

暗纹东方鲀线粒体DNA控制区结构和系统发育分析

邵爱华^{1,2}, 朱江¹, 史全良¹, 陈葵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*)肝脏线粒体DNA为模板,参照GenBank中红鳍东方鲀(*Takifugu rubripes*)线粒体DNA序列设计合成特异引物进行PCR扩增,获得了暗纹东方鲀线粒体DNA控制区基因(818 bp)及5'端上游的tRNA^{Phe}基因(71 bp)的全序列。控制区碱基组成为T 32.2%, C 19.1%, A 35.6%, G 13.2%。对照其他已报道的鱼类控制区结构,对暗纹东方鲀控制区的结构进行了分析,识别了其终止序列区、中央保守区和保守序列区,找到了终止相关的序列TAS以及保守序列(CSB1, CSB2, CSB3)。CSB1、CSB2序列相对保守, TAS与其回文基序可形成稳定的茎环结构,成为H-链复制延伸时的终止识别位点。同时运用DNA分析软件对暗纹东方鲀与GenBank中其他10多种鱼类的mtDNA控制区序列进行比对,并选取东方鲀属的7种鱼类mtDNA控制区序列构建分子系统树。结果显示控制区基因较适于鲀科鱼类中同属不同种的系统发育分析。[中国水产科学, 2007, 14(3): 352—360]

关键词:暗纹东方鲀; mtDNA控制区; 系统关系

中图分类号: Q959.468

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2007)03-0352-09

自20世纪80年代以来,线粒体DNA(mtDNA)以其较快的进化速度、严格的母系遗传、几乎不发生重组等特征成为群体遗传学和分子系统学研究的可靠标记^[1-3]。在线粒体DNA中,控制区又称为替代环区(Displacement-loop region, D-loop)或D-环区。它是线粒体基因组中最主要的一段非编码区,位于tRNA^{Phe}和tRNA^{Pro}基因之间,是变化最大、最复杂、最有意义的区域,也是线粒体基因组进化最快的部分,因此利用控制区来进行近缘种间的系统进化研究和探讨快速物种形成,已成为分子进化研究的一个重要方面。mtDNA分子的长度差异也被证明是源自于该区不同长度的重复序列的发生。控制区DNA的结构在已研究的生物中都是类似的,一般包含有H-链复制起始区(OH)、保守序列节段(CSB)、L链启动子(LSP)、H链启动子(HSP)以及终止结合序列(TAS)等结构元件,另外还包括了一些功能保守序列。研究主要以哺乳动物居多^[4-5],近年来报道了一些鱼类的控制区DNA研究,如鲤属(*Cyprinus*)、大口胭脂鱼(*Ictiobus cyprinellus*)、鲮鱼(*Bitterling*)、鲃科(*Bagridae*)等保守序列的识别^[6-13]。但尚有关暗纹东方鲀的报道。

暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)属硬骨鱼亚纲

(Osteichthyes)、鲀形目(Tetrodontiformes)、鲀科(Tetraodontidae)、东方鲀属(*Takifugu*),系北太平洋西部地区性分布的鱼类。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^[14-15]。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^[16]。暗纹东方鲀肉质鲜美且具有药用价值,是具有极高经济价值的特种水产养殖对象^[17]。本研究组已克隆了暗纹东方鲀mtDNA的Cyt b、COI、COII和COIII等基因^[18-20],本文报道了暗纹东方鲀mtDNA控制区的克隆和序列分析结果,并与GenBank中多个目的鱼类进行同源性比较分析,有助于进一步探讨鲀属鱼类系统进化和物种形成方式。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验暗纹东方鲀(养殖体)购自苏州南门水产品市场。限制性内切酶、Premix Ex Taq酶、DNA片段回收试剂盒、pMD 18-T载体为Takara公司产品, DNase I、RNase、连接酶及其他主要试剂为Sigma公司产品,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。

收稿日期: 2006-09-14; 修订日期: 2006-12-18.

基金项目: 农业部行业标准资助项目(2002-04084), 苏州科技学院科研基金项目(2005-Z862).

作者简介: 邵爱华(1968-), 女, 博士生, 讲师, 从事水生动物分子生物学研究. E-mail: ahs6892@yahoo.com.cn

通讯作者: 朱江. Tel: 0512-65880278; E-mail: zjiang@suda.edu.cn

1.2 暗纹东方_𩚑线粒体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^[21]的方法,对破膜条件及消除核DNA污染等方面加以了改进^[22]。

1.3 暗纹东方_𩚑线粒体控制区基因的克隆与筛选

1.3.1 引物设计 参照红鳍东方_𩚑线粒体DNA序列(GenBank登录号AJ421455),选择位于控制区两侧保守性较高的区域,设计合成暗纹东方_𩚑控制区的PCR扩增引物:

上游引物 P₁:5'-TCTTGTAACCGAATGTC-3'

下游引物 P₂:5'-GCGTAGCTTAACCAAAGC-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 ExTaq酶0.2 μ L,每个循环包括94 $^{\circ}$ C变性30 s,53.8 $^{\circ}$ 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片段回收试剂盒纯化回收后,与pMD 18-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,进行重组子筛选和质粒提取。PCR扩增法和限制性内切酶酶切法鉴定目的片段的插入。上述操作方法参照Sambrook分子克隆手册^[23]。

1.4 序列测定和系统发育分析

选取3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 PRISM™ 377型。根据暗纹东方_𩚑线粒体控制区的序列,在GenBank数据库中有选择性地检索出分类地位上较相近的其他10种同目、同属鱼类的mtDNA控制区序列,利用Clustal X软件排定DNA序列,并进行人工核查。在此基础上,用MEGA3.0^[24]将暗纹东方_𩚑与10种鱼类mtDNA控制区的序列进行比对分析,计算不同序列间的核苷酸同源性和碱基组成频率;用MEGA软件基于Kimura 2-parameter距离采用邻接法(NJ)和最大简约法(MP)构建分子系统树。系统树各分支的置信度由1 000次自举法(bootstrap)重复检测。

