

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00782

海参 DNA 条形码的构建及应用

律迎春, 左涛, 唐庆娟, 段高飞, 王春霞, 李晋, 徐洁, 薛长湖

中国海洋大学 食品科学与工程学院, 山东 青岛 266003

摘要: 为研究线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (Mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 基因作为 DNA 条形码鉴定海参品种的可行性, 本实验采集了 7 种海参(Holothuroidea)43 个个体并获得其线粒体 CO I 基因序列, 利用 DNASTar、DNAMAN 和 MEGA 4.1 软件分析计算了 7 种海参的碱基组成以及不同海参之间的种间遗传距离和种内遗传距离, 利用邻接法和最大简约法分别构建了分子系统树。结果表明, 海参的种间遗传距离显著大于种内遗传距离, 不同海参在系统树中分别形成各自独立的分支, 表明以 CO I 作为海参 DNA 条形码进行品种鉴定具有一定的可行性。在建立海参 DNA 条形码的基础上, 设计了针对仿刺参(*Apostichopus japonicas*)的特异性探针。对 4 种海参(仿刺参 *Apostichopus japonicas*、冰岛参 *Cucumaria frondosa*、加州拟刺参 *Parastichopus californicus* 及梅花参 *Thelenota ananas*)进行斑点杂交实验, 结果显示, 该探针具有较好的特异性和较高的灵敏度, 能够实现对仿刺参的鉴定。本研究为后续开展斑点杂交及基因芯片法鉴定海参种类的研究奠定了理论基础。

关键词: 海参; 线粒体 CO I 基因; DNA 条形码; 种类鉴定; 斑点杂交

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2011)04-0782-08

海参为棘皮动物门(Echinodermata)海参纲(Holothuroidea)动物的总称。全球有海参约 900 多种, 中国有 140 多种。近年来, 随着国内外对海参生物活性物质的分离、鉴定及其生物作用等研究的不断深入, 人们发现海参含有许多具有重要生物学活性的物质^[1-3]。不同海参种类的营养成分、生理活性等存在差异, 价格参差不齐。如何准确快速的鉴定海参种类, 是急需解决的问题。

传统的海参鉴别方法主要依据海参的外部形态和解剖特征^[4]。外部特征包括触手的形状、疣足和管足的有无、形状及其分布特征等; 解剖特征主要指海参骨片的形态和呼吸树的有无, 通过骨片鉴定是海参分类及鉴别的重要依据。廖玉麟^[2]、文菁等^[5]、李赞等^[6]对海参骨片进行了形态研究, 并以此区分和鉴定多种海参。但是, 采用常规形

态学方法鉴定海参有以下几个缺陷^[7]: (1)外部形态特征容易受到生长环境的影响, 从而导致鉴定结果不准确; (2)形态学方法无法鉴定普遍存在的隐存分类单元; (3)容易受生物性别和发育阶段的限制; (4)骨片鉴定需要专业人员和繁重的工作量。

DNA 条形码技术(DNA barcoding)是通过对一个标准目的基因的 DNA 序列进行分析从而进行物种鉴定的技术。由于操作过程快速简便, DNA 条形码得到广泛的应用, 尤其是在保护生物学和生物多样性调查等领域^[8]。2003 年, Herbert^[9]最早研究发现, 利用线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, CO I) 基因一段长为 648 bp 的片段, 能够成功地地区分物种, 并且认为利用 CO I 基因将提供一种快速、简便而且可信的分类方法。为了研究

收稿日期: 2010-11-05; 修订日期: 2011-01-04.

基金项目: 海洋公益性行业科研专项(201105029); 国际科技合作项目(2010DFA31330); “泰山学者”建设工程专项经费资助项目(JS200510013); 浙江省重大科技专项(2008C2009).

作者简介: 律迎春(1988-), 男, 硕士研究生, 研究方向为水产品质量监督与控制. E-mail: oasis0212@163.com

通信作者: 唐庆娟(1971-), 讲师. E-mail: tangqingjuan@ouc.edu.cn

CO I 基因在动物界中鉴别物种的可行性, Hebert 等^[9]对 11 个门 13 320 个物种的 *CO I* 基因序列进行分析, 发现其序列间的差异能够很好的区分所有研究物种, 认为在动物界中 *CO I* 基因是合适的 DNA 条形码标准基因。目前已有采用线粒体 *CO I* 基因绘制系统进化树, 分析海参系统发育的研究, 采用海参线粒体 *CO I* 基因作为 DNA 条形码进行海参品种鉴定的研究还未见报道。

