

鲟形目鱼类 rDNA 扩增及限制性位点分析

汪登强, 危起伟, 罗晓松, 方耀林

(农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点开放实验室, 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要: 使用长 PCR 技术扩增鲟形目 (*Acipenseriformes*) 15 个种的核糖体 DNA (rDNA) 18S rRNA 基因与 28S rRNA 基因之间约 2.5 kb 的片段, 并用 7 个限制性内切酶对该片段进行限制性位点分析。结果显示, 使用 LA Taq DNA 聚合酶及 GC Buffer 结合长 PCR 技术能够很好地扩增鲟形目鱼类的 rDNA。根据酶切图谱可确定 93 个限制性位点, 其中 21 个为保守位点, 72 个多态信息位点。Hha I 酶切的带型在所有个体中完全一致, 提示这些位点对保持 rDNA 的功能有重要作用。一些酶的酶切产物长度之和大于扩增产物的长度, 暗示鲟形目鱼类个体内存在多个 rDNA 等位基因。对种间遗传距离进行计算, 并构建 UPGMA 分子系统树, 发现鲟科鱼类的系统关系与以往研究有较大差别, 这可能是受个体内 rDNA 等位基因存在的影响, 说明用酶切片段来重建鲟科鱼类的系统树不太可靠。文中还讨论了高 GC 含量模板的 PCR 扩增和 rDNA 在鲟形目分子系统关系中的使用。[中国水产科学, 2006, 13(6): 885–890]

关键词: 鲟形目; rDNA; PCR; 限制性位点

中图分类号: Q953

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2006)06–0885–06

鲟形目 (*Acipenseriformes*) 是一种古老的软骨硬鳞鱼, 属于比较低等的脊椎动物, 在研究动物的系统进化上有较高学术价值。全世界现存的鲟约 27 种, 均分布于北半球, 是淡水生态系统中个体最大的鱼类^[1–2]。由于分布范围不同, 生活习性及形态各异。鲟形目鱼类的系统分化比较复杂, 已引起人们极大关注, 但迄今未有统一的意见。近 10 多年来, 使用分子遗传学技术研究鲟形目鱼类的系统进化取得了很大的进展, 但不同学者使用不同标记得到的结果不尽相同, 有的差别还比较大^[3–7]。以往的研究大都集中在核外基因组即线粒体 DNA (mtDNA), 而对核内 DNA 的研究很少^[3–7]。因此, 现有的数据尚不完整, 要了解鲟形目的分子系统关系, 还需要加强对核内基因组的研究。

脊椎动物核内核糖体 DNA (nrDNA 或 rDNA) 是一个高度重复序列结构单元, 每个重复单元包括 18S rRNA、5.8S rRNA、28S rRNA 基因以及 2 个内间隔区 (ITS1 和 ITS2) 和外间隔区 (ETS), 如图 1 所示。重复单元的各个基因及非编码区具有协同进化的特点, 但不同基因或区域, 进化的速率并不相同, 基因区在种甚至近缘种内匀质性很高, 而间隔区在

种间的序列差异比较大^[8–9]。rDNA 的这一进化特点被应用于物种分子系统关系研究中, 已取得较好的结果^[8–15]。鲟类的 rDNA 分子系统关系研究开展得较少, 究其原因主要是鲟的取样比较困难^[2]以及 rDNA 的扩增也很困难。本实验设计鲟形目 1 对 rDNA 特异引物, 利用改进的长 PCR 技术扩增鲟类 rDNA, 并使用限制性内切酶对扩增的 rDNA 进行分析, 以期了解鲟形目鱼类种间 rDNA 的变异情况, 增加鲟形目分子系统关系的信息。

1 材料和方法

1.1 材料

采用 15 种鲟形目鱼类, 其中 13 种鱼的名称、来源及保存状态见文献[7], 另外 2 种为湖鲟 (*Acipenser fulvescens*) 和大西洋鲟 (*A. oxyrinchus*), 均取于美国。考虑到 rDNA 的进化特点, 种内的序列差异不会对研究种间的分子进化产生大的影响, 所以每 1 个种都取 1 尾作代表。