2 结果与分析

2.1 暗纹东方_𩚑线粒体mtDNA控制区及其上游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,分子量约1.0 kb。此扩增产物经纯化回收后与pMD 18-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单酶切以及EcoR I/Hind III双酶切,电泳结果显示单酶切得到重组质粒分子量约3.7 kb;双酶切除去2.7 kb的载体外,得到约1.0 kb的片段。以重组质粒为模板,P₁、P₂为引物,扩增得到1.0 kb左右的片段。上述结果证明,所得到的重组质粒有目的片段插入(图1、图2)。

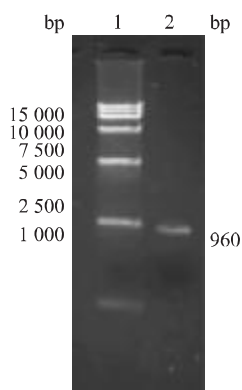


图1 暗纹东方_𩚑 mtDNA D-loop 基因片段的PCR扩增

1. DL15000 Marker 2. 扩增片段

Fig. 1 D-loop PCR products of *T. fasciatus*

1. DL15000 Marker 2. The PCR products

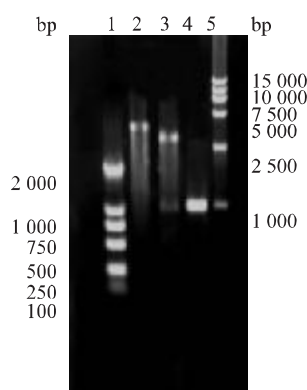


图2 提取重组质粒的DNA酶切鉴定

1. DL2000 Marker 2. EcoR I 3. EcoR I/Hind III 4. 扩增片段 5. DL15000 Marker

Fig. 2 Identification of PMD 18-T-D-Loop

1. DL2000 Marker 2. EcoR I 3. EcoR I/Hind III 4. The PCR products 5. DL15000 Marker

克隆片段全长 960 bp, 其中包括 mtDNA 控制区 818 bp 以及 5' 端上游的 tRNA^{Pro} 基因 71 bp (图 3)。所克隆的序列已在 GenBank 登录 (登录号为

AY952463)。

测序的全序列分析如下:

```

Primer 1(P1)
CATGCGCTGCAGGTCGACGATCTCTGTAAACGGAATGTCGGGGGTTAAATGCCCGCTTATGCTCAAAAAGAAAGGGAGCTTCAACCGCCACGACITGGCTCCG 100
D-loop
AAAGGCAGCATTCTTAATTAAGTAGCTTTGATAATACATATATGTATTATGCCGATTGATATATTAAGCATTAAATGATACTAAGACATA 200
(TAS)
GTATTATATATTCACTTATAATACCTTCAACACATAAAGCAAGTACAGAAAAGTAAAGTGCTAGAAGCATAATTAGAAAATTTCCTTAAAAATTATTAAC 300
AAACTGAACGAAATTCAGACCGAACAATAAACTCATCAGTCAAGATATACCAGGACTCAACATCCTATAAAATACCAAGTATTAATGTAGTAAGAACCG 400
-----CSB-F-----
ACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATATTATTATTGAAGGTGAGGGACAATAACAGTGGGGGTTTCACTAAATGAACATATCTGCGCATTTGGTTCTCTACT 500
-----CSB-E-----
TCAGGGCCATTAATTGATTCACTCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGACATAAGTTGTTGGTGGAGTCCATCAGTGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCT 600
CTCCACAGGGGTCAGGTTATTTTTTCTTTCTTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGGTCACCGGTTTCATCAAGTTGAACATTTTCTTGGTTT 700
ATGGAATGTTAGTTAATGAATTGAGATATCATATAAGAATTACATTATTGATATCAAGGACATAAATAATAATACGATTCAACAATCATACAATTTTAC 800
-----CSB1-----
CCCCTTCTTCTTTTTAAAGATTTAAGCTATACCGCCGCTACCGCCGCAAAAAATAGGAGAAACCTTTAGGCTTGAACCAAGCCCTCCACTTAATTAAT 900
-----CSB2-----
ATTCATCATATTATTATCATATATTATAATATTATAATAATATATATGCTAGCGTAGCTTAACCAAGCAATCTCTAGAGGATGCCGGGTACCGA 1000
D-loop
GCTCGAATTGCG 1011
Primer 2(P2)

```

图 3 暗纹东方鲀 mtDNA 控制区及 tRNA^{Pro} 基因的核苷酸全序列

Fig. 3 Complete nucleotide sequence of *T. fasciatus* control region and tRNA^{Pro} gene

2.2 暗纹东方鲀 线粒体 DNA 控制区的长度及碱基组成

对比已报道的鲫鱼 (*Carassius auratus*)、草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、鲤鱼 (*Cyprinus cap-is*)、斑马鱼 (*Danio rerio*)、新疆雅罗鱼 (*leuciscus merzbacheri*)、大口胭脂鱼、鳊鱼 (*Siniperca*) 等^[6-7,9-12,25-27]的 mtDNA 序列,找到了暗纹东方鲀 mtDNA 控制区的起点和终点,确定暗纹东方鲀 mtDNA 控制区的长度为 818 bp。

暗纹东方鲀 mtDNA 控制区与其他鱼类的比较如下:

同属的红鳍东方鲀的控制区序列为 821 bp,与之相比,暗纹东方鲀 mtDNA 控制区没有发现太多的插入和重复,存在 3 个碱基位点的缺失,核苷酸同源性高达 94.03%;同属的其余 5 种鱼类:褐纹东方鲀 (*T. exascurus*) (AY599623)、豹纹东方鲀 (*T. pardalis*) (AY599624)、紫色东方鲀 (*T. porphyreus*) (AY599625)、施氏东方鲀 (*T. snyderi*) (AY599626)、密点东方鲀 (*T. stictonotus*) (AY599627) 仅报道了 613~626 bp 控制区的部分序列。同科不同属的两种鱼类:八字河鲀 (*Tetrodon biocellatus*) (AJ248473)、黄金河鲀 (*Tetrodon fluviatilis*) (AJ248455) 报道了 811 bp 和 808 bp 的控制区序列。比较了它们和暗纹东方鲀 之间控制区序

列的核苷酸同源性和碱基组成特点 (图 4), 同属间的核苷酸同源性高约 92~94% 左右。而同科不同属间的核苷酸同源性分别为 86.45% 和 69.07%。

同目翻车鲀科翻车鲀属的翻车鲀 (*Mola mola*) (Ap006238) 的控制区序列为 817 bp, 与暗纹东方鲀的核苷酸同源性为 55.52%; 翻车鲀属的矛尾翻车鲀 (*Masturus lanceolatus*) (Ap006239) 仅报道了 192 bp 控制区的部分序列; 鳞鲀总科的缙纹多棘鳞鲀 (*Sufflamen fraenatus*) (Ap004456) 控制区的长度为 875 bp; 丝背细鳞鲀 (*Stephanolepis cirrifer*) (Ap002952) 仅报道了 665 bp 控制区的部分序列。

选取分类地位较为接近的鲈形目中金枪鱼 (*Thunnus thynnus*) (Ap003091) 作比较: 金枪鱼的控制区序列为 865 bp, 与暗纹东方鲀的核苷酸同源性仅为 37.36%。

比较的几种鱼类线粒体 DNA 控制区序列组成情况见表 1。

暗纹东方鲀 mtDNA 控制区的碱基组成分别为: 胸腺嘧啶 (T) 32.2%; 胞嘧啶 (C) 19.1%; 腺嘌呤 (A) 35.6%; 鸟嘌呤 (G) 13.2%, 以碱基 A 的含量最高, T 的含量次之, 碱基 G 的含量最低。与其他 10 种鱼类对比, 各碱基含量基本相似; 几种鱼类线粒体 DNA 控制区的 (A+T)% 远高于 (G+C)%。

表 1 几种鱼类的线粒体 DNA 控制区序列组成比较

Tab. 1 Numbers and frequencies of D-loop between *T. fasciatus* and the other species

种类 Species	序列总长/bp Total length	核苷酸同源性/% Nucleotide homology	碱基组成/% Base composition			
			T	C	A	G
暗纹东方魮 <i>T. fasciatus</i>	818		32.2	19.1	35.6	13.2
红鳍东方魮 <i>T. rubripes</i>	821	94.03	32.6	18.8	35.3	13.3
褐纹东方魮 <i>T. exascurus</i>	616	91.98	30.8	19.6	33.0	16.6
豹纹东方魮 <i>T. pardalis</i>	613	92.94	31.8	18.9	33.3	16.0
紫色东方魮 <i>T. porphyreus</i>	616	93.65	30.0	20.0	33.8	16.2
施氏东方魮 <i>T. snyderi</i>	626	93.75	30.8	19.3	33.2	16.7
密点东方魮 <i>T. stictionotu</i>	616	92.53	31.2	18.7	33.3	16.7
八字河魮 <i>Tetrodon biocellatus</i>	811	86.45	30.0	20.6	32.2	17.3
黄金河魮 <i>Tetrodon fluviatilis</i>	808	69.07	28.0	22.5	30.9	18.6
翻车魮 <i>Mola Mola</i>	817	50.52	30.5	20.2	32.8	16.5
金枪鱼 <i>Thunnus thynnus</i>	865	37.36	30.4	22.7	31.0	16.0