为了研究 *CO I* 基因作为海参 DNA 条形码的可行性, 本研究选取了刺参科(*Stichopodidae*)的仿刺参(*Apostichopus japonicus*)、梅花参(*Thelenota ananas*)、加州拟刺参(*Parastichopus californicus*)、海参科(*Holothuriidae*)的红腹海参(*Holothuria edulis*)、黑海参(*Holothuria atra*)、芋参科(*Molpadiidae*)的海地瓜(*Acaudina molpadioide*)以及瓜参科(*Cucumariidae*)的冰岛参(*Cucumaria frondosa*), 共 7 种海参的 43 个个体, 对其线粒体 *CO I* 基因的序列进行比对分析, 通过计算海参 *CO I* 基因的种间及种内遗传距离, 构建系统树, 验证 *CO I* 基因作为海参 DNA 条形码进行品种鉴定的可行性和有效性。在构建的海参 DNA 条形码基础上, 设计了可以用于仿刺参鉴定的探针, 利用斑点杂交方法鉴定了仿刺参, 对 DNA 条形码用于海参种类鉴定进行了初步探索。本研究最终目的是建立海参 DNA 条形码, 为海参品种鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用干海参来源见表 1。海胆作为外群。

1.2 海参 DNA 的提取

干海参用无菌水 50 泡发 5 ~ 8 h, 取 100 mg 肌肉柱冲洗干净, 用滤纸吸干, 切碎。加入 400 μ L 裂解液(50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 1.5% CTAB; 1 mol/L NaCl; 15 mmol/L EDTA)和 12 μ L 20 mg/mL 蛋白酶 K, 置于 55 水浴 5 ~ 8 h 至样品溶解。加入 600 μ L 氯仿, 震荡混合 3 min, 静置 7 min, 12 000 g 离心 2 min。取上清, 加入 500 μ L 氯仿, 颠倒混合 2 min, 12 000 g 离心 2 min。取上清, 加入 500 μ L 沉淀液(1% CTAB; 50 mmol/L Tris-HCl pH 7.5; 10 mmol/L EDTA)混匀, 静置 2 min, 65 水浴 20 min。12 000 g 离心 10 ~ 20 min, 弃上清, 留沉淀。加入 200 μ L 1.2 mol/L NaCl, 轻轻混匀至 DNA 完全溶解, 再加入 6 μ L RNase, 置于 37 下 30 ~ 60 min。加入 1 mL 冰乙醇和 100 μ L 3 mol/L NaAc, -20 下静置 10 min, 15 000 g 离心 10 min, 所得沉淀即为 DNA。弃除上清, 再加入 1 mL 70% 冰乙醇清洗, 12 000 g 离心 5 min。将 DNA 沉淀于无菌空气中晾干, 加入 20 μ L 无菌水溶解, 4 备用。

1.3 海参线粒体 *CO I* 基因的扩增

采用 PCR 技术对线粒体 *CO I* 基因序列片段进行扩增, 引物序列为^[4]:

COIef: 5'-ATAATGATAGGAGGRTTTGG-3'
COIer: 5'-GCTCGTGTRTCTACRTCCAT-3'

PCR 反应总体积为 50 μ L, 包含 25 mmol/L $MgCl_2$ 3 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 2 种引物各 1 μ L(终浓度 0.2 μ mol/L), *Taq* DNA 聚合酶(宝生物工程有限公司, 5 U/ μ L)1 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L 以及模板 DNA 1 μ L, 加水补足至 50 μ L。在 PCR 扩增仪(eppendorf 公司)上经 94 预变性 5 min 后

表 1 海参采样信息
Tab.1 Sampling information of the sea cucumber species analyzed in the present study

中文名称 Chinese name	拉丁种名 Latin species	采样地点 sampling location	样本数 sampling numbers	样品代码 ID of samples
仿刺参	<i>Apostichopus japonicus</i>	中国及日本海域(sea areas of China and Japan)	10	A.jap
冰岛参	<i>Cucumaria frondosa</i>	北大西洋冰岛(The north Atlantic Iceland)	8	C.fro
梅花参	<i>Thelenota ananas</i>	中国西沙群岛(Xisha Islands of South China)	5	T.nas
加州拟刺参	<i>Parastichopus californicus</i>	美国阿拉斯加(Alaska of America)	7	P.cal
黑海参	<i>Holothuria atra</i>	中国西沙群岛(Xisha Islands of South China)	5	H.atr
红腹海参	<i>Holothuria edulis</i>	中国西沙群岛(Xisha Islands of South China)	5	H.edu
海地瓜	<i>Acaudina molpadioide</i>	中国西沙群岛(Xisha Islands of South China)	3	A.mol
中间球海胆	<i>Strongylocentrotus intermedius</i>	GenBank	1	S.int

