

天然三倍体鲫鱼突变体萍乡肉红鲫线粒体 细胞色素 b 基因序列分析

付小全 曾柳根 洪一江* 盛军庆 王军花 桂建芳

(南昌大学生命科学学院 南昌 330031; 淡水生态与生物技术国家重点实验室 武汉 430072)

摘要: 用细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因特异性引物,对萍乡肉红鲫 (*Carassius auratus* var. *pingxiangnensis*) 的线粒体 Cyt *b* 基因进行 PCR 扩增和双向测序。在 12 个个体中均得到序列一致的 Cyt *b* 基因全序列,长度为 1 140 bp。其 A、T、G、C 含量分别为 28.2% (321)、28.8% (328)、14.8% (170) 和 28.2% (321), A + T 含量 (57%) 明显高于 G + C 含量 (43%), 与其他水生动物相同基因片段碱基含量相似。该基因中密码子第 1 位核苷酸中 4 种碱基组成较为均衡;第 2 位核苷酸中 T 的使用率较高,为 41.8%, G 的使用率较低,为 13.2%;密码子第 3 位 A 的使用率较高,为 39.7%,而 G 的使用率较低,仅为 6.3%。BLAST 结果显示,萍乡肉红鲫与其他鲫鱼类的 Cyt *b* 基因具有较高的同源性,其中与银鲫 (*C. a. gibelio*) 的相似性为 93%,与普通鲫鱼 (*C. carassius*) 的相似性为 98%。邻接法构建的分子系统进化树表明,萍乡肉红鲫与普通鲫鱼亲缘关系最近。

关键词: 萍乡肉红鲫;线粒体;Cyt *b* 基因;序列分析

中图分类号: Q951 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)02-97-05

Sequence Analysis of Mitochondrial Cytochrome *b* Gene from Natural Triploid Mutant, *Carassius auratus* var. *pingxiangnensis*

FU Xiao-Quan ZENG Liu-Gen HONG Yi-Jiang* SHENG Jun-Qing
WANG Jun-Hua GUI Jian-Fang

(Life Science College of Nanchang University, Nanchang 330031;
State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Wuhan 430072, China)

Abstract: Mitochondrial DNA cytochrome *b* (Cyt *b*) gene was amplified by PCR and sequenced bidirectionally in Pingxiang Red-transparent Crucian Carp (*Carassius auratus* var. *pingxiangnensis*), a natural triploid Crucian Carp mutant in the area of Pingxiang City of Jiangxi Province. The results showed that there were no differences in sequences among the twelve samples. The gene sequence was 1 140 bp in full length which contained 28.2% (321), 28.8% (328), 14.8% (170), 28.2% (321) of A, T, G, and C, respectively. The result of A + T (57%) > G + C (43%) was similar to that in other aquatic animals. The first codon evenly contained 4 nucleotides; the second codon had high content of T (41.8%) but low content of G (13.2%); the third codon contained 39.7% of A and 6.3% of G. The Cyt *b* gene of the Pingxiang Red-transparent Crucian Carp was proved to have high homology with

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 30660143), "973" 项目 (No. 2004CB117401), 江西省教育厅项目 (2003), 淡水生态与生物技术国家重点实验室项目 (No. 2008FB004);

*通讯作者, E-mail: yj hong2008@163.com;

第一作者介绍 付小全,男,硕士研究生;研究方向:水产动物遗传育种学;E-mail: nandaxq@hotmail.com。

收稿日期: 2008-07-10, **修回日期:** 2008-11-07

other species of crucian carp recorded in the GenBank. The sequence similarity between this mutant crucian carp and the Silver Crucian Carp (*C. a. gibelio*) was 93%, and that between this mutant and Common Crucian Carp (*C. carassius*) was 98%. The result of phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method indicated the closest phylogenetic relationship between the Pingxiang Red-transparent Crucian Carp and the Common Crucian Carp.