1.2 总 DNA 提取以及 PCR 扩增方法

每 1 尾样本取约 0.1 g 组织, 用灭菌双蒸水洗去乙醇, 然后使用 SDS-蛋白酶 K 消化组织, 酚-氯仿

收稿日期: 2006–03–06; 修订日期: 2006–04–24。

基金项目: 国家自然科学基金重大项目 (30490231); 国家科技基础工作专项 (2002DEA1004); 国家社会公益研究专项 (2004DIB3J099)。

作者简介: 汪登强 (1973–), 助理研究员, 主要从事鱼类遗传学研究。Tel: 0716–8119161。E-mail: wdq@yfi.ac.cn

通讯作者: 危起伟。Tel: 0716–8128881。E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

法除蛋白^[4-7]。

鲟鱼 rDNA 的扩增用如下引物对: 上游引物为 18SH634: 5' GCCTGCGGCTTAATTTGACTCAACA-
CGG3', 位于鲤鱼 18S rRNA 基因^[16] (GenBank 登录
号: AF133089) 3' 端 634 bp 位点; 下游引物 28SL924: 5'

GACTCCTTGGTCCGTGTTTCAAGACGGT3', 位于
鲟鱼 28S rRNA 基因^[16] (AF133089) 5' 端的 924 bp 位
点。这对引物预期能扩增约 2.6 kb 的 DNA 片段,
引物在 rDNA 的相对位置见图 1 所示。

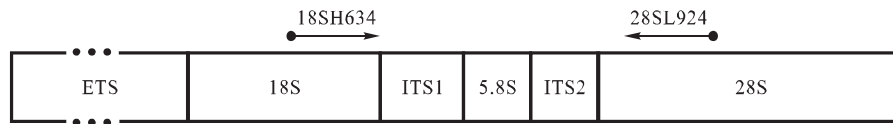


图1 rDNA 结构及引物的位置

Fig. 1 Organization of rDNA and locations of primers

PCR 体系使用 100 μ L, 包括 10 $\times$ GC Buffer [宝生物工程(大连)有限公司, Takara] 10 μ L, 10 mmol/L dNTP 0.8 μ L, 10 μ mol/L 引物各 4 μ L, LA Taq DNA 聚合酶 (Takara) 2 单位, 适量浓度的 DNA 模板 1 μ L, 补充灭菌去离子水至 100 μ L。PCR 过程借鉴长 PCR 的方法^[17], 即将退火步骤和延伸步骤合并为一个步骤, 并设较长的退火延伸时间。PCR 设 94 $^{\circ}$ C 30 s, 68 $^{\circ}$ C 12 min, 共 30 个循环, 循环前 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 循环结束后 72 $^{\circ}$ C 保温 15 min。为了提高 PCR 的特异性, PCR 溶液配制在冰上进行, 当 PCR 仪温度升到 80 $^{\circ}$ C 后才将离心管放到 PCR 仪上开始扩增。为了保证扩增结果真实, 每个样品均做 2 次以上 PCR 反应。

1.3 限制性内切酶酶切、电泳及数据处理

PCR 结束后, 取 2 μ L 反应混合物于 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳检测扩增效果。根据 PCR 产物的浓度, 每个样取 5~8 mL 产物, 加 1.5 mL 酶切缓冲液, 3~10 U 限制性内切酶, 补充蒸馏水至 15 mL, 水浴过夜, 温度依各个酶推荐的最佳温度。实验了用 9 个识别 4 或 5 碱基的限制性内切酶: Afa I [GTAC], Ava II [GG(A/T)CC], Dde I [CTNAG], Hae III [GGCC], Hha I [GCGC], Mbo I [GATC], Msp I [CCGG], Nci I [CC(C/G)GG], Xsp I [CTAG]。酶切反应结束后, 于 70 $^{\circ}$ C 水浴 30 min, 在 2% 琼脂糖凝胶上电泳分离, 紫外灯下观察拍照。

根据酶切结果, 将电泳图谱转换成“0 (不存在), 1 (存在)”特征矩阵, 并利用 PHYLIP 软件包计算 Nei 和 Li 遗传距离^[18]。基于遗传距离矩阵, 构建非加权分组算术平均 (UPGMA) 分子系统树。

