

文章编号:1005-8737(2000)03-0001-04

中华绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的序列研究

高天翔¹, 吉崎悟朗², 渡边精一²

(1. 青岛海洋大学 水产学院, 山东 青岛 266003; 2. 东京水产大学 水生生物系, 日本 东京 108-8477)

摘要:首次进行了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)线粒体 DNA 12S rRNA 的序列分析。参考果蝇、蚤状溞序列对中华绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段做了引物设计、PCR 扩增及序列测定, 结果得到 457 bp 的碱基序列, 其 A、T、G、C 含量分别为 159 bp (34.79%)、177 bp (38.73%)、51 bp (11.16%)、70 bp (15.32%), 与果蝇、蚤状溞的相同基因片段的序列含量基本相似。

关键词:中华绒螯蟹; 线粒体 DNA; 12S rRNA; 序列
中图分类号: Q75 **文献标识码:** A

动物线粒体 DNA 呈共价闭环双链结构, 分子量约为 16.5 kb, 绝大多数表现为母系遗传。在一级结构上, 其进化速率为核 DNA 的 5~10 倍。由于其分子较小、呈环状、容易分离纯化, 基因组结构相对简单、稳定、无组织特异性且便于分析, 使得它已成为研究动物起源进化及群体遗传分析的理想研究对象^[1]。碱基序列分析虽然花费大、技术要求高, 但通过测定线粒体 DNA 全序列或部分基因片段序列可以了解碱基的置换、插入、缺失等实际情况, 比较不同物种或个体碱基相关序列的差异, 从而探讨进化关系。因此, 比 RFLP 等其它分析方法具有很大的优点。关于节肢动物线粒体 DNA 序列的研究国际上只有少数报道, 国内尚未见报道。目前, 已经测出果蝇 (*Drosophila yakuba*)^[2]、卤虫 (*Artemia franciscana*)^[3] 的线粒体 DNA 分子全序列, 以及蚤状溞 (*Daphnia pulex*)^[4] 和其它一些甲壳类的部分序列。但尚未见有关中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 线粒体 DNA 序列的报道。

有关中华绒螯蟹同工酶水平遗传变异研究已有报道^[5~8]; 高志千和周开亚用 RAPD 方法分析了辽河、长江和瓯江种群的遗传变异^[9]。本文首次进行了中华绒螯蟹 12S rRNA 基因片段的引物设计、PCR 扩增及其序列测定, 为进一步研究绒螯蟹属系统进化及其群体遗传学提供理论依据, 以保护其天然种质资源^[10]。

1 材料与方法

1.1 材料

实验样品采自上海出口到日本的中华绒螯蟹, -20℃ 以下保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 取 0.1 g 附肢肌肉, 用 Pharmacia Biotech 公司的 GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit 提取基因组 DNA。乙醇沉淀后未用 Kit 添付的 buffer, 而是溶解于 50 μl 灭菌蒸馏水, 测定浓度后 4℃ 存放。

1.2.2 引物设计与 PCR 扩增 对果蝇、蚤状溞线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段序列进行同源性检索排序, 设计中华绒螯蟹 12S rRNA 基因片段引物

收稿日期: 1999-08-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970578); 日本学术振兴会
未来开拓学术研究资助项目 (97L00902)

作者简介: 高天翔 (1962-), 男, 辽宁辽阳人, 青岛海洋大学副教授,
博士, 从事渔业生物学研究。

为 12S rRNA-F: CTAGATRCACCTTTCCAGTACA (21bp) 和 12S rRNA-R: CYAGGATTAGATAC-CCTRTT(20bp)。使用 Takara PCR Thermal Cycler MP(TP3000) 仪进行 PCR 扩增。PCR 反应总量为 25 μ l, 其中, 浓度 20~50 pmol/ μ l 引物 1 μ l, dNTPs (Takara) 2 μ l, 10 $\times$ Ex Taq Buffer (Takara) 2.5 μ l, Ex Taq polymerase (Takara) 1.25 U, 1 μ g 模板 DNA 1 μ l, 其它为灭菌蒸馏水。PCR 反应程序如下, 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 45 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 420 s。扩增产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 紫外透射仪观察并照相。

