1 137 bp)及其 5'端上游的 tRNA^{Glu}基因和 3'端下游的 tRNA^{Thr}基因序列共 1 327 bp,用 DNA 分析软件对暗纹东方鲀与 GenBank 中 10 个目 13 种鱼类的 Cyt b 序列进行比较分析,显示暗纹东方鲀与这些鱼类的 Cyt b 基因具有较高的同源性,与同属红鳍东方鲀的同源性最高,为 96.1%;与同目不同科的矛尾翻车鲀(*Masturus lanceolatus*)和翻车鲀(*Mola mola*)的同源性分别为 74.1%和 74.8%。tRNA^{Glu}基因由 69 个碱基组成,tRNA^{Thr}基因由 72 个碱基组成,与红鳍东方鲀相应 tRNA 的碱基组成完全相同。推定的这两种 tRNA 的二级结构都具有典型的三叶草型结构,各臂的碱基配对率高,稳定性好。根据暗纹东方鲀与其他 13 种鱼的 Cyt b 基因序列同源性所建立的进化树比较,结果与传统的分类地位基本吻合。

关键词:暗纹东方鲀;线粒体 DNA;细胞色素 b;系统学

中图分类号:Q959.468 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)06-0675-07

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)属硬骨鱼亚纲、鲀形目、鲀科、东方鲀属(*Takifugu*)^[1-3],系北太平洋西部地区分布的鱼类。东方鲀属约 22 种,多为中国特有的地方性种类,分布范围较窄、分化较大。由于东方鲀属鱼类个体变异大,近缘种间分化程度较低,甚至还可产生天然杂种,多年来在属以下分类上有许多不同的看法^[4-5]。迄今,东方鲀属的分类主要依据形态解剖学特征和细胞遗传学与生化遗传学研究成果,分子遗传学研究分类的成果不多^[6-11]。1995 年,东方鲀属的红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)正式被英国医学研究委员会接纳为新的模式动物^[12-13]。

自 20 世纪 80 年代以来,线粒体 DNA (mtDNA) 分析在动物进化遗传学、分子生态学、种群遗传结构分析、遗传多样性、物种及品系鉴定等方面得到了广泛应用^[14-15]。在国外,mtDNA 分析技术已用于鱼类种群遗传结构及品系鉴定的研究,国内研究者对哺乳动物的 mtDNA 有不少研究,对鱼类 mtDNA 物理图谱、基因定位、片段克隆和结构分析也有一些研究,但更多侧重于 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱分析。国

内对鱼类 mtDNA 的研究以鲤科、鲇科为多^[16-18],暗纹东方鲀 mtDNA 的研究还未见报道。

细胞色素 b (Cytochrome b, Cyt b) 是线粒体氧化呼吸链的重要成员,许多研究成果已证明, Cyt b 是研究种间、种内分子进化和系统发育最有用的基因之一。国内已有关于鱼类 mtDNA Cyt b 的研究报道^[19-21],但暗纹东方鲀 mtDNA Cyt b 的研究未见报道。本研究对暗纹东方鲀 mtDNA 的 Cyt b 进行克隆和序列分析,并与 GenBank 中多个目的鱼类 Cyt b 进行同源性比较分析,旨在进一步研究种群之间的关系、不同地理和水域之间的物种鉴定和特有种的保护,暗纹东方鲀自然种群的健康发展和养殖群体的不断改良提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验暗纹东方鲀购自苏州南门水产品市场。限制性内切酶、Premix Ex Taq 酶、DNA Fragment Recovery Kit、pMD18-T Vector 为 Takara 公司产品, DNaseI、RNase、连接酶及其他主要试剂为 Sigma 公