2 结果

2.1 rDNA 的扩增

15 尾样本均能扩增得到 1 条大小一致、约为 2.5 kb 的 DNA 带, 与预期的结果相符, 几乎不存在杂带, 特异性很高。

2.2 酶切位点信息、遗传距离及系统树

9 个内切酶中, Msp I 和 Nci I 这 2 个酶识别的位点十分相似, 酶切产生数量较多且在琼脂糖凝胶中难以区分鉴别的 DNA 带, 在此未作统计分析。其余 7 个酶分别可确定 6 (Hha I)、9 (Mbo I)、12 (Hae III)、13 (Afa I)、15 (Xsp I)、19 (Ava II, Dde I) 条 DNA 带, 总共 93 条带, 其中 21 条为在所有个体中均不变的保守带, 72 条为多态的信息位点带。Hha I 酶切得到的 DNA 带最少, 只有 6 条, 并且是惟一个在受试个体中所有的带均不变的酶; Ava II 和 Dde I 拥有最多的 19 条带。表 1 列出 6 种酶 72 个多态信息位点在样本中的分布情况。

表 2 为根据酶切片段多样性计算的两两遗传距离。可以看出, 匙吻鲟科的匙吻鲟和白鲟与其余鲟科种类的遗传距离都大于 0.1, 最大的是匙吻鲟与达氏鲟之间, 为 0.145 3, 而匙吻鲟与白鲟的遗传距离在所有样本中最小, 为 0.021 1; 鲟科内种间的遗传距离均小于 0.09, 最小值出现在意大利鲟与湖鲟之间, 为 0.027 5。

基于遗传距离构建的 UPGMA 分子系统树见图 2。在 UPGMA 树中匙吻鲟和白鲟与其余鲟科鱼类分为两支; 在鲟科中, 西伯利亚鲟与其他鱼明显分开, 显示了较早的分化时间, 而 2 种鲤也没有聚在一起。

表 1 72 个信息位点的分布
Tab. 1 Distributions of 72 informative sites

物种 Species	Afa I	Ava II	Mbo I	Xsp I	Dde I	Hae III
AN	100000110	00101101100110010	0010000	1000010100000	010000001000000	00101001010
HD	100001010	001010001100110110	0010000	1100010100100	010010000100001	00101000110
ASC	100000110	101010001100110111	0010110	1100010000100	010000001000000	00100101011
HH	100000010	001100001100110110	0010000	1101010110110	010010010100000	00100101010
AG	101000110	10100101100110110	0010110	1101010000100	010010001000001	00101000110
AST	100000010	00101101100110110	0010010	1101010000100	010010001000000	100100101000
AM	100000110	00101101100110010	0010010	1000010000010	010000101011100	00100100110
AF	100000110	00101101101100010	0010000	1001010000110	010000001000000	00100011011
ABA	100001010	01000010100110001	1100010	1101010010010	010000001000000	00100011011
AD	100000110	00101101001100011	0010110	1001010010110	011000001000001	00100000110
AO	101000110	00101100100110110	0010110	0101011000110	010100000100000	01010101000
ASI	100000110	00101101100110010	0010000	1001010010110	010101001011100	00010010111
ABR	100100001	00110000100110010	0010000	1100010100010	010000000000000	00100101010
PS	010010110	00000010010011010	0001001	0010101101011	100001010000010	10000000011
PG	000000111	00100000101011010	0001001	001000101001	100001010000010	10000000011

注: ABA, 西伯利亚鲟; ABR, 短吻鲟; AD, 达氏鲟; AF, 湖鲟; AG, 俄罗斯鲟; AM, 库页岛鲟; AN, 意大利鲟; AO, 尖吻鲟; ASC, 施氏鲟; ASI, 中华鲟; AST, 闪光鲟; HD, 达乌尔鲟; HH, 欧洲鲟; PG, 白鲟; PS, 匙吻鲟。
Note: ABA, *A. baerii*; ABR, *A. brevirostrus*; AD, *A. dabryanus*; AF, *A. fulvescens*; AG, *A. gueldenstaedtii*; AM, *A. medirostris*; AN, *A. naccarii*; AO, *A. oxyrinchus*; ASC, *A. schrenckii*; ASI, *A. sinensis*; AST, *A. stellatus*; HD, *H. dauricus*; HH, *H. huso*; PG, *Psephurus gladius*; PS, *Polyodon spathula*.