Key words: Pingxiang Red-transparent Crucian Carp (*Carassius auratus* var. *pingxiangnensis*); Mitochondrion; Cyt *b* gene; Sequence analysis

线粒体 DNA (mtDNA) 是独立于核基因组的遗传物质,它普遍存在于真核细胞中,是一种共价闭环双链 DNA 分子,具有分子量小、结构简单、母系遗传和进化速度快等特点,尤其是线粒体所编码的细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因,被认为是探讨系统进化和分类的良好指标^[1]。由于 Cyt *b* 基因的进化速度适中,易用一些通用引物扩增和测序,因此近年来被广泛应用于两栖类、爬行类、鱼类等的系统发育及种类鉴别等的研究^[2-4]。

萍乡肉红鲫 (*Carassius auratus* var. *pingxiangnensis*) 是江西省萍乡地区分布的独特的三倍体鲫鱼突变体^[5],经过人工选育获得了遗传性状稳定的品种,2008 年被全国水产原良种审定委员会审定为新品种。该鱼体色桔红色,(半)透明,抗病能力强,行雌核生殖和两性生殖两种生殖方式^[6,7],类似银鲫 (*C. a. gibelio*),具有较为独特的遗传特征。为了解该鱼的遗传背景、起源以及在进化上的地位等,本文对萍乡肉红鲫线粒体 Cyt *b* 基因进行分析,并通过与 GenBank 中部分鲤科鱼类的 Cyt *b* 基因序列进行比较分析,以期对萍乡肉红鲫遗传背景的研究及种质资源的保护积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料和 DNA 的提取 萍乡肉红鲫取自江西省萍乡市水产科学研究所,共 12 尾。取 50 mg 左右的萍乡肉红鲫背部肌肉,采用 SDS/蛋白酶 K 消化,酚/氯仿法抽提总 DNA^[8]。

1.2 PCR 扩增和测序 PCR 扩增和测序引物均为 L14724 (5'-GAC TTG AAA GA AAA ACC ACC GIT G-3') 和 H15915 (5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3')^[2],由上海生工公司

合成。反应体系总体积为 50 μ l,其中 10 \times Buffer 缓冲液 5 μ l, MgCl₂ (25 mmol/L) 3 μ l, dNTP (10 mmol/L) 1 μ l, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l, Taq 酶 2 U, 模板 DNA (约 100 ng/ μ l) 1 μ l。PCR 反应条件为 94 预变性 2 min; 94 变性 30 s, 52 退火 45 s, 72 延伸 1 min, 35 个循环; 72 延伸 7 min。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增产物经 EZ-10 Spin Column PCR Purification Kit (BBI) 纯化后送至上海生工公司双向测序。

1.3 序列分析 用 Clustal X^[9] 软件对所得序列进行编辑和比对,并用 SEAVIEW^[10] 人工手动排检。为了探讨萍乡肉红鲫的系统位置,从 GenBank 下载了部分鲤科鱼类的 Cyt *b* 基因序列进行分析,包括来自不同水域的银鲫 (Lysimacheia Lake, Trichonida Lake, Ozeros Lake, Amvrakia Lake)、日本银鲫 (*C. a. langsdoffi*)、白鲫 (*C. a. cuvieri*)、土鲫 (*C. a. auratus*) 和普通鲫鱼 (*C. carassius*), 并选用鲤形目的胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 作为外群。邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建分子系统进化树,采用 Bootstrap 1 000 次检验系统树各分支的置信限;并利用 MEGA 4^[11] 软件将蛋白质编码基因核苷酸序列转化为氨基酸序列。

2 结果

2.1 PCR 扩增 用 Cyt *b* 基因的特异引物,对萍乡肉红鲫总 DNA 进行了扩增,电泳检测得到清晰的基因片段,12 个个体均扩增到一条清晰的条带,大小与预期的结果一致 (图 1)。

2.2 序列测定结果 利用 Clustal X 软件对 DNA 序列进行比对,人工手动排检编辑后得到 1 171 bp 的序列,其中包括萍乡肉红鲫 Cyt *b* 基