收稿日期:2005-03-01; 修订日期:2005-05-24。

基金项目:农业部行业标准资助项目(2002-04084)。

作者简介:邵爱华(1968-),女,讲师,硕士,从事水生动物分子生物学研究。E-mail:shah6892@yahoo.com.cn

通讯作者:朱江。Tel:0512-65880278。E-mail:sdajyz@hotmail.com

司产品,大肠杆菌 DH5 α 由苏州大学生物化学与分子生物学实验室保存。

1.2 暗纹东方鲀线粒体 DNA 的制备

活体解剖,取肝脏组织 2 g,mtDNA 的提取参考吴乃虎等^[18]的方法,对破膜条件及消除核 DNA 污染等方面加以改进,并用詹纳斯绿 B(Janus Green B)特异染色法跟踪和监测线粒体的提取。

1.3 暗纹东方鲀线粒体 Cyt b 基因的克隆与筛选

1.3.1 引物设计 参照红鳍东方鲀线粒体 DNA 序列(GenBank 登录号 AJ421455),选择位于 Cyt b 两侧保守性较高的区域,设计合成暗纹东方鲀 Cyt b 的 PCR 扩增引物:

上游引物 P₁:5'-GAAAAACAAGGCGATAAAACA-3'

下游引物 P₂:5'-CAAAAAGAAGGGACTTCAAC-3'

1.3.2 PCR 反应体系及条件 PCR 反应体系总体积为 25 μ L,其中 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L,dNTP 2 μ L,模板 DNA 5 μ L(约 1 μ g),P₁ 1 μ L,P₂ 1 μ L,加 ddH₂O 至 25 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,0 $^{\circ}$ C 3 min,加 Premix Ex Taq 0.2 μ L,每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,共 30 个循环,最后 1 次循环结束后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.3 扩增产物的回收及阳性克隆的筛选 扩增产物用 DNA Fragment Recovery Kit 纯化回收后,与 pMD18-T 载体进行连接反应,16 $^{\circ}$ C 过夜。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,于含氨苄青霉素的平板上生长过夜,挑选转化子,进行质粒提取和重组子筛选。PCR 扩增法和限制性内切酶酶切法鉴定目的片段的插入。

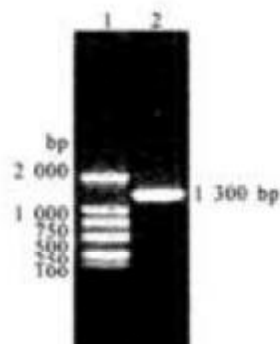


图 1A 暗纹东方鲀 Cyt b 基因的 PCR 扩增

1:DL2000 Marker; 2:扩增片段

Fig. 1A Cyt b PCR products of *T. fuscatus*

1:DL2000 Marker; 2:PCR products

上述操作方法参照 Sambrook 分子克隆手册^[22]。

1.4 序列测定和系统发育分析

选取 2 个经鉴定的重组质粒送上海博亚生物技术有限公司测序,测序仪为 ABI PRISMTM377 型。根据暗纹东方鲀线粒体 Cyt b 的序列,在 GenBank 数据库中有选择性地检索出其他 13 种鱼类的 Cyt b 序列(GenBank 登录号见表 1)。DNA 序列采用 Clustal X 软件进行比对,并将暗纹东方鲀 Cyt b 与 13 种鱼类的 Cyt b 进行核苷酸序列和氨基酸序列的同源性比较。DNASTAR 软件中 Megalign 计算碱基转换/颠换率和序列百分差异。应用 MEGA(version 2.0)中 Kimura's 2-Parameter 模型计算遗传距离,邻接法(NJ)和最大简约法(MP)构建分子系统树,分别采用 NJ 程序和 MP 程序,置信度(bootstrap)1000 次循环检查。

2 结果与分析

2.1 暗纹东方鲀线粒体 Cyt b 及其侧翼 tRNA 基因的扩增和克隆

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示有一条清晰明亮的区带,分子大小约 1.3 kb。此扩增产物经纯化回收后与 T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选重组子,提取质粒。重组质粒经 EcoR I 和 Hind III 酶切,结果显示除 2.7 kb 的载体外,还有一条约 1.3 kb 的片段。以重组质粒为模板,P₁-P₂为引物,扩增到 1.3 kb 的片段。上述结果证明,所挑选的质粒有目的片段插入(图 1A,图 1B)。