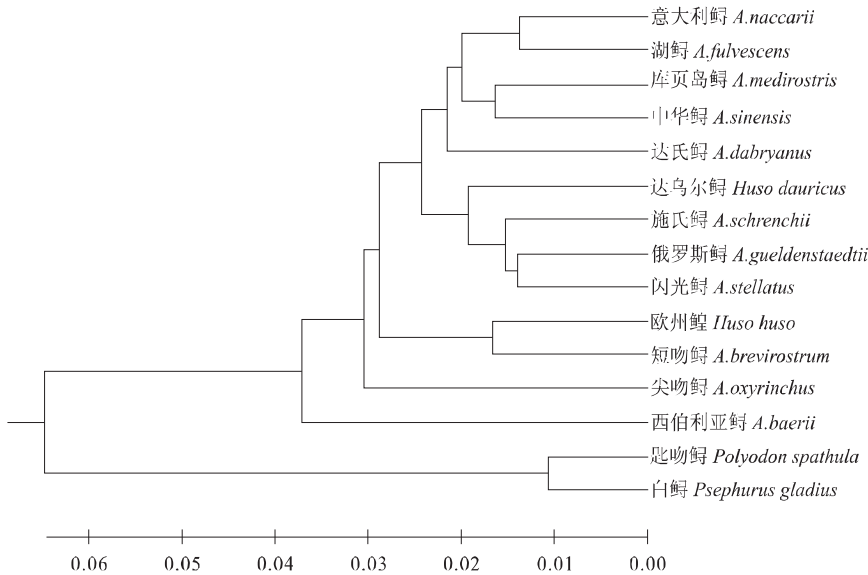


图 2 15 种鲟形目鱼类的 UPGMA 分子系统树
Fig. 2 UPGMA phylogenetic tree of fifteen species of Acipenseriforme

3 讨论

一般情况下,要扩增 2.5 kb 左右的 DNA 片段,常规的 Taq DNA 聚合酶和热循环方法就能够胜任^[7]。由于 rDNA 的 GC 含量比较高,容易形成 DNA 二级结构,扩增时常常会加二甲亚砜等以破坏

二级结构。但即使这样,也只能扩增比较短的片段,在扩增较长的片段时可能遇到多个二级结构,扩增难以成功。笔者曾尝试使用普通 Taq DNA 聚合酶、ExTaq DNA 聚合酶(Takara)、LA Taq DNA 聚合酶及相应的酶缓冲液均无法扩增得到目的片段。使用 ExTaq DNA 聚合酶配合 GC Buffer,在本研究的 PCR

循环方法下,可以扩增到目的片段,但存在较多非特异扩增产物,并且浓度不高;加少量二甲亚砜后得到一定改善,但仍然有非特异扩增带,不能满足要求。**LA Taq DNA 聚合酶和 GC Buffer** 一起使用则可以很好地扩增到目的片段,并且特异性很高,但若将退火延伸时间设定低于 6 min,则产物会显著下降,特异性也会降低。因此,扩增 GC 含量较高的模板^[19-20],用 **LA Taq DNA 聚合酶和 GC Buffer** 有可能会取得意想不到的效果。

鲟形目 rDNA 的限制性酶切位点中,有高达 77% (72/93) 的位点显示差异,比 mtDNA 的限制性片段的多态性^[7]要丰富一些;根据 rDNA 酶切片段计算得到的遗传距离(表 2)也比 mtDNA 的^[7]要大,说明鲟形目鱼类种间核 rDNA 存在广泛的序列变异,变异程度比 mtDNA 的大。通常,脊椎动物核 rDNA 比 mtDNA 的 rDNA 保守性要高,而 rDNA 的保守性比编码基因的要高,推测鲟形目核 rDNA 种间的高变异性可能与核 rDNA 中的 2 个内间隔子(ITS)有关。这是因为 ITS 在种间的变异程度比较大^[8-9],而 2 个 ITS 的长度占所分析的片段长度的 1/3,这样就增加了变异位点的数量。同时,发现有 4 个内切酶(*Afa* I, *Ava* II, *Dde* I, *Xsp* I)的酶切产物的电泳带大小加起来要大于 2.5 kb。这并非不完全酶切的结果,本实验重复多次,使用过量内切酶以