1.2.3 连接反应 将预想的扩增产物从琼脂糖凝胶切出提纯。连接反应在 16 $^{\circ}$ C 下过夜进行, 反应总量为 8 μ l, 其中 Promega 公司的 pGEM-T Easy Vector 0.5 μ l, Takara DNA Ligation Kit Ver. 2 中 1 液 4 μ l, DNA 3.5 μ l。

1.2.4 转化反应 参照中山、西方方法^[11]进行转化反应后, 用 Pharmacia 公司 FlexiPrep Kit 进行质粒 DNA 提纯, 并用限制性内切酶 EcoR I 酶切检验

12S rRNA 基因片段的有无。

1.2.5 序列测定 使用 Amersham 公司 Thermo sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP 进行 DNA 标记后用 Pharmacia 公司的 ALFexpress DNA 序列仪进行中华绒螯蟹 12S rRNA 基因片段的序列测定。

2 结果

2.1 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

利用果蝇、蚤状溞序列设计的引物进行中华绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增, 得到清晰的基因片段, 而且空白对照实验未出现扩增产物。

2.2 中华绒螯蟹 12S rRNA 基因片段序列

测定出中华绒螯蟹 12S rRNA 的 457 bp 基因片段(图 1), 用 BLAST 与基因库(GENBANK)中线粒体 DNA 序列进行比较结果表明, 与其它种类相同基因片段有很高的相似性。

```

      10      20      30      40      50      60
CTAGATACAC TTTCCAGTAC ATCTACTATG TTACGACTTA TTTCACCTAT AAATGAAAGC

      70      80      90     100     110     120
GACGGGCGAT ATGTACACAA TTTAGAACTT ATATCTTGTT AGCTTATTAA ACTAAAAATA

     130     140     150     160     170     180
CAATCAAATC CATCTTTATA ATAATATTAT CTTATTAATC CGCAGTAAAG TAATTTACTG

     190     200     210     220     230     240
TAACCCATTT TACCTTGCTT ATTGGCTGCA CCATGATCTA ATTTTACTAA ACAACTAAAT

     250     260     270     280     290     300
TTAATAATTT TTCCTTTAAG AATTATCTGA TAATGATGGT ATACAACTG TTAGAATTAC

     310     320     330     340     350     360
TAAAGCAAGT AAGATTTTTC GTGGTTTATC GATTCTAAAA CAGGTTCTCT TGAATAGATT

     370     380     390     400     410     420
AAATTGCCGC CAAATTTTTC AAATTTTAAG TATTTATCTT TTACTAATTC AGTTTATAT

     430     440     450     460     470     480
TAAATTTATT TTAGAATAAC AGGGTATCTA ATCCTAG

```

图 1 中华绒螯蟹 12S rRNA 基因片段序列

Fig.1 Alignment of 12S rRNA nucleotide sequences(457bp) of *E. sinensis*

3 讨论

3.1 引物设计与 PCR 扩增的评价及意义

本研究用果蝇、蚤状溞序列设计的 12S rRNA

引物成功地扩增出了中华绒螯蟹的相同片段, 而且空白对照实验未出现扩增产物。说明利用动物 mtDNA 的同源性, 参考其它节肢动物已知序列可以设计甲壳类动物的相应片段引物, 并且以此方法设