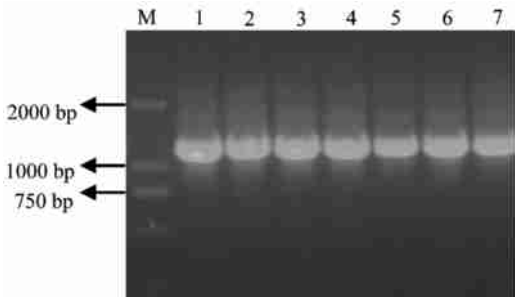


图 1 萍乡肉红鲫 Cyt *b* 扩增产物

Fig. 1 Cyt *b* PCR products of Pingxiang Red-transparent Crucian Carp

M. DL2000 DNA 分子量标准;1~7. Cyt *b* PCR 产物。
M. DL2000 DNA Marker;1- 7. Products of Cyt *b* by PCR.

因全序列 1 140 bp (图 2), 含 1 个起始密码子 ATG, 以及 Cyt *b* 基因两端外侧片段的 31 个碱基。12 个个体的 Cyt *b* 基因序列均一致。用分析软件 MEGA 4 将萍乡肉红鲫 Cyt *b* 基因片段翻译成氨基酸序列, 共包含 380 个氨基酸残基。本文所获得的基因序列已提交 GenBank, 登录号为 EU364877。

2.3 Cyt *b* 基因片段序列分析 由图 2 可知, Cyt *b* 基因序列中 A、G、T 和 C 碱基的平均含量分别为 28.2% (321 个)、14.8% (170 个)、28.8% (328 个) 和 28.2% (321 个)。在密码子的第 1 位上 4 种碱基使用较为均衡; 密码子第 2

```

1  ATGGCAAGCCTACGAAAAACACACCCOCTCATTAAAATCGCTAATGAOCTACTAGTTGAOCTACCCACACCATOCAACATTTTCAGCATGA
1  M A S L R K T H P L I K I A N D A L V D L P T P S N I S A W
91  TGAAACTTTGCTCTCTACTAGGATTATGCTTAATTACTCAAATCTAACCOCCTATTTCTAGCTATACATTACAOCCTCAGACATTTC
31  W N F G S L L G L C L I T Q I L T G L F L A M H Y T S D I S
181  AOCGCATTCATOCGTTAOCACATCTGCCGAGATGTAAACTACGGCTGACTAATTOGTAATATTCACGCCAATGGAGCATCATCTTTC
61  T A F S S V T H I C R D V N Y G W L I R N I H A N G A S F F
271  TTCATCTGTATCTACATACACATTCGCCGGGCTATATATGATGATACCTTTACAAAAGAACTGAAACATTTGGAGTACTTCTCCTA
91  F I C I Y M H I A R G L Y Y G S Y L Y K E T W N I G V V L L
361  CTCCTAGTTATAATGACAGCCTTTGTCGGTTATGTTCTTCCATGAGGACAAATATCCTTTTGAGGGCTACAGTAATCACAAAACCTTCTA
121  L L V M M T A F V G Y V L P W G Q M S F W G A T V I T N L L
451  TOCCOCTGCATACATGGGAGATATATTAGTCCCAATGGATTTGAGGAGCTTCTCCGTAGACAATGCACATTAACACCGATTCTTTGCA
151  S A V P Y M G D M L V Q W I W G G F S V D N A T L T R F F A
541  TTTCACTTCCTTCTAACATTCGTTATCGCOGOCGCTACTGTCACTTCAOCTACTGTTTCTCCACGAAAACAGGATCAAATAAOCOCATCGGG
181  F H F L L P F V I A A A T V I H L L F L H E T G S N N P I G
631  CTGAACTCAGACGCAGACAAAATTTCTTTCCACOCATACTTTTTCATACAAAAGACCTCCTTGGGTTGCGTATTACTACTAGCOCTCACA
211  L N S D A D K I S F H P Y F S Y K D L L G F V I M L L A L T
721  CTCCTGGCATTATCTCCOCAAACCTTTTAGGAGACCCAGAAAACCTTCACTCCAGOCAATCCOCTGGTTACTCCOCTCATATTAACCA
241  L L A L F S P N L L G D P E N F T P A N P L V T P P H I K P
811  GAGTGGTATTTCTAATTTGCTCAOCTATTCOOGATCAATTCOCAAACGCTGGGAGGAGTTCTTGCACTACTATTCTCTATCCTCCTGA
271  E W Y F L F A Y A I L R S I P N K L G G V L A L L F S I L V
901  CTAATGGTGTACOCCTATTACACAOCTCAAAAACAACGAGGACTAACGTTCCOCCCAATCAOCCAATTCCTATTTGAACTCTAGTCGCA
301  L M V V P L L H T S K Q R G L T F R P I T Q F L F W T L V A
991  GACATGATTATCCTGACATGAATTGAGGAAATACAGTAGAACATCATTATCATCGGACAAAATCGCATOCCTGTATATTTCGCA
331  D M I I L T W I G G M P V E H P F I I I G Q I A S V L Y F A
1081  CTGTTCTTCTTCTTCCACTAGCAGGATGATTAGAAAATAAAGCACTGAAATGAGCT
361  L F L V L F P L A G W L E N K A L K W A

