

·研究简报·

魁蚶核糖体 DNA 基因转录间隔区的序列特征

陈琳琳,孔晓瑜,周立石,陈丽梅,喻子牛

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003)

摘要:以相应引物 PCR 扩增魁蚶(*Scapharca broughtonii*)的核糖体转录间隔子 ITS-1 和 ITS-2 片段,测序后得到长度分别为 461 bp 和 533 bp 的核苷酸序列(含引物)。其中 A、T、G、C 4 种碱基的含量分别为 21.91%、24.73%、28.20% 和 25.16%(ITS-1),27.02%、25.52%、25.52% 和 21.95%(ITS-2)。将这 2 个片段与其他双壳贝类的相应片段进行比较,发现 ITS-1 和 ITS-2 引物在贝类中具有较好的通用性。比较几种贝类的 ITS-1 片段发现有 1~100 bp 长度不等、弥散状态的插入/缺失;对 5 种蚶科贝类的 ITS-2 相应片段进行比较,发现中间有 75 bp 的保守区域,与本研究在魁蚶 ITS-2 群体序列研究中观察到的情况相同。

关键词:魁蚶;核苷酸序列;ITS-1;ITS-2

中图分类号:Q959.215;Q953 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2005)01-0104-05

魁蚶(*Scapharca broughtonii*)俗称赤贝、血贝,属瓣鳃纲(Lamellibranchia)、翼形亚纲(Pterimorphia)、蚶科(Arcidae),主要分布于中国、日本、朝鲜半岛及俄罗斯东南部沿海,是一种在中国、日本及韩国颇受欢迎的经济价值较高的贝类。近年来,由于水产业的发展及国外市场的需要,导致我国黄海海魁蚶捕捞强度增加,加上一些生态环境因素的影响,使之种群数量明显减少,产量降低,种质资源受到一定威胁。调查和研究魁蚶自然群体的遗传多样性现状,对魁蚶的种质资源的恢复、保护及遗传改良都具有重要的意义。

应用等位基因电泳技术对魁蚶遗传多样性研究已有报道^[1],但有关 DNA 水平的相关研究还很少。DNA 多态分析技术是各类生物的遗传、生态和进化等研究的重要工具,其应用包括从物种鉴定、遗传结构分析到群体的遗传结构变

化等多个方面。因为不论个体还是群体,任何遗传变异或多态最终都是 DNA 序列的差异或多态。DNA 序列分析可以检测到碱基替换、插入和缺失等变异信息,进而可以在分子水平上分析个体、群体及种间的多态与遗传变异。

核糖体转录间隔区(ITS)包括 ITS-1 和 ITS-2,分别位于核糖体 RNA 基因 18S 与 5.8S 及 5.8S 与 28S 之间(图1),由于 ITS 区为非转录间隔子,所以受到的选择压力较小,进化速率较快,信息含量丰富。由于 18S、5.8S 和 28S rDNA 的高度保守性,据此可设计出上下游引物,对 ITS 区进行 PCR 扩增和分析^[2-3]。本研究对魁蚶核糖体 DNA 转录间隔子 ITS-1 和 ITS-2 片段的遗传特性进行初步研究,并讨论了该片段潜在的应用价值。

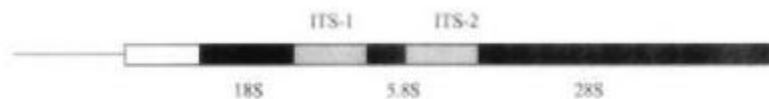


图1 核糖体 RNA 基因及其转录间隔区(ITS)关系示意图

Fig.1 Relationships between ribosomal RNA genes and internal transcribed spacers

1 材料与方法

1.1 材料

魁蚶样品采自山东威海,鉴定后取肌肉组织提取 DNA。

1.2 方法

采用常规的“酚-氯仿”方法提取基因组 DNA^[4]。PCR 扩增所用引物 ITS-1A/B 和 ITS-2A/B^[5]如下:

