

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.12.005

巨鲇线粒体 *ND3*, *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因克隆及多态性分析^①

杜 民^{1,2}, 叶德来^{1,2}, 牛宝珍^{1,2}, 段加明^{1,2},
岳 冉^{1,2}, 宋桃稳^{1,2}, 王文涛^{1,2}, 刘艳红^{1,2}

1. 红河学院 云南省高校农作物优质高效栽培与安全控制重点实验室, 云南 蒙自 661199;
2. 红河学院 生命科学与技术学院, 云南 蒙自 661199

摘要: 为了解巨鲇鱼的种质资源情况, 采用 PCR 技术扩增克隆并测序, 得到巨鲇 NADH dehydrogenase subunit-3 (*ND3*), 精氨酸的转运 RNA(*tRNA-Arg*) 和 NADH dehydrogenase subunit-4L(*ND4L*) 基因全序列各 12 条. 通过 DNAMAN 5.2.2 软件进行序列比对, 采用 MEGA 5.02 软件进行碱基质量分数分析, 计算遗传距离, 并构建系统发育树. 结果表明: 巨鲇鱼 *ND3* 基因序列全长为 346 bp, 碱基质量分数 A 为 26.2%, T 为 29.6%, C 为 28.8%, G 为 15.4%, 其中 A+T 质量分数(55.8%)高于 G+C 质量分数(44.2%), 12 个 *ND3* 基因序列存在 5 种单倍型, 发生了 5 次转换, 1 次颠换, 5 种单倍型之间平均相对遗传距离为 0.007; *tRNA-Arg* 基因序列全长为 71 bp, 碱基质量分数 A 为 23.9%, T 为 23.9%, C 为 29.6%, G 为 22.6%, 其中 A+T 质量分数(47.8%)低于 G+C 质量分数(52.2%), 12 个基因序列完全一致; *ND4L* 基因序列全长为 297 bp, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA, 碱基质量分数 A 为 24.6%, T 为 26.3%, C 为 33.3%, G 为 15.8%, 其中 A+T 质量分数(50.9%)高于 G+C 质量分数(49.1%), 12 个基因序列完全一致; 将巨鲇鱼与鲃科的其他 10 种鱼类的 *ND3*, *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因用 Minimum Evolution 法 (ME) 构建系统发育树, 发现 12 尾巨鲇鱼单独聚为一支, 这一结果与传统的形态学分类相似.

关键词: 巨鲇; *ND3*; *tRNA-Arg*; *ND4L*; 序列分析; 系统发育

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-9868(2017)12-0032-06

巨鲇(*Bagarius yarrelli*)在中国分布于云南省境内的澜沧江、怒江、元江水系, 其肉呈黄色, 故地方名叫“面瓜鱼”, 隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲃形目(Siluriformes), 鲃科(Sisoridae), 鲃属(*Bagarius*)^[1]. 巨鲇是云南特有的大型底栖食肉鱼类, 其体质量可超过 50 kg, 体长可超过 200 cm. 目前对巨鲇的研究包括巨鲇的生物学特性^[2-4]、人工繁殖^[5]、疾病防治^[6]、胚胎发育^[7], 2013 年巨鲇苗种实现规模化生产, 能够满足增殖放流和养殖生产.

① 收稿日期: 2016-10-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360638); 云南省教育厅科学研究基金重大专项项目(ZD2013009); 云南省中青年学术带头人后备人才项目(2015HB059); 红河学院创新性实践教学改革试点项目; 大学生创新创业实践训练平台建设(CXSJ1340); 红河学院中青年学术带头人后备人才项目(2014HB0203); 红河学院博士专项项目(14bs11).

作者简介: 杜 民(1974-), 男, 湖北枣阳人, 博士, 副教授, 主要从事水生生物技术与资源的研究.
通信作者: 刘艳红, 教授.

线粒体 DNA 是目前分子生物学研究的一个重要的领域,而鱼类 mtDNA 是鱼类分子系统学研究和群体遗传分析的重要标记^[8].近年来线粒体基因组已经被广泛地应用于脊椎动物群体的群体遗传学、系统发生学、保护生物学、比较和进化基因组学、分子进化和系统发育树重建等方面的研究^[9-11].本实验所研究的序列为巨鲈 ND3 和 ND4L 基因片段,与其他动物一样,其 ND3 基因和 ND4L 基因之间有 1 个 *tRNA-Arg* 基因.韩家波等^[12]用 PCR 产物直接测序法,测定渤海辽东湾斑海豹 15 个线粒体的一段从 ND3 到 ND4 基因与 22 个海豹科动物的 ND4L 基因序列的系统发生分析表明,海豹科动物分为南半球和北半球两大类群,斑海豹与港海豹为北半球种类,亲缘关系最近.陈瑜等^[13]对四川黑熊、马来熊、棕熊、美洲黑熊和北极熊的 ND3 基因和 ND4L 基因所编码的氨基酸序列进行了多序列比对分析,结果表明四川黑熊、马来熊、棕熊、美洲黑熊和北极熊的基因序列同源性极高.张四明等^[14]采用 DNA 测序技术首次测定了包括中国特有鲟形目鱼类在内的 12 种鲟形目鱼类的 mtDNA ND4L 和 ND4 基因的序列,并进行了分子系统学分析,结果表明环太平洋地区的鲟科鱼类可能有共同的起源.本实验通过巨鲈特有的引物序列来克隆其 ND3, *tRNA-Arg* 和 ND4L 基因,并对其序列多态性进行研究.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究的 12 条巨鲈采自云南省河口县,剪取肌肉组织放于 1.5 mL EP 管中贴上对应标签,加入无水乙醇,置于 4 °C 保存备用.