经过 30 个循环, 每个循环包括: 94 50 s, 46 1 min, 72 1 min, 最后 72 延伸 10 min。PCR 产物行 1%的琼脂糖凝胶电泳, 紫外光(300 nm)下观察并照相记录。

1.4 测序及数据处理

PCR 产物送上海生工生物工程有限公司测序, 并对测序结果进行人工核对、校正。结果用 DNAMAN、DNASTAR 和 MEGA 4.1 软件进行序列比对分析, 计算各种海参碱基组成, 序列种间和种内的遗传距离, 并分别采用邻接法(NJ 法)和最大简约法(MP 法)绘制系统进化树。

1.5 斑点杂交鉴定仿刺参

1.5.1 探针的设计 采用 DNASTAR 软件的 Primerselect 功能设计探针, 筛选具有特异性的探针, 5'端生物素标记。由上海生工生物工程有限公司合成。探针序列为:

DL-01: 5'-Biotin-GGGCCGGAACAGGATGAACAAT

DL-02: 5'-Biotin-TAGGATTCTTGTGGGCCCACC

1.5.2 斑点杂交 在硝酸纤维素膜上划分 1cm² 的小格, UV 照射 30 min 后浸泡于 2×SSC 中 10 min, 晾干; PCR 产物于 95 热处理 10 min 后冰浴冷却, 每个样品取 3 μL 点于小格中央, 晾干后 80 烘箱处理 45 min。

50 预杂交 1h(杂交液: 50%甲酰胺, 0.5% BSA, 1%SDS, 0.5% polyvinylpyrrolidone in 5×SSC)。寡核苷酸探针 95 热处理 10 min 后迅

速冰浴冷却; 然后将 100 ng 的探针加入 10 mL 新鲜的杂交液。55 下杂交 2 h。反应结束后分别用 2×SSC-0.1%SDS 和 0.5×SSC-0.1%SDS 洗膜 2 次, 每次 15 min, 最后用 PBS 洗膜 1 次, 并将膜转至封阻液(3% BSA)中, 37 下处理 1h。然后将膜转入含 1mg/mL streptavidin-AP(VECTOR, USA)的 PBS 溶液中 37 处理 1h 后, 用 PBS 反复冲洗, 自然晾干。

将膜转入装有显色液(BCIP/NBT 磷酸盐溶液)的杂交袋中, 37 避光显色。取出膜用蒸馏水反复冲洗, 洗去多余的显色液, 晾干记录实验结果。

2 结果与分析

2.1 海参 CO I 基因序列特征及其变异

通过 PCR 扩增和测序, 得到了海参 7 个品种的 43 个个体的线粒体 CO 基因部分序列。本研究获得的序列是 CO 基因 5'端的一段长为 692 bp 的片段。采用 MEGA 4.1 软件分析碱基组成(表 2), A、T、G、C 碱基平均含量分别为 27.9%、28.9%、18.3%、24.9%, 其中 A+T 含量(56.8%)明显高于 G+C 含量(43.2%)。7 种海参中, 红腹海参 G+C 含量最高, 达到 45.1%。

表 3 显示了不同种类海参间的遗传距离以及同种海参不同个体之间的平均遗传距离。在本研究的 7 个海参品种中, 冰岛参的种内遗传距离最大, 为 0.01; 海地瓜和梅花参种内遗传距离最小,

表 2 7 种海参 CO I 序列碱基组成
Tab.2 Base content of CO gene for seven sea cucumber species %

种类 species	T	C	A	G	G+C
梅花参 <i>Thelenota ananas</i>	26.4	26.4	29.0	18.2	44.6
海地瓜 <i>Acaudina molpadioide</i>	29.8	23.0	30.2	17.0	40.0
冰岛参 <i>Cucumaria frondosa</i>	26.7	26.6	28.4	18.2	44.8
黑海参 <i>Holothuria atra</i>	26.1	25.4	30.3	18.2	43.6
红腹海参 <i>Holothuria edulis</i>	26.2	27.1	28.6	18.1	45.1
加州拟刺参 <i>Parastichopus californicus</i>	31.3	24.1	26.7	17.9	42.0
仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	31.5	22.5	27.1	18.9	41.4
中间球海胆 <i>Strongylocentrotus intermedius</i>	33.4	24.2	22.7	19.8	44.0
平均 average	28.9	24.9	27.9	18.3	43.2