(TAS)			
TFA	TAATACATATATGTATTATCCGCATTGATATATATTAACATTAATACAATGCATAACTA	60	
TRU	TAATACATATATGTATTATCCGCATTGATATATATTAACATTAATATAATGCATAATTA		
TEX	-----		
TPA	-----		
TSN	-----		
TST	-----		
TPO	-----		
TBI	--TTACATATATGTAATATCACCATGAATATATATGAACCATATAATAGTATGTTATATA		
TFL	--TTGCATATATGTAATATCACCATGCATATATATTAACCATATAAGGAAGTGT---ATA		
TFA	AGACATAGTATTATATATTCAGTTATAATACGTTCAACACATAAAGCAAGTACAGAAAAAC	120	
TRU	AGACATAGTACTATATATTCAGCTATAGTTCTGATAACCCATAAAGCAAGTACAGGAAGC		
TEX	-----AAGC		
TPA	-----AAGC		
TSN	-----AAGC		
TST	-----AAGC		
TPO	-----AAGC		
TBI	AAACATATATAGATTAATAA--CCTAAAACCTGAATTAACACATAAAGCAGGGATAATTAAA		
TFL	TTACATAACTGGATAATTA---CTTAAACCTGGGGTAGTGCATAAAGCAGGAACAATAAAC		
TFA	TAAAA-G-TGCTAGAAGCAT-AATTAGAAAAATTCCTA-AAAATTATTAACAACTGAAC	180	
TRU	TAAAA-A-TGCTAAAAGCAT-AACTGGAAAAATCCCTA-AAAATTGTTCAAAAACCTGAAC		
TEX	TAAGA-A-TGCTAAAAGCAT-AAATGGATTA-TCCCTA-CAAATTATTA-AACTGAAC		
TPA	TAAAG-A-TACTAAAAGCAT-AACTGGAAAA-CCCCTA-TAAATTATTA-AACTGAAC		
TSN	TAAGA-A-TGCTAAAAGCAT-AAATGAAAAATCCCTAAATAAATTGTTAAAAAACTGAAC		
TST	TAAGA-A-TGCTAAAAGCAT-AAATGAACAATCTCCAA-TAAATTGTTAAAAAACTGGAC		
TPO	TAAAA-AATGTTAAAAGCAT-AATTGAAAAA-TCCCTA-ATAATTGTTAAGAAACTGAAC		
TBI	TGTAA-AAGGCATGAGACAT-AATTGGAACA--GACAA--GACTTGTAAGGGAATGTAA		
TFL	GGAAGGAAGACATGAAGCATTAATTGAAACA--GACAA--AACT-GTAAAGGAACATGAC		
TFA	GAAATTTTCAGACCGAACAATAAA-CTCATCAGTCAAGATATACCAGG-ACTCAACATCCT	240	
TRU	GAAATTTAAGACCGAACAATAAA-CTCATCAGTTAAGATATACCAGG-ACTCAACACCCC		
TEX	GAAATTTAAGACCGAACAATAAA-CTCATTAGTTAAGATATACCAGG-ACCCAACATCCC		
TPA	GAAATTTAAGACCGAACAATAAA-CTCATCAGTTGAGATATACCAGG-ACTCAACATCCT		
TSN	GAAATTTAAGACCGAACAGTAAA-CTCATCAGTTAAGATATACCAGG-ACTCAACATCCC		
TST	GAAATTTAAGACCGAACAGTAAA-TTCATCGGTTAAGATATACCAAG-ACTCAACATCCT		
TPO	GAAATTTAAGACCGAACAATAAA-CTCACCAGTCAAGATATACCAGG-ACTCAACATCCC		
TBI	AAAATTCAGATCTACCATCAAGACTCATCAGTCAAGATATACCAAGAATAACAACATCCC		
TFL	AATATTCAAGACCTACCACTAAG-CTCATTAGTCAAGATATACCAAGTACTCAACACCTC		
-----GSB-F-----			
TFA	ATAAAATACCAAGTATTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATAT	300	
TRU	GTAAAATACCAATTATTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATAT		
TEX	GTAAAATACCAATTATTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATAT		
TPA	GTAAAATACCAATTATTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATAT		
TSN	GTAAAATCCCAATAATTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATAT		
TST	ATAGAATACCAATAATTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATAC		
TPO	GTAAAATACCAACAATTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCTTAATGCATAC		

TBI	GTCAATCTCAAATATTTAATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCCTTAATGCATAC	
TFL	GTCAAAACCCAA-ATCCGATGTAGTAAGAACCGACCATCAGTTGATTTCCTTAATGCATAC	
	-----CSB-E-----	
TFA	TATTATTGAAGGTGAGGGACAATAACAGTGGGGGTTTCACTAAATGAACTATTCTGGCA	360
TRU	TATTATTGAAGGTGAGGGACAATAACAGTGGGGGTTTCACTAAATGAACTATTCTGGCA	
TEX	TATTATTGAAGGTGAGGGACAATGATAGTGGGGGTTTCACTAAATGAACTATTCTGGCA	
TPA	TATTATTGAAGGTGAGGGACAATAAATAGTGGGGGTTTCACTAAATGAACTATTCTGGCA	
TSN	TATTATTGAAGGTGAGGGACAATAACAGTGGGGGTTTCACTAGGTGAATTATTCTGGCA	
TST	TATTATTGAAGGTGAGGGACAATAACAGTGGGGGTTTCACTAGGTGAATTATTCTGGCA	
TPO	CATTATTGAAGGTGAGGGACAATAACAGTGGGGGTTTCACTAAGTGAATATTCTGGCA	
TBI	TCTTATTGATAGTGAAGGGACAATCTGGGGTCCCCTTCTTGAATTATTCTGGCA	
TFL	TCTTATTGATAGTGAAGGGACAACCATCTGAGGGTCCGACTTCTTGAATTATTCTGGCA	

TFA	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAATTGATTCACTCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	420
TRU	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAATCGATTATTCTCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	
TEX	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAATTGGTTTCATCCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	
TPA	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAATTGGTTTCATCCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	
TSN	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAACAGTGGTTTCATCCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	
TST	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAATTGGTTTCATCCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	
TPO	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAATTGACTTATTCTCCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	
TBI	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATTAATTGAA-TATCGCTCATTCTTTTCATCGACGCTGAC	
TFL	TTTGGTTCCTACTTCAGGGCCATGGCTTGAAGTGTTCGCGACACTTTTATTGACGCTGAC	

TFA	ATAAGTTGTTGGTGGAGTCCAT-CAGTGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCTCTCCAC	480
TRU	ATAAGTTGTTGGTGGAGTTCAT-CAGTGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCTCTCCAC	
TEX	ATAAGTTGTTGGTGGAGTTCAT-AAGTGTGATGATTCCACATGCCGAGCGTTCTCTCCAC	
TPA	ATAAGTTGTTGGTGGAGTTCAT-TAGTGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCTCTCCAC	
TSN	ATAAGTTGTTGGTGGAGTTCAT-CAGTGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCTCTCCAC	
TST	ATAAGTTGTTGGTGGAGTTCAT-CAGTGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCTCTCCAC	
TPO	ATAAGTTGTTGGTGGAGTTCAT-AAGTGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCTCTCCAC	
TBI	ATAAGTTGTTGGTGGAGTCCATATGGCGAGATAATCCACATGCCGAGCGTTCACTCCAC	
TFL	ATAAGTTATTGGTGGAGTCCATATGGCGAGATAATCCACATGCCGAGCGTCACTCCAC	