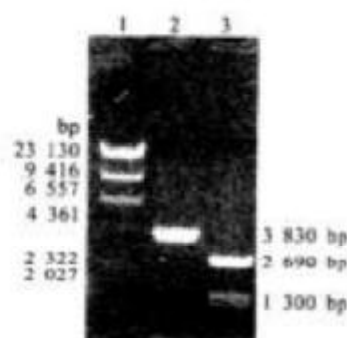


图 1B 重组质粒的 DNA 酶切鉴定

1: λ -Hind III DNA Marker;

2:EcoR I; 3:EcoR I/Hind III

Fig. 1B Identification of pMD18-T-Cyt b

表1 暗纹东方鲀与其他13种鱼类 Cyt b 基因序列及推测的氨基酸序列同源性比较

Tab.1 Comparison of homology among Cyt b from fish mtDNA

分类地位 Taxonomy	种类 Species	GenBank 登录号 Accession No.	核苷酸序列同源性/% Nucleotide homology	氨基酸序列同源性/% Amino acid homology
鲀形目	<i>Takifugu rubripes</i>	AJ421455	96.1	96.7
鲀形目	<i>Masturus lanceolatus</i>	Ap006239	74.8	86.3
鲀形目	<i>Mola mola</i>	AF006238	74.1	85.7
鲈形目	<i>Thunnus thynnus</i>	AF003091	73.5	84.4
鲤形目	<i>Cyprinus carpio</i>	X61010	73.1	83.8
鲻形目	<i>Anguilla japonica</i>	AB038556	72.5	84.1
鲀形目	<i>Gambusia affinis</i>	AF004422	71.1	84.1
鲈形目	<i>Rhamdia quelen</i>	AY036744	70.8	80.6
鲈形目	<i>Engraulis japonicus</i>	AB040676	70.3	82.8
鲈形目	<i>Paralichthys olivaceus</i>	AB028664	69.5	83.5
鲈形目	<i>Salmo salar</i>	U12143	67.9	81.2
鲈形目	<i>Acipenser stellatus</i>	AJ585050	66.6	77.9
角鲨目	<i>Squalus acanthias</i>	Y18143	64.2	74.1

表2 暗纹东方鲀与其他13种鱼类线粒体基因组 Cyt b 基因碱基组成及编码子比较

Tab.2 Comparison of base composition and codons of Cyt b genes of *T. fasciatus* and the other species

目 Order	种类 Species	序列长度/bp Length	编码氨基酸数 Number of AA	起始子 Initiator	终止子 Terminator	(A+T)/%
鲀形目 Tetraodontiformes	<i>Takifugu fasciatus</i>	1 137	378	ATG	TAA	55
鲀形目 Tetraodontiformes	<i>Takifugu rubripes</i> *	1 137	378	ATG	TAA	55
鲀形目 Tetraodontiformes	<i>Mola mola</i> *	1 141	380	ATG	T	53
鲀形目 Tetraodontiformes	<i>Masturus lanceolatus</i> *	1 141	380	ATG	T	52
鲈形目 Perciformes	<i>Thunnus thynnus</i> *	1 141	380	ATG	T	54
鲤形目 Cypriniformes	<i>Cyprinus carpio</i> *	1 140	380	ATG	T	56
鲻形目 Anguilliformes	<i>Anguilla japonica</i> *	1 140	379	ATG	TAA	58
鲀形目 Cyprinodontiformes	<i>Gambusia affinis</i> *	1 140	379	ATG	TAA	55
鲈形目 Siluriformes	<i>Rhamdia quelen</i> *	1 138	379	ATG	T	56
鲈形目 Clupeiformes	<i>Engraulis japonicus</i> *	1 141	380	ATG	T	56
鲈形目 Pleuronectiformes	<i>Paralichthys olivaceus</i> *	1 141	380	ATG	T	55
鲈形目 Salmoniformes	<i>Salmo salar</i> *	1 141	380	ATG	T	55
鲈形目 Acipenseriformes	<i>Acipenser stellatus</i> *	1 141	380	ATG	T	53
角鲨目 Squaliformes	<i>Squalus acanthias</i> *	1 146	381	ATG	TAA	60

* 线粒体基因组 Cyt b 基因碱基组成信息来自 GenBank, 详见表1。

* The data are from GenBank (see table 1).

