

剑尾鱼线粒体 DNA D-环及侧翼 tRNA^{thr} 和 tRNA^{pro} 序列与结构分析

白俊杰, 劳海华, 叶 星, 简 清, 吴淑勤

(中国水产科学研究院珠江水产研究所,
农业部热带亚热带鱼类选育与养殖重点开放实验室, 广东 广州 510380)

摘要:采用 PCR 方法从剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)线粒体基因组中扩增到 1 段约 15.5 kb 的片段,测定了其中 627 个碱基的序列。经测序分析表明,该扩增片段包括 486 bp 的 D-环的部分序列以及 D-环 5 端的 tRNA^{thr} 和 tRNA^{pro} 基因的完整序列。其中 486 bp D 环序列包含 3 段保守的终止相关序列 TAS、与 TAS 互补的序列以及类似其他鱼类线粒体 CSB 序列。tRNA^{thr} 由线粒体 DNA 的 H 链编码,长度为 72 bp。tRNA^{pro} 由线粒体 DNA 的 L 链编码,长度为 69 bp。并绘制了这 2 种 tRNA 的二级结构图。本研究所测定的基因序列已登录国际 GenBank 数据库,序号为 AF489918。

关键词:剑尾鱼;线粒体 DNA;D-环;tRNA

中图分类号:Q343.1;Q959.475

文献标识码:A

文章编号:1005-8737(2003)02-089-04

鱼类线粒体 DNA(mtDNA)是一种能自我复制、共价闭合的环状双链 DNA 分子,大小约 16.5 kb,编码 13 种蛋白、22 种线粒体 tRNA、2 种线粒体核糖体 RNA(12S rRNA 和 16S rRNA)以及线粒体 DNA 的 H 链的复制起点 D-环,具有结构简单、严格的母系遗传、缺乏重组和进化速度快等特点,近年来被作为分子标记广泛应用于鱼类的群体遗传和系统发生方面的研究^[1-2]。D-环又称控制区(control region)或替代区(displacement-loop region),参与线粒体基因的复制与转录,是 mtDNA 中不编码蛋白质的区域,也是 mtDNA 中碱基和长度变异最大的区域,即使在亲缘关系很近的物种间也存在高度的长度变异,适合进行种内和种间系统进化的分析^[3-5]。

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)属鲈形目、花鲈科、剑尾鱼属的小型热带淡水鱼类,具有体型小、繁殖周期短、繁殖力强、易饲养、品种多、表型性状多样、遗传多样性丰富等特点,可在实验室条件下进行纯化

培养,是研究鱼类遗传变异的理想材料。20 世纪 80 年代起,中国水产科学研究院珠江水产研究所开始对剑尾鱼进行实验动物化培育,至今已初步建成多个品系^[6],其中 RR-B 品系已近交达 21 代。有关剑尾鱼线粒体 tRNA 的序列和结构分析,尚未见过报道。剑尾鱼线粒体 DNA D-环的部分序列分析虽然已有研究,但不同品系之间有可能存在长度变异。为进一步了解选育品系剑尾鱼线粒体的分子遗传背景,建立不同品系之间的分子标记,我们在已有工作的基础上对 RR-B 品系剑尾鱼的 mtDNA D-环以及侧翼 tRNA^{thr} 和 tRNA^{pro} 基因序列进行测定和结构分析。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用剑尾鱼来自珠江水产研究所剑尾鱼实验动物化培育中心 RR-B 19 代近交系。DNA 提取与纯化试剂盒购自美国 Promega 公司。长片段 PCR 扩增试剂盒 TaKaRa LA PCRTM Kit Ver. 2.1 购自日本 TaKaRa 公司。