ITS-1A/ITS-1B: 5'-GGTTTCTGTAGGTGAACCTGC-3'/

收稿日期:2004-04-19; 修订日期:2004-07-21。

基金项目:国家“973”基础研究项目资助(G1999012008);中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放研究实验室项目资助(No. 307)。

作者简介:陈琳琳(1979-),女,硕士生,从事水产动物分子生物学研究。

通讯作者:喻子牛。E-mail:caizy@ouc.edu.cn

5'-CTGCGTCTTCATCGACCC-3'

ITS2A/ITS2B: 5'-GGGTGATGAAGAACGCAG-3'/5'-

GCTCTTCCCGCTTCACTCG-3'

扩增体系(30 μ L):模板DNA 1 μ L, dNTPs(2.5 mmol/L) 2.4 μ L, 每种引物(10 μ mol/L) 0.6 μ L, *Taq* 聚合酶(5 U/ μ L) 0.2 μ L, 3.0 μ L 10 $\times$ 缓冲液(含 Mg^{2+} , 上海生物工程公司), 其余体积用灭菌超纯水补足。用 Eppendorf AG 型 PCR 仪扩增:采用热启动 PCR, 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 35 个循环 94 $^{\circ}$ C/45 s; 50 $^{\circ}$ C (ITS-1)或 52 $^{\circ}$ C (ITS-2)/1 min, 72 $^{\circ}$ C/1 min; 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 最后 4 $^{\circ}$ C 保温。用 UNIQ-5(上海生工)柱式 PCR 产物回收试剂盒纯化 PCR 产物, pMD18-T 载体(大连

宝生物)连接, 克隆测序^[4]。

1.3 数据处理

测序结果经过人工校正核对, 用 MEGA 2 软件计算碱基含量; 将测序结果与其他几种双壳类相应的 ITS-1 或 ITS-2 序列用 CLUSTAL W 软件进行比对, 分析不同贝类的同源性及其片段的遗传特性。

2 结果与讨论

2.1 ITS-1 和 ITS-2 片段的序列特点

目的片段经 PCR 扩增得到整齐而清晰的扩增产物, 由图 2 可见, 2 个片段均位于 500 bp 左右。

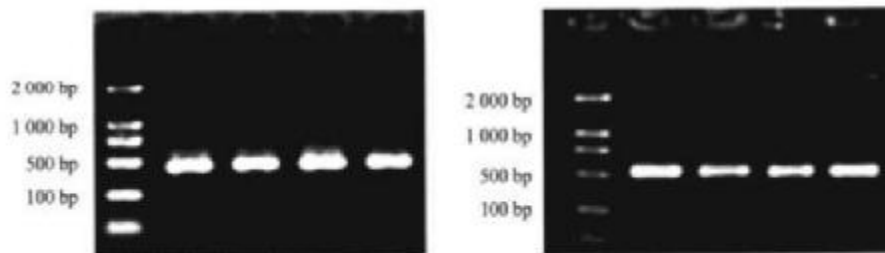


图2 4个魁蚶样品的 ITS-1(左)和 ITS-2(右)片段的 PCR 扩增产物(第一泳道为 DL2000 分子标记)

Fig.2 PCR amplified products of ITS-1 (left) and ITS-2 (right) from four individuals of bloody clam(The first lane is DL2000 Marker)