用 DNA 分析软件 MEGA 将暗纹东方鲀线粒体 Cyt b 的序列及其推导的氨基酸序列以软骨鱼亚纲白斑角鲨为外群, 与硬骨鱼亚纲 10 个目 12 种鱼的 Cyt b 核苷酸序列和推导的氨基酸序列比较, 结果显示具有良好的同源性(表1); 与硬骨鱼亚纲 9 个目的核苷酸序列之间的同源性在 66.6%~96.1%; 与白斑角鲨(*Squalus acanthias*)的同源性最小, 为 64.2%; 与同目翻车鲀属的矛尾翻车鲀(*Masturus*

lanceolatus) 和翻车鲀(*Mola mola*) 的同源性为 74.8%和 74.1%, 而与同属的红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*) 的同源性最高, 达 96.1%。氨基酸序列的同源性比较也显示了相似的结果, 与同纲 10 个目之间的同源性在 77.9%~96.7%; 与白斑角鲨的同源性最小, 为 74.1%; 与矛尾翻车鲀和翻车鲀的同源性分别为 86.3%和 85.7%; 而与红鳍东方鲀的同源性最高, 为 96.7%。

与同目其他3种鲀类相比(表3),暗纹东方鲀与红鳍东方鲀 Cyt b 序列同源性最高,达 96.1%;替换率最低,为 3.69%,转换/颠换值为 7.40。暗纹东

方鲀与同源性较低的矛尾翻车鲀和翻车鲀的替换率较高,分别为 21.1%和 21.7%,转换/颠换值分别为 1.22 和 1.23。

表3 暗纹东方鲀与同目3种鱼类 Cyt b 基因之间的碱基替换
Tab.3 Numbers and frequencies of nucleotides substitution of Cyt b genes between
T. fasciatus and the other three *Tetraodontiformes* species

碱基替换比较 Nucleotides substitution		碱基数 Number of base		
		红鳍东方鲀 <i>Takifugu rubripes</i>	翻车鲀 <i>Mola mola</i>	矛尾翻车鲀 <i>Musturus lanceolatus</i>
转换	A $\longleftrightarrow$ G	11	42	45
TS	C $\longleftrightarrow$ T	26	94	87
转换总数 Total of TS		37	136	132
颠换	A $\longleftrightarrow$ C	4	59	57
TV	A $\longleftrightarrow$ T	0	35	32
	G $\longleftrightarrow$ C	1	12	12
	G $\longleftrightarrow$ T	0	5	7
颠换总数 Total of TV		5	111	108
替换总数 Total of nucleotides substitution		42	247	240
碱基总数 Total of bases		1 137	1 137	1 137
替换率/% Frequencies of nucleotides substitution		3.69	21.7	21.1
转换/颠换 TS/TV		7.40	1.23	1.22

2.2.2 以 Cyt b 基因为基础的分子系统进化树的构建 从同源性比较可以看出,利用鱼类的 Cyt b 基因进行鱼纲目间的分子系统分析是适宜的。应用 MEGA 中 Kimura's 2-Parameter 模型计算遗传距离,由 NJ 法和 MP 法构建线粒体 Cyt b 基因的分子系统树,枝上的数值是 bootstrap 1 000 次后的置信值。构建的 NJ 树和 MP 树在拓扑结构上基本一致。NJ 法构建的分子系统树将硬骨鱼亚纲的 13 种鱼分成两组:鲈形目、鲤形目、鲱形目和鳊形目 4 个目聚为一组;鲑形目、鲱形目、鲱形目、鲱形目、鲱形目、鲱形目 6 个目为另一组;后一组中鲑形目、鲱形目和鲱形目聚为一组,鲱形目、鲱形目和鲱形目为另一组。由构建的 MP 分子系统树(图 3)可见,在脊椎动物亚门中,硬骨鱼亚纲和软骨鱼亚纲是最早分歧的两个系统,从软骨鱼最早分化出鲈形目、鲤形目、鲱形目和鳊形目,继而分歧演化出鲑形目、鲱形目和鲱形目的一支,最后是鲱形目、鲱形目和鲱形目的一支。鲱形目分为鲱科和翻车鲀科两个明显的分支。由此可见,根据 Cyt b 序列获得的分类结果与