及延长酶切时间,所得结果完全一致。这种情况可能是鲟个体内 rDNA 存在 2 个以上等位基因,等位基因间主要是碱基替换引起的,其中的一些替换正好发生在酶切位点,这样在相同的位置,有的等位基因有酶切位点,有的没有。结果表明,PCR 扩增得到的片段大小相同,但酶切后电泳得到的 DNA 带的总长度就大于扩增片段的长度。**Krieger 和 Fuerst** 对几种鲟 18S rRNA 基因的研究,证实了鲟个体内 18S rRNA 基因存在多等位基因^[10-11]。对于变异性更大的 ITS,个体内不同拷贝间存在序列差异就更不足为奇了。rDNA 个体内序列多态性在动物中并不多见,尽管 rDNA 结构单元在基因组里存在多个拷贝,但各单元间保持协同进化,序列都是严格一致的^[8,10,15]。正如鲟 mtDNA 通常存在个体内及个体间异质性^[21-23]一样,rDNA 个体内和个体间普遍存在多态性可能也是这种低等的、多倍体鱼类的特征。目前,本研究还不能确定各种鲟 rDNA 有多少个等位基因,但进一步对包括外间隔区在内 rDNA 的研究,了解序列变异的特征及类型,对深入理解鲟形目的分子进化特点有重要意义。此外,*Hha* I 内切酶对所有鲟类 rDNA 酶切带型完全一致,说明这个酶切位点十分保守,可能对保持 rDNA 的功能有重要作用。

表 2 基于 rDNA 限制性酶切位点计算的 15 种鲟形目鱼类的遗传距离

Tab. 2 Genetic distance of fifteen species of Acipenseriforme based on restricted sites of rDNA %

	AN	HD	ASC	HH	AG	AST	AM	AF	ABA	AD	AO	ASI	ABR	PS
HD	0.037 0													
ASC	0.036 1	0.047 2												
HH	0.049 6	0.034 4	0.046 1											
AG	0.041 7	0.033 7	0.032 9	0.051 4										
AST	0.037 0	0.035 3	0.028 3	0.034 4	0.027 7									
AM	0.033 3	0.058 0	0.043 4	0.063 5	0.048 8	0.044 5								
AF	0.027 5	0.059 4	0.038 0	0.051 1	0.049 9	0.038 9	0.041 7							
ABA	0.073 3	0.084 8	0.060 7	0.067 8	0.080 6	0.069 5	0.079 9	0.059 4						
AD	0.049 5	0.060 7	0.046 1	0.066 2	0.038 9	0.047 2	0.043 4	0.031 7	0.075 1					
AO	0.066 7	0.070 6	0.048 8	0.055 3	0.054 0	0.043 4	0.066 2	0.060 7	0.093 3	0.068 9				
ASI	0.051 1	0.068 9	0.060 5	0.067 2	0.059 2	0.062 0	0.032 9	0.033 7	0.076 0	0.047 7	0.063 1			
ABR	0.043 1	0.055 1	0.053 7	0.033 3	0.074 2	0.055 1	0.058 1	0.059 6	0.070 3	0.084 2	0.071 4	0.084 8		
PS	0.116 9	0.139 2	0.135 0	0.125 3	0.151 1	0.160 9	0.132 1	0.126 1	0.129 1	0.145 3	0.138 0	0.124 6	0.123 75	
PG	0.101 1	0.122 4	0.118 9	0.118 9	0.134 0	0.142 2	0.125 3	0.110 1	0.142 2	0.138 0	0.140 9	0.118 4	0.107 2	0.021 1

注:ABA, 西伯利亚鲟; ABR, 短吻鲟; AD, 达氏鲟; AF, 湖鲟; AG, 俄罗斯鲟; AM, 库页岛鲟; AN, 意大利鲟; AO, 尖吻鲟; ASC, 施氏鲟; ASI, 中华鲟; AST, 闪光鲟; HD, 达乌尔鲟; HH, 欧洲鲟; PG, 白鲟; PS, 匙吻鲟。

Note: ABA, *A. baerii*; ABR, *A. brevirostris*; AD, *A. dabryanus*; AF, *A. fulvescens*; AG, *A. gueldenstaedtii*; AM, *A. medirostris*; AN, *A. naccarii*; AO, *A. oxyrinchus*; ASC, *A. screnckii*; ASI, *A. sinensis*; AST, *A. stellatus*; HD, *H. dauricus*; HH, *H. huso*; PG, *Psephurus gladius*; PS, *Polyodon spathula*.