TFA	AGGGGTCAGGTTATTTTTT-TCTCTTTCTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGCGTC	540
TRU	AGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTCTTTCTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGCGTC	
TEX	AGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTCTTTCTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGCGTC	
TPA	AGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTCTTTCTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGCGTC	
TSN	AGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTCTTTCTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGCGTC	
TST	AGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTCTTTCTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGCGTC	
TPO	GGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTCTTTCTTTCAATTGACATTTTCAGAGTGCAGCGCGTC	
TBI	GGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTTTCTTTCAATTGACATATCAGAGTGCAGCGCGTC	
TFL	GGGGGTCAGGTTATTTTTTCTCTTTCTTTCAATTGACATATCAGAGTGCAGCGCGTC	

TFA	AACGGTTCATCAAGGTTGAACATTTTT-CITGGTTTATGGTAATGTTAGTTAATGAATTG	600
TRU	AATGGTTCATCAAGGTTGAACATTTTTCTTGGTTTATGGTAATGTTAATTAATGAATTA	
TEX	AACGGTCCATAAAGGTTGAACATTTTTCTTGGTTTATGGTAATGTTAATTAATGAATTA	
TPA	AATGGTTTATCAAGGTTGAACATTTTTCTTG-TTTGTGACAATGTTAGTTAATGAATTA	
TSN	AACGGTTAATCAAGGTTGAACATTTTTCTTGGTTTATGGTAATGTTAGTTAATGAATTA	
TST	AACGGTTAATCAAGGTTGAACATTTTTCTTGGTTTATGGTAATGTTAGTTAATGAATTA	
TPO	AACGGTTAATCAAGGTTGAACATTTTTCTTGGTTTATGGTAATGTTAGTTAATGAATTA	
TBI	GATG-TAAGTCAAGGTTGAACATTTCTTGTA-TGGGTGT-AGTCCTG-TAATGAATCA	
TFL	GATG-TGAATCAAGGTTGAACATTTCTTGTA-TACGTCTTAGTGCTG-TAATGAATTA	
	-----CSB1-----	
TFA	AGATATCATATAAGAATTACATTATTG-ATATCAAGGACATAAATAAATACGATTCAA	660
TRU	AGACATTATTTAAGAATTACATTACTG-ATATCAAGGACATAAATAAATACGATTCAA	
TEX	AGACATTACACAAGAATTACATTACTG-ATATCAAGGACATAAATAAATACGATTCAA	
TPA	AGACATTATACAAGAATTACATTATTG-ATATCAAGGACATAAATAAATACAAATTCAA	
TSN	AGACATCATATAAGAATTACATTACTG-ATATCAAGGACATAAGTAATAATACGATTAAA	
TST	AGACATCATATAAGAATTACATTANTG-ATATCAAGGACATAAGTAATAATACGATTAAA	
TPO	AGACATCATATAAGAATTACATTACTG-ATATCAAGGACATAAGTAATAATACGATTAAA	
TBI	AGACTCTAC-TGGAAACTGCATAGCAATATATCATGAGCATAAACCGTTATCGCTTTCC	
TFL	GGATTTTAC-TGGAAACTGCATAGCGGTATATCAAGAGCATAAACTCTACTGCCACCCCT	
	-----CSB2-----	
TFA	CAAT-CATACAATTTACCCCTTCTTCTTTTTTAAAGAT-TTAACGTATACCCGCCCTA	720
TRU	CAAT-CATACAATTTACCCCTTCTTCTTTTTTAAAAA-TTAACGTATACCCGCCCTA	
TEX	CAAT-CATACAATTTACCCCTTCTTCTTTTTTAAAAAATTAACGTATACCCGCCCTA	
TPA	CAAT-CATACAATTTACCCCTTCTTCTTTTTTAAAAA-TTAACGTATACCCGCCCTA	
TSN	CAAT-CATACAATTTACCCCTTCTTCTTTTTTAAAAA-TTAACGTATACCCGCCCTA	
TST	CAAT-CATACAATTTACCCCTTCTTCTTTTTTAAAAA-TTAACGTATACCCGCCCTA	
TPO	CAAT-CATACAATTTACCCCTTCTTCTTTTTTAAAAA-TTAACGTATACCCGCCCTA	
TBI	CTATATCTAAGATCGCCCGCGTGACGGT-----AAA-----TTGCGGTTAAACCCGCCCTA	
TFL	CAACGTATCTAAGATCACCCCGGGTGACGGT-----AAA-----TTGCGGTTAAACCCGCCCTA	



图4 鮠科9种鱼线粒体DNA控制区序列比较

鮠科9种鱼:暗纹东方_鮠 (TFA)、红鳍东方_鮠 (TRU)、褐纹东方_鮠 (TEX)、豹纹东方_鮠 (TPA)、施氏东方_鮠 (TSN)、密点东方_鮠 (TST)、紫色东方_鮠 (TPO)、八字河_鮠 (TBI)、黄金河_鮠 (TEL)。

终止序列区(TAS)、中央保守区(CSB-F、CSB-E、CSB-D)和保守序列区(CSB1、CSB2、CSB3)用阴影标注;TACAT基序和其ATG-TA反向互补序列用下划线标注。

Fig. 4 Sequences and structure of mtDNA control region of *T. fasciatus*(TFA), *T. rubripes*(TRU), *T. exascurus*(TEX), *T. pardalis*(TPA), *T. snyderi*(TSN), *T. stictonotus*(TST), *T. porphyreus*(TPO), *Tetraodon biocellatull*(TBI), *Tetraodon fluviatilis*(TFL)

The termination associated sequence(TAS), central conserved sequence blocks(CSB-F, CSB-E, CSB-D) and conserved sequence blocks(CSB1, CSB2, CSB3) were indicated by shadows. The motifs (TACAT) and its palindromic motif (ATGTA) were underlined.