Nelson (1976,1984)^[23]提出的分类系统结果、系统发育演化基本吻合。

2.3 tRNA 基因

和其他动物一样,暗纹东方鲀线粒体 Cyt b 基因两侧各有 1 个 tRNA 基因,其中,5'端上游的 tRNA^{Glu}基因由 69 个碱基组成,3'端下游的 tRNA^{Thr}基因由 72 个碱基组成,与红鳍东方鲀相应 tRNA 基因的碱基组成完全相同。tRNA^{Glu}基因与矛尾翻车鲀和翻车鲀的同源性均为 85.5%。tRNA^{Thr}基因与矛尾翻车鲀和翻车鲀的同源性均为 86.1%。推定的这两种 tRNA 的二级结构表明它们都具有典型的三叶草型结构。tRNA^{Thr}各臂的碱基配对率比 tRNA^{Glu}高,因此,推测结构上 tRNA^{Thr}比 tRNA^{Glu}更稳定。

3 讨论

动物线粒体基因组蛋白质基因中,Cyt b 和 COI、COII、COIII 等基因最保守,而 NDI、ATPase 6 和 ATPase 8 等基因的变异相对较大^[24]。本研究的

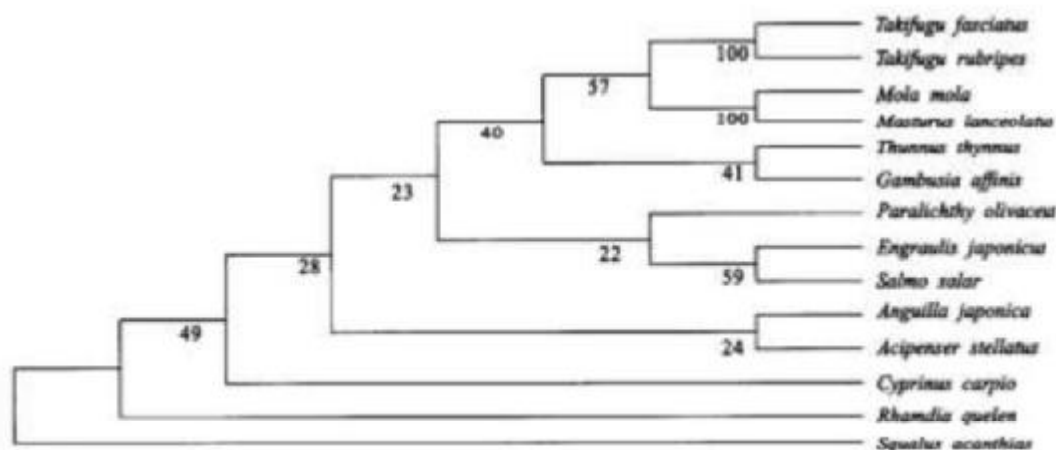


图3 根据暗纹东方鲀等14种鱼Cyt b基因序列构建的分子系统树(MP树)

Fig.3 Phylogenetic trees derived from Cyt b Nucleotide sequences (MP Tree) of *T. fasciatus* and the other 13 species of fishes

同源性分析同样表明,Cyt b基因具有较高的保守性。因此,用Cyt b基因进行东方鲀属与其他硬骨鱼类的进化分析是适宜的。以Cyt b基因序列为基础构建的鱼纲10个目14种鱼类的分子进化树,显示了这些物种的演化关系。