本研究共检测了 4 个个体的 ITS-1 和 ITS-2 序列片段, 去掉引物后分别得到长度为 421 bp 和 495 bp 的 DNA 序列(图 3)。

分析魁蚶 ITS-1 片段的遗传特性, 用 CLUSTAL W 对魁蚶及太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas* AF041761)、栉孔扇贝(*Chlamys farreri* AF245687)、驼背扇贝(*C. distorta* AJ428409)和欧洲多变扇贝(*Mimachlamys varia* AJ534979)的相应片段进行排序比较并对遗传特性进行分析(表 1)。结果表明, 魁蚶 ITS-1 基因序列中, A, T, G, C 的含量分别为: 21.91%, 24.73%, 28.20% 和 25.16%; G+C 含量高于 A+T 含量为 53.36%。Freire^[6]研究结果表明, 双壳类 ITS-1 的 G+C 含量一般在 45%~66%。魁蚶 ITS-1 片段的 G+C 含量则处于中间水平; 其他几种贝类的 G+C 含量分布在 46.05%~56.61%; 其中 3 种扇贝的 G+C 含量均低于

50%, 魁蚶和牡蛎的则高于 50%。

从表 1 中可以看出, 几种贝类在系统分类上亲缘关系较远, 虽然不同物种的 ITS-1 片段扩增所用引物不尽相同, 序列比较发现在引物 ITS-1A/B 的结合区域都高度保守, 为该片段用于双壳类的分子系统学研究提供了可能。从比较结果看, ITS-1 在这几种贝类中的长度为 291~537 bp, 片段内部的插入/缺失明显, 且弥散在整个 ITS-1 片段中, 没有较为固定的集中区域, 少的只有 4~5 bp 甚至单碱基插入/缺失, 多的有连续 50~100 bp 片段的插入/缺失; 相对于魁蚶而言, 其他种类的总插入/缺失片段长度范围在 52~170 bp; 经过在网上作 BLAST 比对, 魁蚶与其他几种贝类 ITS-1 序列间的同源性分别为: 魁蚶-栉孔扇贝 42.9%, 魁蚶-太平洋牡蛎 43.0%, 魁蚶-欧洲多变扇贝 47.9%, 魁蚶-驼背扇贝 40.8%, 可以看出魁蚶与这几种贝类的同源性相差不大。

```

1  GGAGGATCA TTACGAAAA CTGGGACAT GGTGTGATT GTTAAACA CAATGACC GACATGCC GAGATGGC TTTACGCC TTGACCTG
101 GCAGTCTCG AACAAGCTG ATGAGCTGC GGTGTGTGC CAGGAAAC TGGGCTTC ACTTGGT TTGGGTTC CINGTGGC AGCATGAC
201 ACGATCTGC GGAGAGGCT CTCTTTTGA GCGAGTGA AGAGGCAAC GTTACGCT CCGCCCGA AGCTGTCT TTTCGAAAT GTTTGCTC
301 ATGACGCT ATCGGAGTC CCGTCTGGA CACTCGCA GTGCTTGA ATGTTGCC AGTAGTCT CGAAACTG TTTAAAGG ATTAATCT
401 GCGGTGATC ACTGGCTCG T
1  CCAGTCTCT GAATTAATG GAATTCAGG ACACATGAA CATGATTC TTGAAGAC ATGAGCTT CCGGTACTC CCGAGCAAC GCTGTGTA
101 GGGTGGTTA AATACATC GCAAAATGA TTTTGGGC AAGTGGGT TGTGTGTT GAAGCTTC CTTTCAAC GTCCCTAA GDTTGTGC
201 GATTCGTTG TCTTTTCTA GCAGTCCCA TCTGCGAG AGAGTGTCT CCGGTGAT TCTATGAG GTTACGCT TCTGTGAT GCTGTTTG
301 GATGTTGCG AAAAAAGTA AGACATGAC AGGTCAAGG AAACAAAAT GAGGTACTT GTGCTTGC GTGGGCGG TACGAAAA TCTATTCA
401 TTATATGAC CTGATGAG AGAGATTC CCGTGAAT TACGATTC ACTAGCGA GGAAAGAA CTAACAAG TTTCTGAT AAGG

```

图3 魁蚶 ITS-1(上, Genbank accession No: AY380534)和 ITS-2(下, Genbank accession No: AY594286)核苷酸序列

Fig.3 ITS-1(Top, Genbank accession No: AY380534) and ITS-2 (Bottom, Genbank accession No: AY594286) sequences from bloody clam *S. broughtonii*