1.2 方法

收稿日期:2002-05-30。

基金项目:国家公益研究专项资金资助项目(34043)。

作者简介:白俊杰(1957-),男,研究员,从事水产生物技术研究。

E-mail: jibai@163.net

1.2.1 剑尾鱼肝脏总 DNA 样品的制备 取肝脏 20 mg, 用 Promega 公司 Wizard DNA 提取与纯化试剂盒及其介绍的方法提取肝脏总 DNA。电泳检测 DNA 的完整性和纯度并估计其浓度, 4 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 根据本实验室已克隆的剑尾鱼线粒体 DNA 细胞色素 b 基因^[7] 外侧序列设计合成剑尾鱼线粒体 DNA PCR 扩增引物, 上游引物 P₁: 5' - GATAAGCACTAGTAGCTCAGCTTTCAGAGCGTCGG - 3'; 下游引物 P₂: 5' - GATGTTTACGGGTCCAGGGAGGTCCACTAGCAT - 3'。按 TaKaRa LA PCR™ Kit Ver. 2.1 提供的方法稍加改进后进行 PCR 扩增, 反应总体积为 50 μL。首次循环前 94 °C 变性 1 min; 接下来每个循环包括 98 °C 变性 20 s, 退火与延伸在同一温度下进行, 68 °C 15 min, 14 个循环后每增加 1 个循环退火与延伸时间增加 10 s, 共进行 28 个循环的扩增, 最后 1 次循环结束时 68 °C 延伸 7 min。扩增产物用 Promega 公司 PCR Clean Up Kit 纯化回收后保存备用。

1.2.3 DNA 序列测定与分析 用 5' - GATAAGCACTAGTAGCTCAGCTTTCAGAGCGTCGG - 3' 引

物在 ABI PRISM™ 377 全自动荧光测序仪上测序。DNA 分析软件 Vector NTI Suit 6.0 分析测定结果。

2 结果

从剑尾鱼线粒体基因组中扩增到 1 段约 15.5 kb 的片段, 并测定了其中 627 个碱基序列。经测序分析表明该扩增片段包括 486 bp 的 D-环部分序列以及 D-环 5 端的 tRNA^{thr} 和 tRNA^{pro} 基因的完整序列 (见图 1)。其中 486 bp 的 D-环序列包含 3 段保守的终止相关序列 TAS (Termination Associated Sequence TAS) TACAT, 以及与 TAS 互补的序列 (分别用方框和阴影表示)。在 3 端附近有一 gcataa (下划线部分) 序列类似其他鱼类线粒体的 CSB (the conserved sequence blocks) I 序列, 该序列与线粒体基因组的复制起始有关, 在 486 bp 的 D-环序列中 A + T 的含量为 62.14%。tRNA^{thr} 基因由线粒体 DNA 的 H 链编码, 长度为 72 bp, tRNA^{pro} 基因由线粒体 DNA 的 L 链编码, 长度为 69 bp。2 个基因 (G + C)/(A + T) 分别为 1.25 和 0.64。本研究所测定的基因序列已登录国际 GenBank 数据库, 序号为 AF489918。

```

1 | gcactagtag ctcagcttgc agagcgtcgg tctagtaage cgaaggacga gggttaaact ccccccact gc | tcaatgaa gaaggagtt
   tRNAthr >
91 aaectcacc cctaactccc aaagctagga tccaatttaa actattctt g | accggactc tgccecccta gcataagta tgtattatcc
   tRNApro D-loop >
181 ccattaatct atttaacca tttaagtag tgtaaccctc cattaatgaa aaattcaaaa ttgtaggagc ttaaccacat tataaacatc
271 aaataaatat gaaggtagac ataaccact aaatttcuaa ctccattaaa atgttaaaaa gatgacgata ttgaattgic
351 ctaccacaae tctatccgt ctagatatac caggactcac cacccttcca agtaagagtc aaatgcagta agagaccacc
431 atcattgat tecttaattg acacgttat tgatggcuaa ggacaaaaat cgtgggggta gcacacagtg aactattctt
511 ggcatltggt tectattcca gggttcatac ttgaacacat tcccctaact ttctgacg ctgcataag ttaatgggtg aatatacatc
601 cctegtacc acccatgcgc agcttcc
  
```

图 1 剑尾鱼线粒体 DNA D-环序列以及 tRNA^{thr} 和 tRNA^{pro} 基因序列

Fig. 1 *Xiphophorus hellerli* mitochondrial D-loop and tRNA^{thr}, tRNA^{pro} genes sequences

方框为终止相关序列 TAS, 阴影部分为 TAS 互补的序列, 下划线部分为 CSB 序列

Boxes indicate the TAS sequences; shadows indicate the TASes palindromic motifs and the underline indicates CSB sequence

3 讨论

在线粒体 DNA 中, D-环是唯一的非编码区域, 受选择压力较小, 有着较高的进化速度, 是进行种内和种间系统进化分析的重要标记。Meyer 等^[8] 在研究剑尾鱼性别特征进化时测定了线粒体 DNA 中 D-环的 349 个碱基序列。而本研究测定了 627 个碱基