已报道在中国东方鲀属有22个种^[4-5,25]。成庆泰等^[4]依据东方鲀属鱼类头骨的形态特征,结合外部形态和地理分布,深入探讨了其中15个种的种间关系,将东方鲀属的15个种分为两大支,暗纹东方鲀和红鳍东方鲀分属地理分布局限于北太平洋西部一支的第4和第5小支。本研究结果表明,上述2种鱼类Cyt b核苷酸序列之间的同源性(96.1%)和氨基酸序列间的同源性(96.7%)比较以及分子系统树的研究结果与成庆泰等的结论一致。

暗纹东方鲀线粒体Cyt b基因共1137 bp,以ATG为起始密码子,TAA为终止密码子,编码378个氨基酸。在比较的13种硬骨鱼类的Cyt b序列中,以TAA为终止密码子的还有红鳍东方鲀和鳗鲡目的*Anguilla*,而其他鱼类的Cyt b以T为终止密码子,这种不完整的终止密码子在转录过程中需添加polyA后才形成终止密码子。除鲎形目的*Rhamdia quelen*在第10~12位碱基缺失外,其他鱼类的Cyt b序列中没有发现任何碱基的缺失或插入。比较的13种硬骨鱼类的Cyt b序列中,暗纹东方鲀和红鳍东方鲀的Cyt b在3'端少了6 bp,仅编码378个氨基酸,而大多数鱼类的Cyt b编码380

个氨基酸,造成Cyt b长度差异的原因是由于终止信号位点的后移。这两个氨基酸位于N端,由于Cyt b的N端和C端并非保守区,所以对Cyt b的功能不会发生影响。尽管14种鱼类的Cyt b序列中极少发现碱基的缺失或插入,但在进化过程中,种属间发生了大量的碱基替换事件,鲀科东方鲀属两个种间的碱基替换率仅3.7%,而鲀科与翻车鲀科的碱基替换率达到了21.5%左右,提高了近6倍(表3)。由表3还可见,同属间的替换以转换为主,而科间的替换中,颠换数已接近转换数。在传统分类学基础上,利用mtDNA的Cyt b以及细胞色素氧化酶(COI,COII,COIII)等基因从分子水平进行鱼类种属间的系统发育分类及良种标记具有广阔的前景^[14]。

参考文献:

- [1] 中国科学院动物研究所. 南海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1962. 1064-1098.
- [2] 朱元鼎, 张春霖, 成庆泰, 等. 东海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1963. 554-579.
- [3] 张春霖. 黄渤海鱼类调查报告[M]. 北京: 科学出版社, 1955. 309-329.
- [4] 成庆泰, 王存信, 田明诚, 等. 中国东方鲀属鱼类分类研究[J]. 动物学报, 1975, 21(4): 359-378.
- [5] 王奎旗, 陈梅, 高天翔. 东方鲀属鱼类的分类与区系分布研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(6): 855-860.
- [6] Miyaki K, Tabeta O, Kayano H. Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu* [J]. *Fishes Sci*, 1995, 61(4): 594