```

图 2 萍乡肉红鲫 Cyt *b* 基因的核苷酸序列及其推测的氨基酸序列

Fig. 2 The nucleic acid and deduced amino acid sequences of Cyt *b* gene in Pingxiang Red-transparent Crucian Carp

位上碱基 T 的使用比率高达 41.8%, 碱基 G 的使用比率低至 13.2%; 密码子第 3 位上碱基 A 的使用比率高达 39.7%, 而碱基 G 的使用比率仅为 6.3%。

2.4 萍乡肉红鲫 Cyt b 与几种鱼类的碱基序列比较 用 BLAST 基因分析软件分析比较萍乡肉红鲫与 GenBank 上其他鲫鱼类的 Cyt b 基

因序列, 结果表明存在较高的同源性, 与普通鲫鱼的 Cyt b 的碱基序列 (AY714387) 有 98% 的同源性。同时利用 MEGA 4 软件比较了鲤形目 9 种鱼的 Cyt b 基因序列的同源性, 并用 NJ 法构建分子系统进化树 (图 3), 结果显示萍乡肉红鲫与普通鲫鱼亲缘关系最近。

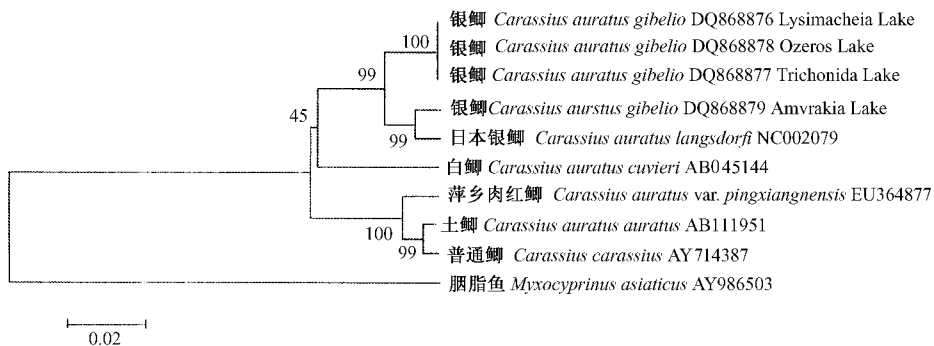


图 3 邻接法构建分子系统进化树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree constructed by Neighbor-Joining method

图中每支上的数据表示置信度; 图中的标尺表示遗传标尺。

The numbers on branches show the confident values, and the scale in the figure indicates inheritance scale.

3 讨论

本研究首次获得了萍乡肉红鲫的线粒体 Cyt b 基因全序列, 共 1 140 bp。实验发现 Cyt b 基因序列在萍乡肉红鲫群体内表现出高度的一致性, 12 个个体 (包括通体桔红色的纯合个体和具有杂斑的个体) 得到的序列一致, 种内没有发现个体差异。萍乡肉红鲫的 Cyt b 基因含起始密码子 ATG, 终止密码子则是在转录成 mRNA 时在 3 端的 T 碱基上加上 AA 而形成 TAA 终止密码子。在其他一些鱼类如草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*, GenBank AF420424) 也可见这种现象。这与剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*, GenBank AY056056)^[12] 以及报道的大多数鱼类的 Cyt b 基因不同^[13,14]。剑尾鱼及大多数鱼的 Cyt b 基因的 1 140 bp 中含有起始密码子 ATG 和终止密码子 TAA。所比较的 7 种鱼类 Cyt b 基因的 380 个氨基酸中, 有些区域的序列完全相同, 包括几个较长的区域: 43~66 aa; 110~155 aa; 242~305 aa; 307~355 aa。推测这