计的引物应该具有普遍性,为其它甲壳类动物的遗传学研究提供了分子依据。

3.2 中华绒螯蟹与果蝇、蚤状溞的线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段序列比较

中华绒螯蟹 12S rRNA 基因片段 457 bp 碱基序列中,A、T、G、C 含量分别为:159 bp、177 bp、51 bp、70 bp,与本研究设计的引物之间的果蝇、蚤状溞的相同片段含量基本相似,均为 A、T 含量多,G、C 含量少(表 1)。今井、沼知^[12]通过对 D-loop 片段的 PCR 扩增及酶切分析也得出三疣梭子蟹 A、T 含量较高的结论。由此可见,A、T 含量高是节肢动物共有的现象^[12],中华绒螯蟹也具有此种结构特征。因此,在今后进行限制性内切酶片段长度多态法(RFLP)研究时,应选用富含 A、T 的限制性内切酶。

表 1 中华绒螯蟹、果蝇、蚤状溞的线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段序列组成

Table 1 Sequence composition of mitochondrial DNA 12S rRNA region of *E. sinensis*, *D. yakuba* and *D. pulex*

种名 Species	腺嘌呤 A	胸腺嘧啶 T	鸟嘌呤 G	胞嘧啶 C	序列总计/bp Total	%
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	34.79	38.73	11.16	15.32	457	
果蝇 <i>D. yakuba</i>	36.59	37.69	10.20	15.52	451	
蚤状溞 <i>D. pulex</i>	32.34	32.11	15.60	19.95	436	

A - adenine, T - thymine, G - guanine, C - cytosine.

3.3 中华绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段序列测定的意义

有关绒螯蟹属的亚种分化已有报道^[13],分布于雷州半岛以西的绒螯蟹为日本绒螯蟹合浦亚种。而 Guo JY, 等^[14]认为雷州半岛以西和以东的绒螯蟹应为同一独立的物种,即合浦绒螯蟹(*E. hepuensis*)。由于中华绒螯蟹只在繁殖期和发育幼期以及发育早期(大眼幼体期以前)生活在河口半咸水中,因而种群扩散有一定局限性,水温、海流等环境因素有可能阻止种群间的基因交流。从形态学上尚未确定是否构成地理亚种^[13]。中华绒螯蟹与日本绒螯蟹之间遗传距离虽很小,也出现了 2 种应为亚种水平的关系^[9]。Gao 和 Watanabe^[7]通过 15 种酶 22 个位点研究,得到日本绒螯蟹冲绳群体与其它群体有一些差异;中华绒螯蟹与日本绒螯蟹间根并遗传距离为日本绒螯蟹 22 个群体间平均遗传距离的近 140 倍,但

因同工酶研究具有局限性,2 种间差异尚很小。根据 2 种幼蟹发育过程的形态比较,Montú 等^[15]认为 2 种幼蟹的形态有差异,但亲缘关系非常相近。另外,RAPD 分析也未能够发现中华绒螯蟹群体间的显著差异^[9]。因此,急需找出感度更高的遗传标志。利用线粒体 DNA 作为遗传标记,可以更准确地探讨分析绒螯蟹属系统的进化关系。