根据 rDNA 酶切片构建的系统树(图2), 匙吻鲟科的2种鱼(白鲟和匙吻鲟)与鲟科的13种鱼首先分开, 而2种鲤(达乌尔鲤和欧洲鲤)没有聚到一块, 这点与已有的研究结果^[1-7]相同。但鲟科内的系统关系与前人的研究有很大的差别: 西伯利亚鲟和大西洋鲟分别与其他鲟形目鱼单独分开成一小支(图2)。使用邻接法(NJ)和最小进化法(ME)重建的系统树(未列出)与UPGMA树并没有太大区别。已有研究^[1,3-7]中尚未见任何一个种有如此明显分离, 这固然与 rDNA 的序列差异有关, 更重要的是由于个体内多等位基因的存在, 因取样的误差, 各个样本的等位基因数量不一致, 以及酶切位点的变化不同, 导致结果出现偏差。因此, 使用 rDNA 酶切片来构建鲟形目的分子系统树是不可靠的, 这与其他动物^[12-13]有区别。同样, 由于鲟鱼种间的 rDNA 存在明显的序列差异, 因此使用单个或多个等位基因序列来重建分子系统树仍然是一个很好的选择, 这也是笔者下一步要做的工作, rDNA 扩增分离的成功为此奠定了基础。

参考文献:

- [1] Bemis W E, Kynard B. Sturgeon rivers: an introduction to acipenseriform biogeography and life history[J]. Environ Biol Fish, 1997, 48: 167-183.
- [2] Birstein V J, Bemis W E, Waldman J R. The threatened status of acipenseriform species: a summary[J]. Environ Biol Fish, 1997, 48: 427-435.
- [3] Birstein V J, Hanner R, DeSalle R. Phylogeny of the acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches[J]. Environ Biol Fish, 1997, 48: 127-155.
- [4] Birstein V J, Desalle R. Molecular phylogeny of acipenserinae[J]. Mol Phylogenet Evol, 1998, 9: 141-155.
- [5] 张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 7种鲟形目鱼类亲缘关系的随即扩增多态性 DNA 研究[J]. 自然科学进展, 1999, 9: 20-26.
- [6] 张四明, 张亚平, 郑向忠, 等. 12种鲟形目鱼类 mtDNA ND4L-ND4 基因的序列的变异及其分子系统学[J]. 中国科学(C辑), 1999, 29(6): 607-614.
- [7] 汪登强, 危起伟, 王朝明, 等. 13种鲟形目鱼类线粒体 DNA 的 PCR-RFLP 分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 383-389.
- [8] Fritz G N, Conn J, Cockburn A, et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae)[J]. Mol Biol Evol, 1994, 11: 406-416.
- [9] Tang J, Toè L, Back C, et al. Intra-specific heterogeneity of their DNA internal transcribed spacer in the *Simulium damnosum* (Diptera: Simuliidae) complex[J]. Mol Biol Evol, 1996, 13: 244-252.
- [10] Krieger J, Fuerst P A. Evidence of multiple alleles of the nuclear 18S ribosomal RNA gene in sturgeon (Family: Acipenseridae)[J]. J Appl Ichthyol, 2002, 18: 290-297.
- [11] Krieger J, Fuerst P A. Characterization of nuclear 18S rRNA gene sequence diversity and expression in an individual lake sturgeon (*Acipenser fulvescens*)[J]. J Appl Ichthyol, 2004, 20: 433-439.
- [12] 王文, 宿兵, 兰宏, 等. 猕猴属6个种的 rDNA 变异及其系统进化关系[J]. 遗传学报, 1996, 23(5): 343-350.
- [13] Suzuki H, Kawamoto Y, Takenaka O, et al. Phylogenetic relationships among *Homo sapiens* and related species based on restriction site variations in rDNA spacers[J]. Biochem Genet, 1994, 32(7/8): 257-269.
- [14] Jansen G, Devaere S, Weekers P H H, et al. Phylogenetic relationships and divergence time estimate of African anguilliform catfish (Siluriformes: Clariidae) inferred from ribosomal gene and spacer sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2006, 38(1): 65-78.
- [15] Yoshizawa K, Johnson K P. Aligned 18S for Zoraptera (Insecta): Phylogenetic position and molecular evolution[J]. Mol Phylogenet Evol, 2005, 37(2): 572-580.
- [16] Vera M I, Rios H M, Fuente E, et al. Seasonal acclimatization of the carp involves differential expression of 5.8S ribosomal RNA in pituitary Cells[J]. Comp Biochem Physiol, 1997, 118B(4): 777-781.
- [17] Barnes W M. PCR amplification of up to 35 kb DNA with high fidelity and high yield from λ bacteriophage templates[J]. Proc Natl Acad Sci, 1994, 91: 2216-2220.
- [18] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76: 5269-5273.
- [19] 胡晓梅, 饶贤才, 黄建军, 等. 采用 PCR 技术从高 GC 含量绿脓杆菌模板中扩增长片段外毒素 A 全基因[J]. 第三军医大学学报, 2003, 31(9): 833-834.
- [20] 唐冬生, 严霞, 张勇, 等. 高 GC 含量的鳊鱼 rRNA 基因家族的克隆[J]. 中国生物工程杂志, 2005, (8): 60-64.
- [21] Brown J R, Beckenbach A T, Smith M J. Mitochondrial DNA length variation and heteroplasmy in populations of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*)[J]. Genetics, 1992, 132: 221-228.
- [22] Brown J R, Beckenbach K, Beckenbach A T, et al. Length variation, heteroplasmy and sequence divergence in the mitochondrial DNA of four species of sturgeon (*Acipenser*)[J]. Genetics, 1996, 142: 525-535.
- [23] 张四明, 邓怀, 汪登强, 等. 中华鲟 (*Acipenser sinensis*) mtDNA 个体间的长度变异与个体内的长度异质性[J]. 遗传学报, 1999, 26(5): 489-496.