些高度保守的序列与 Cyt b 基因的功能有着密切的关系。

萍乡肉红鲫的线粒体 Cyt b 基因序列中 A + T 含量为 57.0%, G + C 含量为 43.0%, A + T 含量明显高于 G + C 含量, 该结果与脊椎动物 mtDNA 碱基组成 G + C 含量在 37%~50% 之间一致^[15]。在 Cyt b 基因中, 密码子碱基的使用也存在一定差异。在密码子的第 1 位上 4 种碱基使用较为均衡; 密码子第 2 位上碱基 T 的使用比率高, 碱基 G 的使用比率低; 密码子第 3 位上碱基组成存在较大的偏向。

萍乡肉红鲫是一种天然的三倍体鲫鱼, 具有与银鲫类似的生殖遗传特征, 都具有两性生殖和雌核发育两种生殖方式^[5,16], 但通过 Cyt b 基因全序列比对发现, 萍乡肉红鲫与银鲫 (GenBank DQ868879) Cyt b 基因间有一定差异, 序列相似性为 93%, 两序列间共有 76 个核苷酸差异位点; 而萍乡肉红鲫与普通鲫鱼间只有 17 个核苷酸差异位点。从构建的分子进化树也发现它们的分类地位有所不同, 萍乡肉红鲫

与普通鲫鱼聚为一枝,而银鲫与日本银鲫聚为一枝,然后两分枝才相结合。结果表明,萍乡肉红鲫与普通鲫鱼亲缘关系最近,而与银鲫的亲缘关系略远。尽管从 *Cyt b* 基因的角度比较了萍乡肉红鲫与部分鲤科鱼类的亲缘关系,但它们之间的亲缘关系的进一步研究仍在进行中。

参 考 文 献

- [1] Briolay J, Caltier N, Brito R M, *et al.* Molecular phylogeny of cyprinidae inferred from cytochrome *b* DNA sequences. *J Mol Phylogenet Evol*, 1998, **9**(1): 100 ~ 108.
- [2] Xiao W H, Zhang Y P, Liu H Z, *et al.* Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *J Mol Phylogenet and Evol*, 2001, **18**(2): 163 ~ 173.
- [3] Song C B, Near T J, Page L M. Phylogenetic relations among percid fishes as inferred from mitochondrial cytochrome *b* DNA sequence data. *J Mol Phylogenet Evol*, 1998, **10**(3): 343 ~ 353.
- [4] Farias I P, Orti G, Sampaio I, *et al.* The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *J Mol Evol*, 2001, **53**(2): 89 ~ 103.
- [5] Hong Y J, Yu Z J, Zhou L, *et al.* A population of red-transparent, triploid *Carassius auratus*. *Journal of Fish Biology*, 2005, **67**: 1139 ~ 1143.
- [6] 洪一江, 王静, 桂建芳等. 三倍体萍乡肉红鲫的精子入卵及胚胎发育观察. *水生生物学报*, 2005, **29**(5): 518 ~ 523.
- [7] 洪一江, 胡成钰, 张忠萍等. 萍乡肉红鲫肌肉营养成分分析. *水利渔业*, 2001, **21**(3): 20 ~ 21.
- [8] David A W, Scott K D, Bruce M R. Phylogenetic relationships in the subfamily Bovinae (Mammalia; Artiodactyla) based on ribosomal DNA. *Journal of Mammal*, 1992, **73**(2): 262 ~ 275.
- [9] Thompson J D, Gibson T J, Plewinak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 4876 ~ 4882.
- [10] Caltier N, Gouy M, Gautier C. SeaView and Phylo-Win: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput Appl Biosci*, 1996, **12**: 543 ~ 548.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**(8): 1596 ~ 1599.
- [12] 叶星, 白俊杰, 劳海华等. 剑尾鱼线粒体细胞色素 *b* 基因的序列分析. *中国实验动物学报*, 2002, **10**(3): 180 ~ 185.
- [13] Chang Y C, Huang F L, Lo T B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome. *J Mol Evol*, 1994, **38**: 138 ~ 155.
- [14] Delarbre C, Spruyt N, Delmarre C, *et al.* The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. *Genetics*, 1998, **150**: 331 ~ 334.
- [15] 桂建芳. 脊椎动物线粒体 DNA 的进化遗传学. *动物学杂志*, 1990, **25**(1): 50 ~ 55.
- [16] 蒋一珪, 梁绍昌, 陈本德等. 异源精子在银鲫雌核发育子代中的生物学效应. *水生生物学集刊*, 1983, **8**(1): 1 ~ 16.