- 598.
- [7] 王金星,赵小凡. 鲀形目三种鱼的染色体研究[J]. 动物学研究, 1993, 14(4): 345-346.
- [8] 余多魁,华元瑜,顾志峰,等. 暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)核型研究[J]. 南京师范大学学报(自然科学版), 2002, 25(2): 121-122.
- [9] 王可玲,张培军,尹青,等. 东方鲀属鱼类肌球蛋白的种间差异及其聚类的分析[J]. 海洋与湖泊, 1984, 15(5): 493-499.
- [10] 刘玲玲,李悦民,陆佩洪,等. 暗纹东方鲀同工酶生化表现型的研究[J]. 遗传, 1998, 20(2): 23-26.
- [11] 刘强辉,石拓,傅学周,等. RAPD 标记鉴别红鳍东方鲀和假暗纹东方鲀种群的初步研究[J]. 海洋通报, 1999(4): 38-41.
- [12] Elgar G. Fishing for genes: Fugu expands (but its genome doesn't)[J]. Genom News, 1995(11): 54.
- [13] 周巍,杨晓明,刘国仰. 河鲀鱼与人类基因组计划[J]. 遗传, 1997, 19(6): 37-40.
- [14] 李静楠. 线粒体[M]. 北京:北京大学出版社, 1988. 58-62.
- [15] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384-391.
- [16] 张方,宋志勇,毛钟荣,等. 草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)线粒体 DNA 控制区及其侧翼 tRNA 基因的克隆与结构分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 1999, 15(3): 417-422.
- [17] 李思发,吕国庆,贝纳切兹 L. 长江中下游鳊草青四大家鱼线粒体 DNA 多样性分析[J]. 动物学报, 1998, 44(1): 82-93.
- [18] 吴乃虎,王钢锋,周景智,等. 草鱼和鲤鱼线粒体 DNA 的分离纯化及其 COI 基因的分子克隆[J]. 动物学报, 1991, 37(4): 375-382.
- [19] 叶星,白俊杰,劳海华,等. 草鱼线粒体细胞色素 b 基因的克隆与序列分析[J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 193-197.
- [20] 彭作刚,何舜平,张耀光,等. 细胞色素 b 基因序列变异与东亚鲷科鱼类系统发育[J]. 自然科学进展, 2002, 12(6): 596-600.
- [21] 项方,邹记兴,邓凤蛟,等. 用细胞色素 b 部分序列研究黄鱼分子的分类与系统发育[J]. 动物学杂志, 2004, 39(5): 13-18.
- [22] Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor-Laboratory Press, 2001. 26-118, 611-627.
- [23] 孟庆闻,苏德祥,廖学祖. 鱼类分类学[M]. 北京:中国农业出版社, 1995.
- [24] 沈兴家,赵巧玲,张志芳,等. 鳊鱼线粒体基因组中 *nd1* 及其侧翼 tRNA 基因的克隆与结构分析[J]. 渔业科学, 2002, 28(4): 289-293.
- [25] 苏德祥,李静生. 中国动物志 硬骨鱼纲 鲀形目 海鲀目 鲀科 鲀属[M]. 北京:科学出版社, 2002. 221-274.

Cloning and analysis of sequences of Cyt b and its connected tRNA genes of mitochondrial genome from *Takifugu fasciatus*

SHAO Ai-hua^{1,2}, ZHU Jiang¹, CHEN Kui¹, SHI Quan-liang¹

(1. School of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215123, China; 2. Department of Biology, Suzhou Science and Technology College, Suzhou 215009, China)

Abstract: Mitochondrial DNA (mtDNA) of *Takifugu fasciatus* was prepared as templates from the liver tissue. The *Takifugu fasciatus* mitochondrial cytochrome b (Cyt b) and its connected tRNA genes were amplified by PCR with a pair of specific primers which were designed based on *Takifugu rubripes* from GenBank. A sequence with total length of 1 327 bp including 1 137 nucleotides of Cyt b gene and partial sequences at both sides was cloned. The Cyt b gene of *Takifugu fasciatus* was proved to have good homology with other 13 species of fishes recorded in GenBank and it has 96.1% homology with *Takifugu rubripes*, about 75% with *Mola mola* and *Masturus lanceolatus*. The tRNA^{Glu} gene has 69 nucleotides and the tRNA^{Thr} has 72 nucleotides. Their sequences are the same as those of *Takifugu rubripes*. Proposed secondary structures for tRNA^{Glu} and tRNA^{Thr} genes suggest that they have classical cloverleaf structures with high complementary base rate of each arm and the structures have good stability. The phylogenetic tree shows that the phylogenetic relationships based on the homology of cyt b genes of *Takifugu fasciatus* and the other 13 species of fishes are consistent with the morphological taxonomic results.

Key words: *Takifugu fasciatus*; mtDNA; cytochrome b; phylogeny

Corresponding author: ZHU Jiang. E-mail: sdjyz@hotmail.com