2.3 暗纹东方_鮠线粒体DNA控制区的结构

对比其他鱼类的mtDNA控制区结构^[8-9, 11, 25-28],初步识别了暗纹东方_鮠控制区的结构(图3、图4)。终止序列区为1处,有1个与终止相关的序列被发现,序列为TACAT基序和其反向互补序列ATGTA一起出现,可形成稳定的发卡结构。在暗纹东方_鮠未发现串联重复序列。中央保守区可识别CSB-F(关键序列为ATGTAGTA-AGAACCGACCAT),CSB-E(关键序列为AGG-GACAAT-AACAGTGGGGG)和CSB-D(关键序列为TATTCCTGGCATTGTTTCCT)。CSB-E的关键序列中含有Lee等^[29]所描述的GTGGG-box。保守序列区存在3个保守序列,分别为:CSB1(AT-TATTGA-TATCAAGGACATAA),CSB2(TAT-ACCCCCCTACCCCCCT),CSB3(CAAGCCCTC-CACTTAATT-AAA)。通过比较发现,暗纹东方_鮠与已报道的一些鱼类CSB1 3'端都含有特征基序GACATA,此特征基序上游富含A和T,A+T含量约为80%。CSB2含有以TA间隔的两段串联的C。CSB3富含A和C,但不如同科的八字河_鮠、黄金河_鮠等易识别A和C以3~5个的串联形式存在

的典型特征。同时,从鮠科的9种鱼控制区序列上的主要功能单元比较结果可以看出,在鮠科鱼类中,除了CSB-E有个别碱基存在差异外,识别出的CSB-F、和CSB-D相当保守。在鮠科鱼类中,CSB1和CSB2序列比较保守,CSB3在同属的暗纹东方_鮠和红鳍东方_鮠仅有1个碱基的差异,而在鮠科鱼类中所比较的2个属间存在较大差异。

2.3 以D-loop序列为基础的系统进化树的构建

应用MEGA软件,选取东方_鮠属的7种鱼类的控制区同源性较高的序列(570~582 bp),包括暗纹东方_鮠、红鳍东方_鮠、褐纹东方_鮠、豹纹东方_鮠、紫色东方_鮠、施氏东方_鮠、密点东方_鮠等,尝试构建聚类分析图(NJ树)和以同科河_鮠属的八字河_鮠为外类群的分子系统树(MP树),见图5。构建的NJ树和MP树在拓扑结构上完全一致,各枝的支持率较高。从NJ树可以看出,施氏东方_鮠、密点东方_鮠、紫色东方_鮠聚在一起,支持率为96,然后与暗纹东方_鮠聚在一起形成一组,支持率为94。而褐纹东方_鮠和豹纹东方_鮠聚在一起,支持率为84,然后与红鳍东方_鮠聚在一起形成一组,支持率为85。

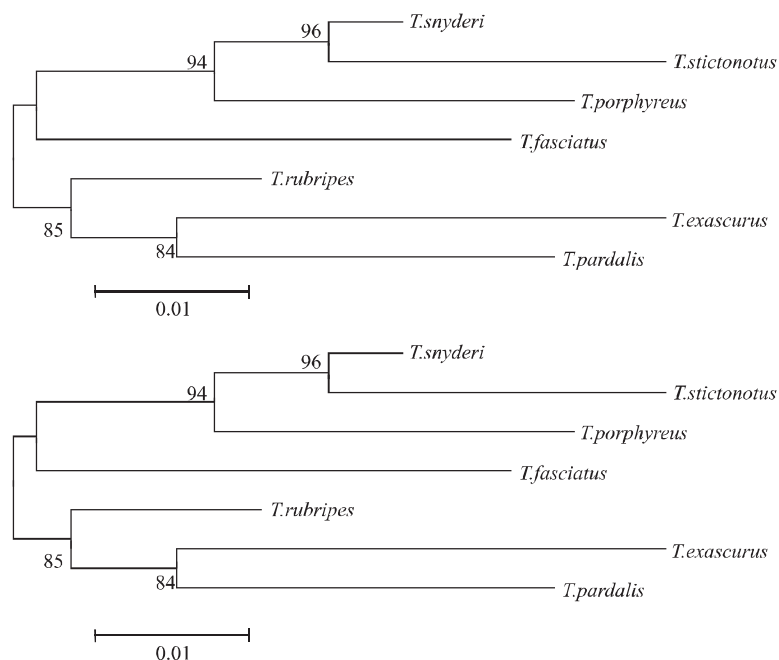


图 5 根据暗纹东方鲀等东方鲀属鱼类 D-loop 序列构建的分子系统树

Fig. 5 Phylogenetic trees derived from *T. fasciatus* and the other kinds of fish's D-loop nucleotide sequences

3 讨论

暗纹东方鲀线粒体 DNA 控制区的长度为 818 bp, 与其他鲀形目鱼类的相似, 因此没有大的缺失、插入及串联重复等变化。碱基含量也与其他种类鱼类的相近。与研究的编码基因 *Cyt b*、*CO I*、*CO II*、*CO III* 等序列的 (A+T)% 相比较, 暗纹东方鲀线粒体 DNA 控制区的 (A+T)% 略高达到 67.9%, 线粒体 DNA 的平均值为 60.8%。这与一些关于鱼类控制区对 A 和 T 偏爱超过 C 的研究结果相一致^[30]。G 的含量显著低于其他碱基的含量, 即在其他脊椎动物中发现的典型反 G 偏倚, 这也是线粒体 DNA 的一个特点^[31]。分析碱基替换状况时发现, 同属间皆为转换高于颠换约 2 倍, 而同目不同属及不同目之间碱基替换状况是颠换高于转换近 1 倍。