表1 5种双壳贝类 ITS-1 序列比较

Tab.1 Comparison of ITS-1 gene fragment among 5 bivalves

种类 Species	碱基组成/% Base composition				片段长度/bp Length
	A	T	G	C	
蛎目					
蛎科 Arcidae					
魁蚶 <i>S. broughtonii</i>	21.91	24.73	28.20	25.16	53.36
珍珠贝目					
扇贝科					
栉孔扇贝 <i>C. farreri</i>	31.56	21.24	21.83	25.37	47.20
欧洲多变扇贝 <i>M. varia</i>	29.83	22.49	21.03	26.65	47.68
驼背扇贝 <i>C. distorta</i>	31.27	22.68	22.34	23.71	46.05
牡蛎科					
太平洋牡蛎 <i>C. gigas</i>	23.65	19.74	29.42	27.19	56.61

魁蚶 ITS-2 基因序列中,4种碱基 A、T、G、C 的含量分别为:27.02%、25.52%、25.52%、21.95%,G+C 含量低于 A+T 为 47.47%;A 或 T 连续出现的频率较高,有些位置甚至连续出现 7 个 A 或 T 碱基,类似特点在 ITS-1 片段中没有发现。Freire^[6]研究结果表明,双壳贝类 ITS-2 的 G+C 含量的变化范围为 45%~68%,从魁蚶 ITS-2 片段的 G+C 含量可以看出,其处于较低的水平;与 ITS-1 中 G+C 和 A+T 的相对含量情况相反。

在 GenBank 中检索到蛎科(Arcidae)4 种贝类的 ITS-2 序列,分别为不等壳毛蚶 *S. inaequivalvis* (AB101596)、大毛蚶

S. satonoi (AB101597)、Ark Clam *S. sativa* (AB101598)、泥蚶 *Tegillarca granosa* (AB101602),与本研究中的魁蚶 ITS-2 序列 CLUSTAL W 比对结果如下(图 4)。

本实验所测魁蚶 ITS-2 序列包括部分 5.8S 基因序列,整个 ITS-2 序列,以及部分 28S 基因片段,而其他几种蛎类的 ITS-2 较靠近 28S 一端,因而相应部分较短。从相应片段比较结果看,中间有 75 bp 的保守序列,与本研究在魁蚶 ITS-2 群体序列研究中观察到的情况相同(待发表),推测这个保守序列可能与 ITS 的某种功能有关。

<i>S. broughtonii</i>	GTA-----GCTTGTCGC TTGGGCTGCG GGCAGTACCG AAAAATCTCA TTTCATTCAT	[60]
<i>S. inaequivalvis</i>		[60]
<i>S. satonoi</i>	C.....	[60]
<i>S. sativa</i>		[60]
<i>T. granosa</i>	..GCAAGAGGG..C...T...T...AAA...G.C...C...AT...TC...	[60]
<i>S. broughtonii</i>	CCGACCTCAG ATCAGACGAG ATTACCGCT GAATTTAAGC ATATCACTAA GCGGAGGAAA	[120]
<i>S. inaequivalvis</i>		[120]
<i>S. satonoi</i>		[120]
<i>S. sativa</i>		[120]
<i>T. granosa</i>		[120]
<i>S. broughtonii</i>	AGAAACTAAC AAGGATTCTC CTAGTAAACG <u>CGAGTGAAGC GCGAAGAGC</u>	[169]
<i>S. inaequivalvis</i>	A...A...	[169]
<i>S. satonoi</i>	A...A...	[169]
<i>S. sativa</i>	T.....A...A...	[169]
<i>T. granosa</i>	C.....A...A...	[169]

图4 5种蛎类 ITS-2 相应序列比较(下划线为引物 ITS-2B 序列)

Fig.4 Comparison of partial ITS-2 sequence of five clams (ITS-2B primer sequence is underlined)