表 3 7 种海参种内遗传距离和两两比对的种间遗传距离
Tab.3 Genetic distance within each species and pairwise distance between species in seven sea cucumber species

	1 仿刺参 <i>Apostichopus japonicus</i>	2 海地瓜 <i>Acaudina molpadioide</i>	3 冰岛参 <i>Cucumaria frondosa</i>	4 黑海参 <i>Holothuria atra</i>	5 红腹海参 <i>Holothuria edulis</i>	6 加州拟刺参 <i>Parastichopus californicus</i>	7 梅花参 <i>Thelenota ananas</i>	种内遗传距离 genetic distance within species
1								0.009
2	0.21							0.002
3	0.272	0.265						0.01
4	0.243	0.214	0.228					0.009
5	0.248	0.223	0.215	0.152				0.009
6	0.101	0.212	0.268	0.23	0.243			0.007
7	0.205	0.219	0.208	0.174	0.166	0.214		0.002
S.int	0.298	0.292	0.292	0.28	0.289	0.278	0.284	—

为 0.002, 种内遗传距离平均为 0.007。7 种海参两两比对, 最小的种间遗传距离是仿刺参和加州拟刺参(0.101), 最大的种间遗传距离是仿刺参和冰岛参(0.272)。种间遗传距离平均为 0.215, 大于种内差异的 10 倍以上, 符合 Hebert 等^[10]推荐的 10 倍种内变异作为标记物种遗传分化的“标准序列阈值”。较小的种内差异(平均 0.007)和较大的种间差异(平均 0.215), 表明以海参线粒体 CO 基因作为品种鉴定的 DNA 条形码具备可行性和有效性。

2.2 分子系统发育树

利用本研究获得的 7 种海参 43 个个体的 CO 序列, 以海胆作为外群, 构建海参的分子系统发育树。分别采用邻接法和最大简约法构建 NJ 树和 MP 树。NJ 树进行 1 000 次自展检验, 采用 P-distance 方法计算。NJ(图 1)树中, 同种海参的多个个体各自形成单系, 并且节点支持率均为 100%。同为海参科的黑海参、红腹海参互为姐妹群, 支持率为 96%。同为刺参科的仿刺参和加州拟刺参为姐妹群, 支持率为 100%。MP 树(图 2)与 NJ 树有相似的拓扑结构, 每种海参各自形成单系, 并且有很高的节点支持率。

2.3 斑点杂交鉴定仿刺参

2.3.1 斑点杂交探针特异性 以提取的仿刺参、梅花参、冰岛参和加州拟刺参的 DNA 为模版, PCR 扩增得到产物(图 3)。经紫外分光光度计检测, 确定浓度, 调整到 100 ng/3 μL, 分别取 3 μL 点样

于硝酸纤维素膜上, 与生物素标记的探针进行杂交(图 4)。结果显示, 只有点样仿刺参位置出现明显的斑点, 其他各点均没有斑点, 表明此探针具有高度的种属特异性, 只能与仿刺参的 PCR 产物杂交, 不和其他海参 PCR 产物杂交。

2.3.2 斑点杂交灵敏度 将提取的仿刺参 DNA 经 PCR 扩增后, 产物经紫外分光光度计测定浓度, 并调整到 10 ng/3μL, 倍比稀释后分别取 3 μL 点样于硝酸纤维膜上, 与生物素标记的探针杂交(图 5)。结果表明, 稀释 100 倍后仍有明显的斑点, 提示斑点杂交的灵敏度达到 100 pg。

3 讨论

Hebert 等提出利用 CO I 基因建立动物 DNA 条形码以来, 各国学者进行了广泛的研究。Hebert 等^[9]对 11 个门 13 320 个物种的 CO I 基因序列进行分析, 发现其序列间的差异能够很好的区分所有研究物种, 并认为在动物界中 CO I 基因是合适的 DNA 条形码标准基因。Vences 等^[11]探讨了 DNA 条形码对两栖爬行类物种的鉴定能力, 显示选用的 CO I 基因能够准确的辨别各物种。Janzen 等^[12]在对北美哥斯达黎加地区 1 000 多种鳞翅目昆虫生物多样性的调查中, 利用 DNA 条形码的 CO I 基因序列能够准确鉴定 97%的物种。Hajibabaei 等^[13]应用 DNA 条形码技术对多种热带鳞翅目昆虫进行了种类识别。