线粒体 DNA 控制区的主要功能与线粒体 DNA 的复制、终止、转录相关。通过与其他鱼类的比对可以看出, 暗纹东方鲀线粒体 DNA 控制区的基本结构与以前研究显示的其他生物控制区的基本结构基本一致, 较容易识别主要的功能单元, 例如终止相关的序列 (TAS) 以及中央保守区序列 (CSB-F, CSB-E, CSB-D) 和保守区序列 (CSB1, CSB2, CSB3) 等。暗纹东方鲀线粒体 DNA 控制区含有一个核心

序列 (TAS) 和互补的基序, 可形成茎环结构, 并有反式作用因子与 TAS 结合, 是 H-链复制延伸时的终止识别位点。在整个控制区 DNA 中, 中央保守区是最为保守的区域, 中央保守区可识别 CSB-F、CSB-E、CSB-D 关键序列。CSB-F 在 9 种鲀科鱼类中十分保守, 其位置相当于哺乳动物中的 CSB-F, 但序列不相似, 这些序列与刘焕章等^[13]提出的鲳鲷鱼类的 ECSB-F 序列很相似。CSB-F 分开终止结合序列区和中央保守区; 其后的是 CSB-E, 在 9 种鲀科鱼类中 CSB-E 也是比较保守的序列。CSB-E 的关键序列中含有 Lee 等^[29]所描述的 GTGGG-box; 在 CSB-E 之后的是 CSB-D。保守序列区存在 3 个保守序列, 分别为: CSB1、CSB2、CSB3。在脊椎动物中, 这 3 段序列以 CSB1 最为保守, 几乎所有脊椎动物都含有 CSB1。通过比较笔者发现, 暗纹东方鲀与已报道的一些鱼类 CSB1 3' 端都含有特征基序 GACATA, 此特征基序上游富含 A 和 T; CSB2 含有以 1~3 个嘧啶核苷酸间隔的两段串联的 C; CSB3 富含 A 和 C。这些单元行使重要的功能, 尽管受强烈的自然选择压力, 仍然十分保守。在进行鱼类线粒体 DNA 控制区研究时, 这些单元有着重要的参考价值^[2-3, 10, 12, 32-33]。脊椎动物线粒体 DNA 控制区的启动子一般位于控制区的 3' 端。一些研究发现了

鲤鱼、草鱼^[6]等鱼类的6—9nt线粒体单向启动子(ATATAAGTA/GCATTATA),发现了爪蟾^[34]的线粒体双向启动子(ACP₀TTATA)。笔者分析暗纹东方魮线粒体DNA控制区L-链3'端的核苷酸序列时发现CATATATTATAA重复片段,但尚不能确定暗纹东方魮线粒体启动子的确切组成和方向性,将在日后的实验中寻求证明。

资料表明^[14,17],暗纹东方魮分布于中国沿海并可进入河口或定居淡水,红鳍东方魮主要分布于日本沿岸,紫色东方魮与豹纹东方魮地理分布偏北,可达日本海一带。中国东方魮属已报道的有22个种。成庆泰等^[14]依据东方魮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种的种间关系,将东方魮属的15个种分为两大支,暗纹东方魮和红鳍东方魮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,而紫色东方魮与豹纹东方魮是同处于另一大支的两个小支。控制区基因进化速度被认为是线粒体基因中最快的。快进化的位点可以提供更多的信息位点,控制区比较适合用来进行系统发育分析^[2-3,12,27-28]。利用9种魮科鱼类的控制区序列构建的NJ树和MP树各节点的支持率都比较高,但获得的结果与传统分类方法所得的结果不相吻合。对许多鱼类mtDNA的研究表明,Cyt b、COI基因可适于属内不同种间的系统发育分析,而线粒体进化最快的区段控制区序列可能更适合种内不同地理型和生态型、遗传多样性的研究。这与其他有关鱼类线粒体控制区序列的研究报道较为一致^[10,12,27-28,31]。东方魮属种内不同亚种或不同地理型之间的物种鉴定将成为今后进一步探讨的内容。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体研究新进展[J]. 遗传学报,2004,31(9):983—1000.
- [3] Cuore J P, Thams D K. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes[J]. Trend Ecol Evol, 1999, 14(10):394—398.
- [4] Saccone C, Attimonelli M, Sbisà E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop region in vertebrate mitochondrial DNA[J]. J Mol Evol, 1987, 26(3):205—211.
- [5] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications[J]. Gene, 1997, 205(12):125—140.
- [6] 张方,米志勇,毛钟荣,等. 草鱼线粒体DNA控制区序列及其两侧tRNA基因的克隆与结构分析[J]. 中国生物化学与分子生物学, 1999, 15(3):417—422.
- [7] 曾青兰,刘焕章. 大口胭脂鱼的线粒体DNA控制区序列的研究[J]. 湖北大学学报:自然科学版, 2001, 23(3):261—264.
- [8] Chen Yi-yu, He Shun-ping, Wang Wei. Mitochondrial d-loop sequence variation and phylogeny of gobiobotine fishes[J]. Progress Nat Sci, 2002, 12(11):866—868.
- [9] Grunwald C, Stabile J, Waldman J R, et al. Population genetics of hortonose sturgeon *Acipenser brevirostrum* based on mitochondrial DNA control region sequences[J]. Mol Ecol, 2002, 11(10):1885—1898.
- [10] 张燕,张翥,何舜平. 中国魮科鱼类线粒体DNA控制区结构及其系统发育分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27(5):463—467.
- [11] 胡文革,段子渊,王金富,等. 新疆3种雅罗鱼线粒体DNA控制区序列的差异和系统进化关系[J]. 遗传学报, 2004, 31(9):970—975.
- [12] 谢振宇,杜继曾,陈学群,等. 线粒体控制区在鱼类种内遗传分化中的意义[J]. 遗传, 2006, 28(3):362—368.
- [13] 刘焕章. 鱼类线粒体DNA控制区的结构与进化:以鳊鱼类为例[J]. 自然科学进展, 2002, 12(3):266—270.
- [14] 成庆泰,王存信,田明诚,等. 中国东方魮属鱼类分类研究[J]. 动物学报, 1975, 21(4):359—378.
- [15] 孟庆闻,苏锦祥,缪学祖. 鱼类分类学[M]. 北京:中国农业出版社, 1995.
- [16] 周巍,杨焕明,刘国仰. 河魮鱼与人类基因组计划[J]. 遗传, 1997, 19(6):37—40.
- [17] 王奎旗,陈梅,高天翔. 东方魮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.
- [18] 邵爱华,朱江,陈葵,等. 暗纹东方魮线粒体细胞色素b及其侧翼tRNA基因的克隆与序列分析[J]. 中国水产科学, 2005, 12(6):675—681.
- [19] 邵爱华,朱江,陈葵,等. 暗纹东方魮线粒体COII及两侧tRNA基因的克隆和序列分析[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6):1—8.
- [20] 邵爱华,朱江,陈葵,等. 暗纹东方魮线粒体COI及其侧翼tRNA基因的克隆与序列分析[J]. 遗传, 2006, 28(9):963—971.
- [21] 吴乃虎,王钢锋,阎景智,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.
- [22] 邵爱华,郑峰,吴胜,等. 暗纹东方魮mtDNA的分离纯化及其细胞色素b基因的分子克隆[J]. 水产科学, 2005, 24(5):4—7.
- [23] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual. (3rd ed)[M]. New York: Cold Spring Harbor—Laboratory Press, 2001:26—118, 611—627.
- [24] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. Brief Bioinform, 2004, 5:150—163.