无脊椎动物的线粒体 DNA 基因组结构有很大的差异,不易进行其变异性最高的 D-loop 基因的 PCR 扩增。本研究测定了线粒体 DNA 的 12S rRNA 基因片段的部分序列,由此可促进绒螯蟹属系统进化研究,并可利用该基因片段序列进行中华绒螯蟹 D-loop 的引物设计,为其种质资源的保护和群体遗传学研究打下基础。至于绒螯蟹属系统进化关系及其群体遗传变异,包括 D-loop 在内的其它线粒体 DNA 基因片段序列还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNAs[A]. M Nei, R K Koehn. Evolution of genes and proteins[M]. Sunderland MA: Sinauer, 1983. 62-88.
- [2] Clary D O, Wolstenholme D R. The mitochondrial DNA molecular sequence of *Drosophila yakuba*, gene organization, and genetic [J]. J Mol Evol, 1985, 22: 252-271.
- [3] Valverde J R, Batuecas B, Moratilla C, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Artemia franciscana* [J]. J Mol Ecol, 1994, 39: 400-408.
- [4] Van Raay T J, Crease T J. Partial mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Daphnia pulex* [J]. Current Genetics, 1994, 25: 66-72.
- [5] 王 丹, 于伟君. 辽河长江两水系中华绒螯蟹酯酶和乳酸脱氢酶的同工酶比较研究[J]. 辽宁大学学报, 1995, 22(4): 79-81.
- [6] 张 洁, 陈立桥, 周忠良, 等. 中华绒螯蟹同工酶发育遗传学研究 I. 长江中华绒螯蟹不同组织同工酶的特异性分析[J]. 华东师范大学学报动物学专集, 1996, 38-42.
- [7] Gao T, Watanabe S. Genetic variation among local populations of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* De Haan [J]. Fisheries Science, 1998, 64: 198-205.
- [8] Li G, Shen Q, Xu Z. Morphometric and biochemical genetic variation of the mitten crab, *Eriocheir*, in Southern China [J]. Aquaculture, 1993, 111: 103-115.
- [9] 高志千, 周开亚. 中华绒螯蟹遗传变异的 RAPD 分析[J]. 生物多样性, 1998, 6(3): 186-190.
- [10] Dai A, Yang S. Crabs of the China Seas [M]. Beijing: China Ocean Press, 1991. 478-482.
- [11] 中山广树, 西方敬人. バイオ実験イラストレイテッド②遺伝子解析の基礎 [M]. 东京: 秀润社, 1995. 13-31.
- [12] 今井秀行, 沼知健一. ガザミのミトコンドリア DNA の切断型

- 分析法—II. PCR 法によるDループ領域増幅のためのプライマー設計[J]. 东海大学海洋研究所研究报告, 1998, 19:41-46.
- [13] 戴爱云. 绒螯蟹属亚种分化的研究(十足目, 短尾派)[A]. 系统进化动物学重点研究实验室论文集(第1集)[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1991. 61-71.
- [14] Guo J Y, Ng N K, Dai A, et al. The taxonomy of three commercially important species of mitten crabs of the genus *Eriocheir* De Haan, 1835. (Crustacea: Decapoda; Brachyura; Grapsidae)[J]. The Raffles Bulletin of Zoology, 1997, 45(2):445-476.
- [15] Montú M, Anger K, Bakker C De. Larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards(Decapoda; Grapsidae) reared in the laboratory[J]. Helgoländer Meeresunters, 1996, 50:223-252.

Study on partial sequences of mitochondrial DNA 12S rRNA gene of Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*

GAO Tian-xiang¹, Yoshizaki Goro², Watanabe Seiichi²

(1. Fisheries College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Tokyo University of Fisheries, Tokyo 108-8477, Japan)

Abstract: The partial sequences of mitochondrial DNA 12S rRNA gene of Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* were analysed. The primers of mitochondrial DNA 12S rRNA gene region in *E. sinensis* were designed by using the sequences of the same gene region of *Drosophila yakuba* and *Daphnia pulex*. A sequence of 457 base pairs were obtained successfully. The contents of A, T, G and C were 159 bp(34.79%), 177 bp(38.73%), 51 bp(11.16%), 70 bp(15.32%), respectively, which are similar to the same gene region of *D. yakuba* and *D. pulex*.

Key words: *Eriocheir sinensis*; mitochondrial DNA; 12S rRNA; sequence

欢迎订阅 2001 年《中国水产科学》

主要刊载水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖、水产品保鲜与加工综合利用、渔业水域环境保护、渔船、渔业机械与仪器及渔业基础科学和应用基础研究及开发应用研究的学术论文、研究简报、综述和学术动态等文稿。

本刊是季刊, A4 开本, 每期 96 页, 季末出版, 国内外公开发行。国内定价 14 元/期, 全年 56 元/期(含邮费)。本刊邮发代号: 18-250, 国内统一刊号: CN1-3446/S, 国际标准刊号: ISSN1005-8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮局办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期期刊, 请直接向编辑部订阅。

地址: 北京市丰台区青塔村 150 号 邮政编码: 100039 联系电话: (010) 68673921
传真: (010) 68673931

E-mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net