Kress 等^[14]和 Taberlet 等^[15]提出了理想的

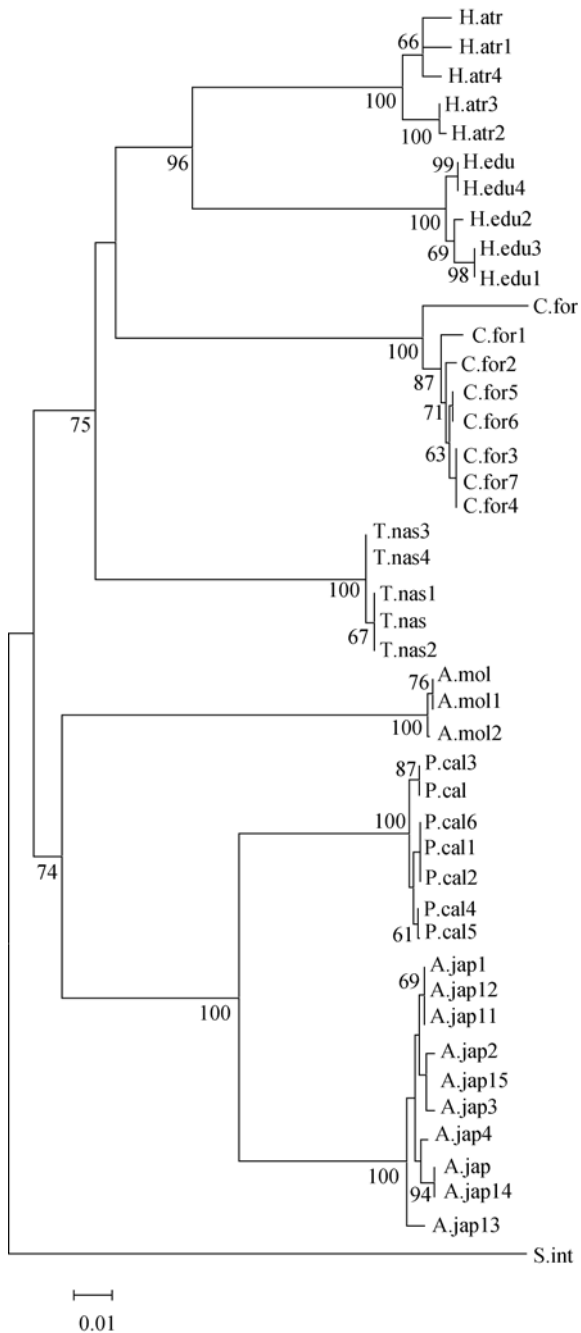


图 1 利用海参 CO I 序列构建的 NJ 树

通过自展分析各节点支持率, 标识在图中节点上方(1 000 个重复); 7 种海参各自形成高支持率的单系, 同为海参科的黑海参和红腹海参以及同为刺参科的仿刺参和加州拟刺参各自形成姐妹群. 种类代码见表 1.

Fig.1 Neighbor-joining trees resulting from analysis of the mtDNA CO I gene data

Numbers of the nodes represent bootstrap values with 1 000 replications. Seven sea cucumber species form strong monophyly separately. *Holothuria atra* and *Holothuria edulis* belonging to *Holothuriidae*, and *Apostichopus japonicas* and *Parastichopus californicus* belonging to *Stichopodidae* are sister groups. Species name shown in table 1.