- [25] Zardoya R, Garrido-Pertierra, Bautista J M. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA genome of the rainbow trout[J]. J Mol Evol, 1995, 41 (6): 942—951.
- [26] 张四明, 吴清江, 张亚平. 中华鲟及相关种类的 mtDNA 控制区串联重复序列及其进化意义[J]. 中国生物化学与分子生物学, 2000, 16 (4): 458—461.
- [27] Zhao J L, Wang W W, Li S F, et al. Structural of the mitochondrial DNA control regions of the Siniperca fishes and their phylogentic relationship[J]. Acta Genetica Sinica, 2006, 33(9): 793—799.
- [28] 郑冰蓉, 张亚平, 肖衡, 等. 鲤属鱼类 mtDNA 控制区序列的变异性分析[J]. 水产学报, 2002, 26 (4): 289—294.
- [29] Lee W J, Conroy J, Howell W H. Structural and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. J Mol Evol, 1995, 41 (1): 54—66.
- [30] Liu H Z, Tzeng C S, Teng H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control regions and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes[J]. Can J Zool, 2002, 80: 569—581.
- [31] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: Structural and evolution[M]//Mitochondrial Genomes. San Diego: Academic Press, 2006: 173—372.
- [32] 孙玉华, 王伟, 刘思阳, 等. 中国胭脂鱼线粒体控制区遗传多样性分析[J]. 遗传学报, 2002, 29(9): 787—790.
- [33] Guo X H, Liu S I, Liu Y. Comparative analysis of the mitochondrial DNA control regions in cyprinids with different ploidy level[J]. Aquaculture, 2003, 224(1—4): 25—38.
- [34] Begenhagen D F, Yoza B K. Accurate in vitro transcription of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA from two bi-directional promoters[J]. Mol Cell Biol, 1986, 6: 2 543—2 550.

Characterization and phylogenetic analysis of control region of mitochondrial genome from *Takifugu fasciatus*

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

(1. School of Life Sciences, Soochow 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 their liver tissue. The *T. fasciatus* control region (D-loop) and its connected tRNA^{Pro} genes were amplified by PCR amplification with a pair of specific primers which was designed based on *T. rubripes* from GenBank. A sequence with the complete nucleotide control region and tRNA^{Pro} gene from *T. fasciatus* mitochondrial was cloned and directly sequenced. The control region of *T. fasciatus* was proved to have good homology with other 6 species of *Takifugu* fish recorded in the GenBank and it has 94.03% homology with *T. rubripes*, about 92%—94% with other species. The length of this region (D-loop) contains 818 bp nucleotides and the T, C, A and G contents are 32.2%, 19.1%, 35.6% and 13.2% respectively. The mtDNA control region of *T. fasciatus* could be portioned into three domains, namely, the termination associated sequence domain, the central conserved sequence domain and the conserved sequence block domain; the extended termination associated sequence (ETAS), three conserved blocks (CSB-F, CSB-E, CSB-D) in the central conserved sequence block domain and three conserved sequence blocks (CSB1, CSB2, CSB3) in the conserved sequence block domain were successfully identified according to their homology to those of other fish. CSB1 and CSB2 are conservative to the same regions of other kinds of fish. TAS and its palindromic motifs can form stable hairpin-loop structure acting as a recognition site for the termination of H-strand elongation. The phylogenetic trees were constructed with MEGA3.0 through neighbor-joining method and maximum parsimony method based on the nucleotide sequences from *Takifugu* fish using *Tetraodon bio-cellatus* as outgroup. And the results are compared with each other based on the topology and the bootstrap value. It can be concluded that control region can be used for the phylogenetic analysis of the relationships among *Takifugu* fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 352—360]

Key words: *Takifugu fasciatus*; mtDNA control region; structure; phylogenetic relationships

Corresponding author: ZHU Jiang. E-mail: zjiang@suda.edu.com