序列, 在 D-环开始处 Meyer 等的结果除了比本研究多了 1 段 22 bp 的插入序列外, 其余部分两者具有很高的同源性, 349 个碱基中只有 2 个碱基的差别。进一步分析发现插入 22 bp 的区域是 D-环中变异最大的区域, 许多鱼类会在此区域插入长短不一的重复序列, 可作为不同品系之间的选择标记。利用 DNA 分析软件 Vector NTI Suite 6.0, 比较了剑尾鱼

属 23 个品种 D-环的 5'端部分序列的同源性,结果其相似性较高,在 73.6% 与 96.6% 之间。据此比较结果绘制了分子系统发生树(图 2),显示出根据序

列获得的分子分类结果与传统的分类结果基本吻合。

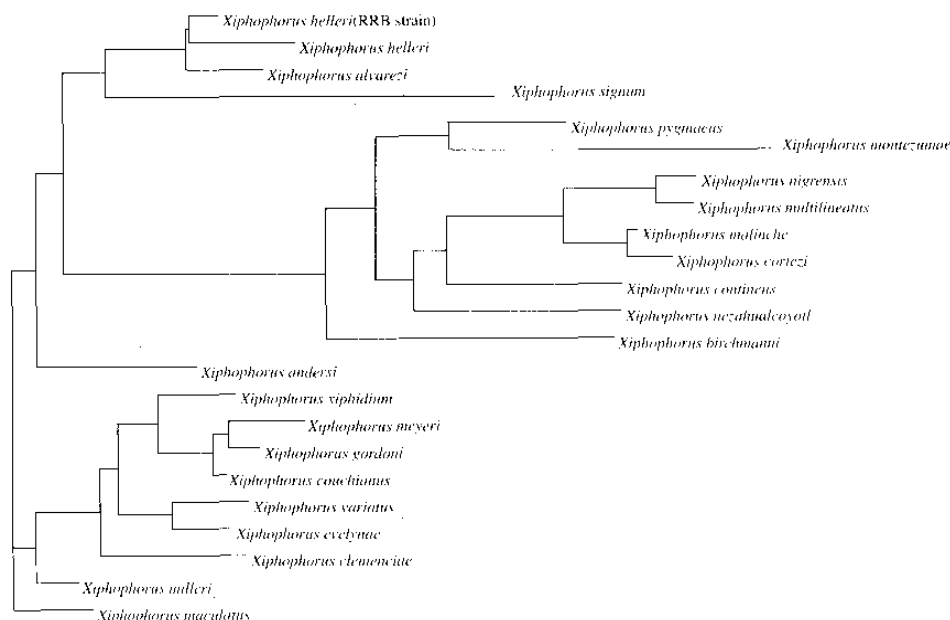


图 2 根据 D-环序列构建的 23 种剑尾鱼的分子系统发生树

Fig. 2 Phylogenetic tree derived from 23 *Xiphophorus* fish D-loop nucleotide sequences

用 BLAST 基因分析软件分析比较剑尾鱼与 GenBank 上其他鱼类线粒体 DNA 中 tRNA^{thr}和 tRNA^{pro}基因序列,结果表明存在很高的同源性,例如与鳉形目的 *Poecilia reticulata* tRNA^{pro}基因序列仅有 3 个碱基的差异 (GenBank AF080499),反密码子环的保守性普遍很强,而与鲤鱼^[9]、草鱼^[10] tRNA^{pro}的反密码环序列完全一样。参照划分线粒体 tRNA 的方法,我们绘制了剑尾鱼 tRNA^{thr}和 tRNA^{pro}基因的二级结构(图 3)。它们都具有典型的三叶草结构,tRNA^{thr}的氨基酸接受茎含有一错配的碱基对。2 种 tRNA 的 T ψ C 环具有完全一样的序列,由 7 个不配对的碱基组成,该环涉及 tRNA 与核糖体表面的结合。额外环都较小,tRNA^{thr}为 3 个碱基,tRNA^{pro}为 5 个碱基。反密码子环(anticodon loop)都由 7 个不配对的碱基组成,处于中间位的 3 个碱基为反密码子,反密码子可与 mRNA 中的密码子结合,在蛋白质合成中起解读密码子并把正确的氨基酸引入合成位点的作用。二氢尿嘧啶环(dihydr-U loop)由 8 个不配