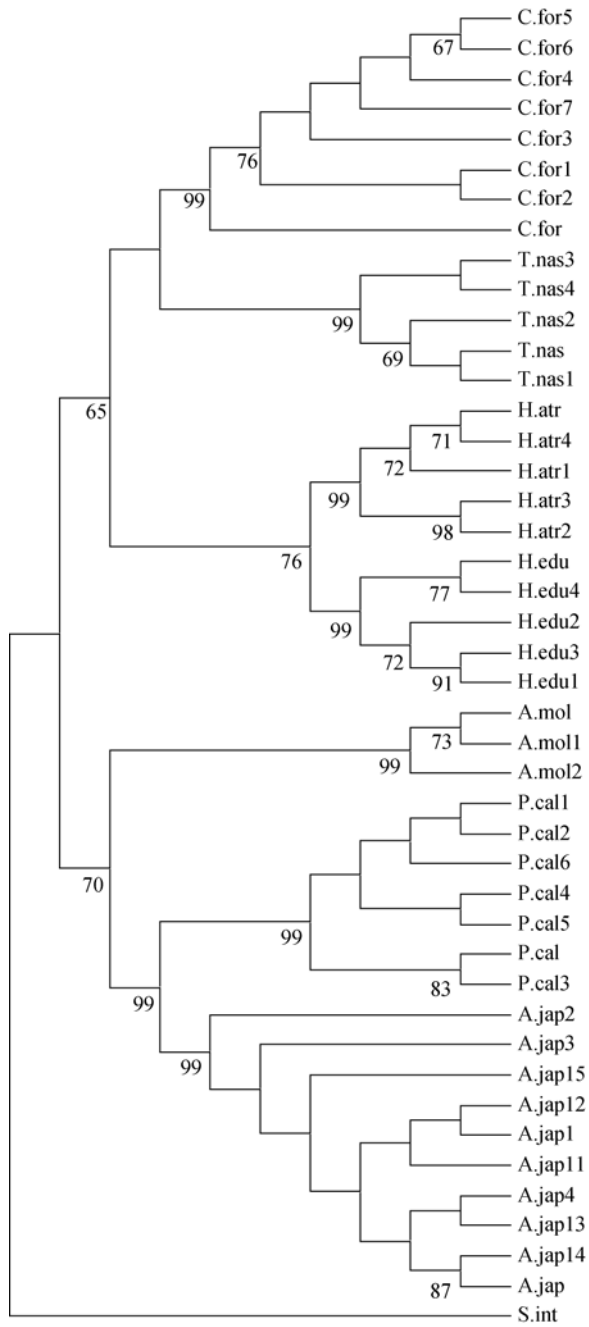


图 2 利用海参 CO I 序列构建的 MP 树

种类代码见表 1

Fig.2 Maximum Parsimony trees resulted from analysis of the mtDNA CO I gene data
Species name shown in table 1.

DNA 条形码标准, 主要包括: (1)具有足够变异和分化, 能够区分物种, 同时种内变异必须足够小; (2)有高度保守的引物设计区以便于设计通用引物; (3)片段足够短, 以便于 DNA 提取和 PCR 扩增, 尤其是对部分降解的 DNA 的扩增。本研究采用

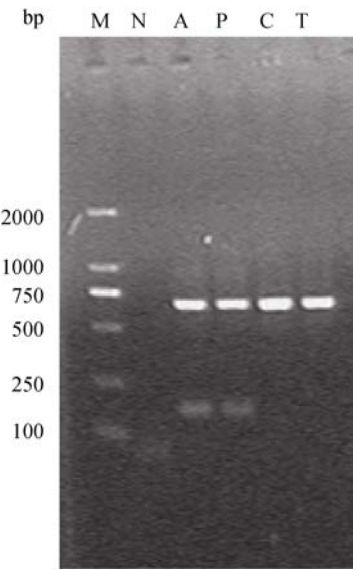


图 3 4 种海参 PCR 扩增产物电泳结果
M: DNA marker 2000; N: 阴性对照; A: 仿刺参; P: 加州拟刺参; C: 冰岛参; T: 梅花参.
Fig.3 Amplification products of 4 species of sea cucumbers in agarose gel
M: DL marker 2000, N: negative control, A: *Apostichopus japonicas*, P: *Parastichopus californicus*, C: *Cucumaria frondosa*, T: *Thelenota ananas*.

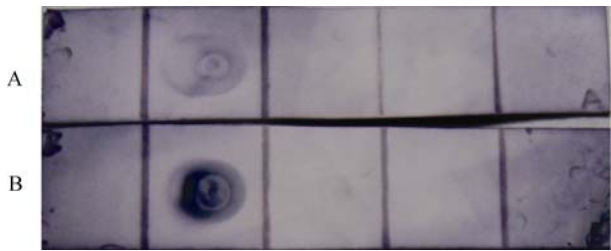


图 4 4 种海参斑点杂交特异性
A 膜是与 DL-01 探针杂交; B 膜是与 DL-02 探针杂交; 点样顺序从左到右依次为水、仿刺参、加州拟刺参、梅花参和冰岛参.
Fig.4 Dot-blot specificity of 4 species of sea cucumbers
A and B are hybridized with DL-01 and DL-02 respectively. The samples on the membranes are water, *Apostichopus japonicas*, *Parastichopus californicus*, *Thelenota ananas* and *Cucumaria frondosa* from left to right.