在已研究的无脊椎动物的 ITS 区序列中,ITS 存在着多层次水平的变异,如:种间变异性、种内变异性以及个体内的变异性^[2]。Navajas 等^[7]通过对北半球 12 个国家 18 个不同地点的叶螭科的 *Tetranychus urticae* 及其相近种的 ITS-2 序列的分析,证明了其种内序列不存在变异,而在种间存在着明显的变异。Eizendor 等^[8]研究了番红砗磲核糖体 DNA 转录间隔子区域的序列,结果发现 ITS 序列具有非常高的多态性,其中碱基的替换占 29%,表明 ITS 序列可以用来做种群

的遗传分析。Chu 等^[9]对甲壳类的研究发现同一个体内即基因组内存在差异。

目前,ITS 序列已应用于双壳贝类的遗传学研究。在分子系统学研究方面,对贻贝、帘蛤科、扇贝科的 ITS 区进行扩增和限制性酶切,通过分析限制性片段及酶切图谱研究了多种贝类系统学关系^[10-13]。King 等^[14]用 ITS 序列对淡水贝类 *Lasmigona subviridis* 进行了地理系统学研究,表明 ITS 序列是适用于这一研究的一个有效片段。Ara Insa 等^[15]用

ITS 区对扇贝科 4 个种进行了系统发生关系研究,发现单独使用 ITS 1 或 ITS 2 或同时使用两个片段进行系统学分析结果相似,不过结合两个片段得到的遗传信息应该会更为全面。

迄今为止,很多分子系统学或种群遗传学方面的研究主要是以线粒体基因序列分析为分子标记而进行的,而核基因或序列方面的研究工作相对较少。本研究测定了魁蚶 ITS 1 和 ITS 2 片段的 DNA 序列,通过分析 2 个片段的序列的遗传特性,并综合该区域以往在其他贝类中的应用情况,认为 ITS 区可以应用于贝类的分子系统学或种群遗传结构方面的研究。而且,将核基因序列的分析研究方法和线粒体基因的研究技术相互结合,将有助于对物种的进化历程、系统关系以及种群的遗传结构有一个更全面、更深入的认识。

参考文献:

- [1] 喻子牛,杨锐,孔晓瑜,等.青岛近海魁蚶群体等位基因遗传变异研究[J].海洋湖沼通报,1997,03:33-38.
- [2] 唐伯平,周开亚,宋大祥.核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用[J].动物学杂志,2002,37(4):67-73.
- [3] Kong Xiu-yu, Zhang Liu-suo. Sequencing of ribosomal internal transcribed spacer regions and mitochondrial gene fragments in *Crassostrea gigas* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(4):304-308.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里克 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 北京:科学出版社,1995.
- [5] Hedgecock D, Li G, Banks M A, et al. Occurrence of the Kuramoto oyster *Crassostrea sikamae* in the Ariake Sea, Japan[J]. Marine Biology, 1999, 133(1):65-68.
- [6] Freire R. Análisis de secuencias de ADN ribosómico en bivalvos y mejillones de la costa europea[D]. Coruna: Universidade da Coruna, 2002.
- [7] Navajas M, Lagrel J, Gutierrez J, et al. Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS-2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae* contrasts with extensive mitochondrial COI polymorphism[J]. Heredity, 1998, 80(6):742-752.
- [8] Elmadfa Yu T, Ma Antonette Juinio-menez, Monie V D. Sequence variation in the ribosomal DNA internal transcribed spacer of *Tridacna crura* [J]. Mar Biotechnology, 2000, 2(6):511-516.
- [9] Chu K H, Li C P, Ho H Y. The first internal transcribed spacer (ITS-1) of Ribosomal DNA as a molecular marker for phylogenetic and population analyses in Crustacea[J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(4):355-361.
- [10] Dixon D R, Sole-Cava A M, Pascoe P L, et al. Periostracal adventitious hairs on spat of the mussel *Mytilus edulis* [J]. Mar Biol Assoc, U K, 1995, 75:363-372.
- [11] Heath D D, Hatcher D R, Hilbish T J. Ecological interaction between sympatric *Mytilus* species on the west coast of Canada investigated using PCR markers. [J] Mol Ecol, 1996, 5(3):443-447.
- [12] Fernandez A, Garcia T, Asensio L, et al. PCR-RFLP analysis of the internal transcribed spacer (ITS) region for identification of 3 clam species[J]. Food Sci, 2001, 66(5):657-661.
- [13] López-Piñón M J, Insua A, Méndez J. Identification of four scallop species using PCR and restriction analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region [J]. Mar Biotechnol, 2002, 4(5):495-502.
- [14] King T L, Eackles M S, Gjertvåg B, et al. Intraspecific phylogeography of *Launigona subviridis* (Bivalvia: Unionidae); conservation implications of range discontinuity[J]. Mol Ecol, 1999, 8(12):S65-S78.
- [15] Ana Insua, López-Piñón M J, Ruth Freire, et al. Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae) [J]. Genome, 2003, 46(4):595-604.