对的碱基组成,在 2 种 tRNA 二氢尿嘧啶环的臂上配对的碱基对较少,tRNA^{thr}为 2 个,而 tRNA^{pro}仅有 1 个配对的碱基对。王钢锋等^[11]在研究鲤线粒体 DNA 时发现,tRNA^{thr}二氢尿嘧啶环的臂上完全呈现非标准配对,可能出现不寻常的高级结构。

参考文献:

- [1] Kondo R S, Horai Y, Satta, et al. Evolution of hominoid mitochondrial DNA with special reference to the silent substitution rate over the genome [J]. J Mol Evol, 1993, 36(5): 17-53.
- [2] Wilson A C, Cann R I, Carr S M, et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics [J]. Biol J Linnean Soc, 1985, 26: 375-400.
- [3] Clayton D A. Replication of animal mitochondrial DNA [J]. Cell, 1982, 28: 693-705.
- [4] Saccone C M, Attimonelli, Sbtu E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA [J]. J Mol Evol, 1987, 26: 205-211.
- [5] Harrison R C. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology [J]. Trends Ecol, 1989, 4: 6-11.

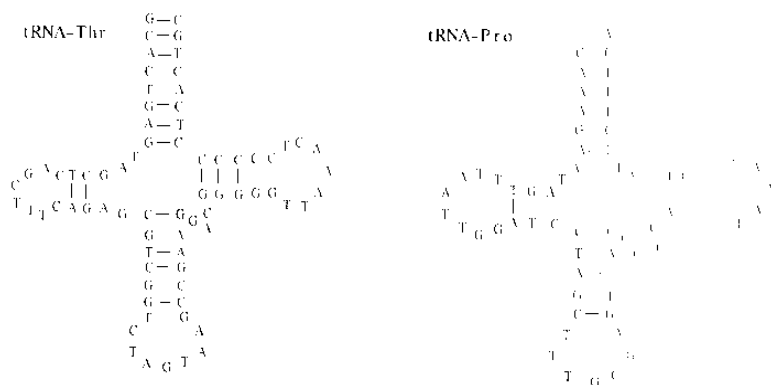


图3 剑尾鱼 tRNA^{thr}和 tRNA^{pro}基因的二级结构

Fig. 3 Second structures of *Xiphophorus helleri* tRNA^{thr} and tRNA^{pro} genes

- [6] 黄志斌,吴淑勤,石存斌,等. 剑尾鱼的若干生物学特性研究[J]. 中国水产科学, 2000, 7(3): 107-109.
- [7] 叶星,白俊杰,劳海华,等. 剑尾鱼线粒体细胞色素 b 基因的序列分析[J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(3): 180-185.
- [8] Meyer A, Morrissey J M, Scharl M. Recurrent origin of a sexually selected trait in *Xiphophorus* fishes inferred from a molecular phylogeny [J]. Nature, 1994, 368: 539-542.
- [9] Chang Y S, Huang F L, Lo T B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome [J]. J Mol Evol, 1994, 38(2): 138-155.
- [10] 张方,米志勇,毛钟荣,等. 草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 线粒体 DNA 控制区及其两侧 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.
- [11] 王钢锋,吴乃虎. 鲤鱼线粒体 URLA6L 基因和 tRNA^{pro} 基因的结构分析[J]. 中国科学(B), 1991, (6): 609-614.

Sequence and structure analysis of mitochondrial D-loop and tRNA^{thr} & tRNA^{pro} genes in *Xiphophorus helleri*

BAI Jun-jie, LAO Hai-hua, YE Xing, JIAN Qing, WU Shu-qin

(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fish Breeding & Cultivation, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The swordtail fish *Xiphophorus helleri* were used as the experimental animal, which were the inbred strains of 19th generation cultivated in the laboratory. Twenty mg of liver tissue was collected to prepare the total DNA. In order to learn the molecular background of the fish and build molecular markers for its different strains, a 15.5 kb fragment of swordtail fish mitochondrial DNA was obtained by PCR method and a 627 bp sequence was determined, and by sequence analysis, the results showed this sequence contained 486 bp of D-loop sequence and complete tRNA^{thr} and tRNA^{pro} genes. The tRNA^{thr} contained 72 bp and was coded by H chain of mitochondrial DNA. The tRNA^{pro} contained 69 bp, coded by L chain. The characteristics of D-loop sequence and the second structures of the two tRNA were described and analyzed. The gene sequences obtained in this study have been recorded in the GenBank, whose number is AF489918.

Key words: swordtail fish (*Xiphophorus helleri*); mitochondrial; D-loop; tRNA sequence