的线粒体 *CO I* 基因, 有保守序列, 便于设计通用引物, 扩增长度为 692 bp, 长度合适; 通过比对不同海参品种以及同种海参不同个体的 *CO I* 序列, 发现海参 *CO I* 具有较大的种间差异和较小的种内差异。目前的研究支持利用线粒体基因的

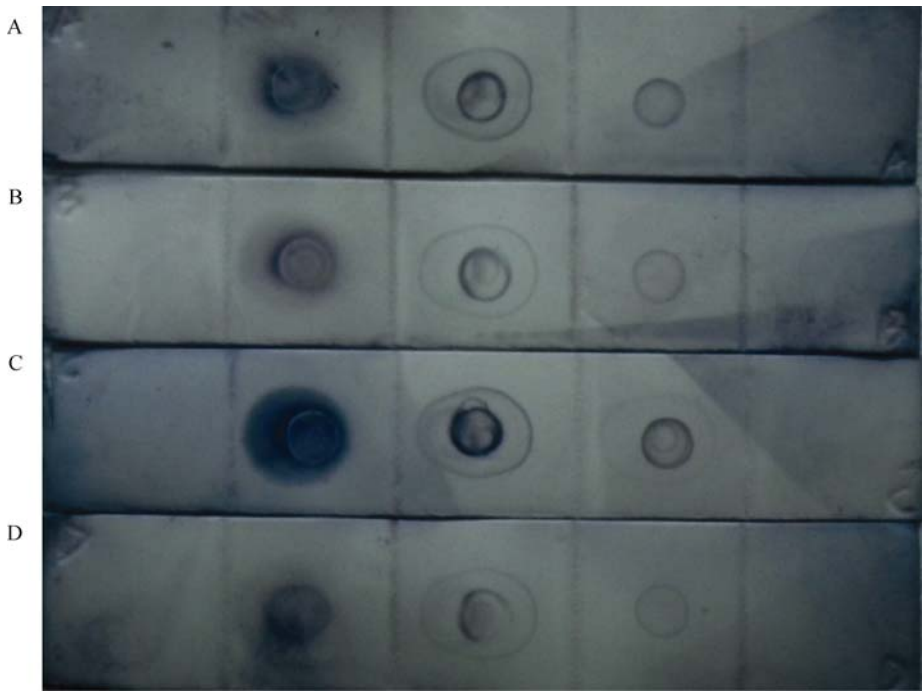


图 5 斑点杂交灵敏度
A 和 B 膜与 DL-01 探针杂交; C 和 D 膜与 DL-02 探针杂交; 点样顺序依次是水、10 ng、1 ng、100 pg 和 10 pg.
Fig.5 Sensitivity of dot-blot
A and B are hybridized with DL-01; C and D are hybridized with DL-02. The order on the membranes is water, 10 ng, 1 ng, 100 pg and 10 pg.

生物地理学分析给种内变异确定一个普遍的标准,一般认为变异小于 2% 的为种内差异,大于 2% 为种间差异^[16]。本研究中,海参种内遗传距离平均为 0.7%,种间遗传距离平均为 21.5%,种内和种间具有明显的差别。因此,海参线粒体 *CO I* 基因作为海参 DNA 条形码,能够有效地实现海参种类的鉴定。

Hall 等^[17]最早建立了核酸杂交技术,开拓了核酸杂交技术的研究。随着 20 世纪 80 年代非同位素标记技术的出现^[18],斑点杂交技术得到了推广,在医学及其他科学领域有着广泛的应用^[19-20]。虽然斑点杂交灵敏度低于 PCR 等方法,由于其具有成本低廉、操作简单、高通量等优点,是目前分子生物学中应用最广泛的技术之一。本研究在海参 DNA 条形码的基础上,设计了仿刺参特异性的探针。斑点杂交结果证明,该探针具有很高的特异性和较高的灵敏度,达到 100 pg,初步验证了斑点杂交方法应用于海参品种鉴定的可行性。下一步实验可以增加针对不同海参品种的探针,扩大斑点杂交在海参品种鉴定中的应用范围。本研究为建立以斑点杂交为基础的基因芯片技术进行海参品种的鉴定奠定了理论基础。

参考文献:

- [1] 姜健, 杨宝灵, 邵阳. 海参资源及其生物活性物质的研究[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 537-540.
- [2] 廖玉麟. 我国的海参[J]. 生物学通报, 2001, 35(9): 1-4.
- [3] 王静凤, 王奕, 赵林, 等. 日本刺参的抗肿瘤及免疫调节作用研究[J]. 中国海洋大学学报, 2007, 37(1): 93-96.
- [4] Arndt A, Marquez C, Lambert P, et al. Molecular phylogeny of eastern Pacific sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea) based on mitochondrial DNA sequence[J]. Mol Phylogenet Evol, 1996, 6(3): 425-437.
- [5] 文菁, 张吕平, 胡超群, 等. 中国热带 6 种海参骨片的种类和形态研究[J]. 海洋学报, 2009, 31(2): 140-144.
- [6] 李赟, 费来华, 陈家鑫. 十五种海参骨片的形态学研究[J]. 中国海洋大学学报, 2008, 38(2): 211-216.
- [7] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc Lond. B, 2003, 270: 313-321.
- [8] Witt J D S, Therloff D L, Hebert P D N. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation[J]. Mol Ecol, 2006, 15: 3073-3082.
- [9] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc R Soc Lond B, 2003, 270: 96-99.
- [10] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 14812-14817.
- [11] Vences M, Thomas M, Bonett RM, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges[J]. Phil Trans R Soc B, 2005, 360: 1859-1868.
- [12] Janzen D H, Hajibabaei M, Burns J M, et al. Wedding biodiversity inventory of a large and complex *Lepidoptera* fauna with DNA barcoding[J]. Phil Trans R Soc B, 2005, 360: 1835-1845.
- [13] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical *Lepidoptera* [J]. P Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 968-971.
- [14] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, et al. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. P Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 8369-8374.
- [15] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding[J]. Nucleic Acids Res, 2007, 35(3): 14.
- [16] Avise J C, Walker D. Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process[J]. Proc R Soc Lond B, 1998, 265: 457-463.
- [17] Hall B D, Spiegelman S. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1961, 47(2): 137-146.
- [18] Seibl R, Höltke H J, Rüger R, et al. Non-radioactive labeling and detection of nucleic acids. III. Applications of the digoxigenin system[J]. Biol Chem Hoppe Seyler, 1990, 371(10): 939-951.
- [19] Shekhar M S, Azad I S, Ravichandran P. Comparison of dot blot and PCR diagnostic techniques for detection of white spot syndrome virus in different tissues of *Penaeus monodon*[J]. Aquaculture, 2006, 261(4): 1122-1127.
- [20] Liang Li, Yuqiu Zhou, Qizhi Xiao, et al. Development and evaluation of a reverse dot blot assay for the simultaneous detection of six common Chinese G6PD mutations and one polymorphism[J]. Blood Cell Mol Dis, 2008, 41(1): 17-21.

Construction and application of DNA barcoding in sea cucumber *Holothurians*

LU Yingchun, TANG Qingjuan, ZUO Tao, DUAN Gaofei, WANG Chunxia, LI Jin, XU Jie, XUE Changhu

College of Food Science and Engineering, Ocean University of China, Qingdao 266003, China

Abstract: DNA barcoding is a diagnostic technique in which short DNA sequences can be used for species identification. The mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) sequence is used in DNA barcoding for species identification in many organisms. In this paper, the validation of the *COI* gene for DNA barcoding and species identification in sea cucumbers was studied. The *COI* genes from seven species of sea cucumbers were amplified and sequenced. Data were analyzed using DNASTar, DNAMAN, and MEGA 4.1. The DNA base composition was analyzed, and the genetic variations among species and within species were calculated. It was found that the genetic distance among the seven species was higher than that within a species. Phylogenetic analysis using neighbor-joining and maximum parsimony methods generated tree topologies that indicated that all individuals of each species formed a strong monophyletic group. These results suggested that the mitochondrial *COI* gene was a valid DNA barcoding gene for species identification in sea cucumbers. On the basis of the DNA barcoding, species-specific probes of *Apostichopus japonicus* were designed. Dot-blot hybridization showed that the probes could identify *A. japonicus* with high specificity and sensitivity. The design of further probes for different sea cucumber species, combined with dot-blot hybridization and microchip assays, will facilitate the identification of sea cucumbers at relatively low costs.

Key words: sea cucumber; mitochondrial *COI* gene; DNA barcoding; species identification; dot-blot

Corresponding author: TANG Qingjuan. E-mail: tangqingjuan@ouc.edu.cn