Sequence analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacers of bloody clam, *Scapharca broughtonii*

CHEN Lin-lin, KONG Xiao-yu, ZHOU Li-shi, CHEN Li-mei, YU Zi-niu

(Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: Mainly distributed in coast waters of China, Korea, Japan and southeast Russia, bloody clam *Scapharca broughtonii* has been a very important commercial bivalve in China. In the past few years, however, the culture intensity in China increased significantly due to strong demand of bloody clam in both domestic and overseas markets, which led to a potential pressure on stock management for this species. Therefore, it is very necessary and important to investigate genetic diversity and genetic structure of bloody clam populations. By now, very little research has been done in this field in bloody clam at DNA level. Ribosomal DNA internal transcribed spacer (ITS-1 and ITS-2) fragments are very useful nuclear molecular markers and have been used in phylogenetic analysis and population diversity studies in many species. Because the coding regions flanking the two segments are conserved, it is very convenient to design primers and amplify the two segments.

ITS-1 and ITS-2 segments of bloody clam were amplified via PCR [94 °C pre-denaturalization 2 min, 35 cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C (ITS-1) or 52 °C (ITS-2) for 1 min and 72 °C for 1 min]. The PCR products were ligated into T-vectors, cloned and directly sequenced by following regular procedures. The nucleotide sequences of ITS-1 and ITS-2 at 461 bp and 534 bp (primers included) were obtained, respectively. The contents of A, T, G and C were 21.91%, 24.73%, 28.20% and 25.16% in ITS-1; 27.02%, 25.52%, 25.52% and 21.95% in ITS-2, respectively. The content of G + C in ITS-1 was higher than that in ITS-2 and the content of G + C in the two fragments was at a moderate level among bivalves according to previous researches.

These two fragments were compared with the corresponding fragments from several other bivalves, such as oyster, scallops and clam. The results showed that the primers of ITS-1 and ITS-2 were universal in a variety of mollusk species. It was found that the insertions/deletions (ranging from 1 to 100 bp) were dispersed randomly in the whole ITS-1 fragment. Four to five bases or even single base insertion/deletion was very common and 50 ~ 100 bp of long insertion/deletion was found too. A seventy-five-base conserved segment in ITS-2 sequence was found by comparison among five Arcidae species, which was very similar to the result in our population study with the ITS-2 fragment in *S. broughtonii*. This work could be a good step forward to the studies of genetic diversity in bloody clam using sequence data of ITS-1 and ITS-2. If combined with mtDNA sequence data, ITS sequences could be more informative and useful in studies of populations, evolution and phylogenetics.

Key words: *Scapharca broughtonii*; nucleotide sequence; ITS-1; ITS-2

Corresponding author: KONG Xiao-yu. E-mail: carlzyu@ouc.edu.cn