Amplification and restriction sites analysis of rDNA in Acipenseriformes

WANG Deng-qiang, WEI Qi-wei, LUO Xiao-song, FANG Yao-lin

(Key Laboratory of Freshwater Fish Germplasm Resources & Biotechnology of Ministry of Agriculture, Yangtze River Institute of Fisheries, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Jingzhou 434000, China)

Abstract: The phylogenetic and evolutionary relationships within Acipenseriformes are of scientific significance, but views on it based on different data are also debated. In this paper, nuclear ribosomal DNA (rDNA) of two paddlefishes and thirteen sturgeons were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and nine restriction endonucleases (*Afa* I, *Ava* II, *Dde* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mbo* I, *Msp* I, *Nci* I, *Xsp* I) were used to digest the PCR products for testing the difference of restriction sites. The molecular phylogenetic tree of Acipenseriformes was also reconstructed based on genetic distance.

To amplify rDNA effectively, LA *Taq* DNA polymerase, GC buffer (Takara, Dalian) and long PCR method were used, and the expected DNA segments of about 2.5 kb were obtained. After suitable enzyme reactions, two endonucleases (*Msp* I, *Nci* I) produced nondescript DNA electrophoresis bands which were excluded in analysis here. Six to nineteen restriction DNA bands were identified respectively for the other seven endonucleases. The total number of restriction DNA electrophoresis bands was ninety-three, twenty-one of which were conservative and seventy-two were variable among the specimens of Acipenseriformes. *Hha* I generated six bands from all the 15 species, indicating the restriction sites play important roles in active functions of rDNAs. Total sizes of electrophoresis bands produced by four endonucleases did not equal to the sizes of PCR products, implying multiple alleles of rDNA existed in an individual of Acipenseriformes. The presence of multiple alleles within individuals may be an evolutionary character, just like mtDNA heteroplasm in sturgeons. The pair-wise genetic distances based on restriction sites ranged from 0.021 1 (*Polyodon spathulaus* *Psephurus gladius*) to 0.145 3 (*Polyodon spathulaus* *A. dabryanus*). The UPGMA molecular phylogenetic tree of the fifteen species was divided into two large clusters—two paddlefishes forming a cluster, whereas the sturgeons forming the other one. It was the same results as the reported ones. The relationship among sturgeons may be obscured by the presence of multiple alleles, which had some difference from the other research results that *A. baerii*, and then *A. oxyrinchus* was separated from the other species respectively. Future studies should focus on divergence investigation and allele types within and between individuals. [Journal of Fishery Sciences of China, 2006, 13(6): 885–890]

Key words: Acipenseriformes; rDNA; PCR; restriction sites

Corresponding author: WEI Qi-wei. E-mail: weiqw@yfi.ac.cn