1.2 实验方法

高纯度的巨鲈鱼基因组 DNA 的提取采用杜民等^[15]的酚-氯仿-异戊醇方法.提取的 DNA 样品,用 100 mL 1% 的琼脂糖凝胶中加入 6 μ L 溴化乙锭(EB)来检测其纯度.利用设计的 2 对特异性引物 Baya9F 和 Baya9R^[15], Baya10F 和 Baya10R^[16],对提取的 DNA 进行 PCR 扩增,1% 的琼脂糖凝胶检测扩增片段,凝胶成像系统观察并进行拍照保存,筛选出目的条带利用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,在暗箱式紫外分光仪下切取目的片段,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化科技北京有限公司)回收 DNA,与 PMD18-T 载体(北京博迈德生物技术有限公司)进行连接,利用 TOP10 感受态细胞进行转化并克隆,挑选阳性克隆利用 M13 通用引物进行菌液 PCR,筛选出具有阳性克隆的菌株,送南京金斯瑞生物科技有限公司测序.

1.3 数据分析

利用 DNAMAN5.2.2 对克隆得到的序列进行手动剪切并与 GenBank 中巨鲈序列进行配对剪切得到目的基因的序列全长,对序列进行同源性分析;利用 MEGA5.02 软件进行碱基组成分析、遗传距离分析并利用最小进化法(Minimum Evolution, ME)构建系统发育树.

2 结果与分析

2.1 序列分析

采用 DNAMAN5.2.2 和 MEGA5.02 软件对获得的巨鲈序列进行拼接并分析,表明巨鲈鱼 ND3 基因序列全长为 346 bp;起始密码子为 ATG,终止密码子为 T—;碱基质量分数 A 为 26.2%,T 为 29.6%,C 为 28.8%,G 为 15.4%,其中 A+T 质量分数(55.8%)高于 G+C 质量分数(44.2%),12 个 ND3 基因序列存在 5 种单倍型,发生了 5 次转换,1 次颠换,5 种单倍型之间平均相对遗传距离为 0.007; *tRNA-Arg* 基因序列全长为 71 bp,碱基质量分数 A 为 23.9%,T 为 23.9%,C 为 29.6%,G 为 22.6%,其中 A+T 质量分数(47.8%)低于 G+C 质量分数(52.2%),12 个基因序列完全一致,只存在一种单倍型;ND4L 基因序列全长为 297 bp,起始密码子为 ATG,终止密码子为 TAA,碱基质量分数 A 为 24.6%,T 为

26.3%, C 为 33.3%, G 为 15.8%, 其中 A+T 质量分数(50.9%)高于 G+C 质量分数(49.1%), 12 个基因序列也完全一致; *ND3* 碱基质量分数见表 1.

表 1 巨鲉线粒体 *ND3* 碱基组成

	A	T	C	G	A+T	C+G	总长/bp
单倍型 1	26.3	29.8	28.6	15.3	56.1	43.9	346
单倍型 2	26.3	29.2	29.2	15.3	55.5	44.5	346
单倍型 3	26.3	29.8	28.3	15.6	56.1	43.9	346
单倍型 4	26.3	29.5	28.9	15.3	55.8	44.2	346
单倍型 5	26.0	29.5	28.9	15.6	55.5	45.5	346
平均值	26.2	29.6	28.8	15.4	55.8	44.2	346

2.2 分子系统遗传关系

通过 DNAMAN5.2.2 进行序列比对, 并采用 MEGA 5.02 软件, 将巨鲉鱼与鲷科的其他 10 种鱼类的 *ND3*, *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因用 Minimum Evolution 法(ME)构建系统发育树, 系统树各节点的支持率以自展值为 1 000 次重复抽样检验的百分比结果如图 1, 图 2, 图 3, 图 4.

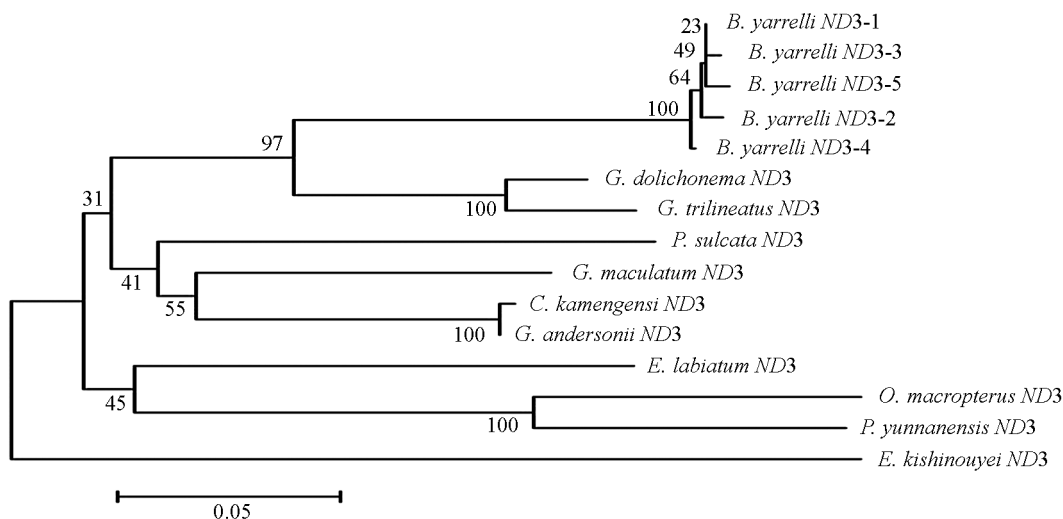


图 1 利用 ME 法构建 10 种鲷科鱼线粒体 *ND3* 基因分子系统树

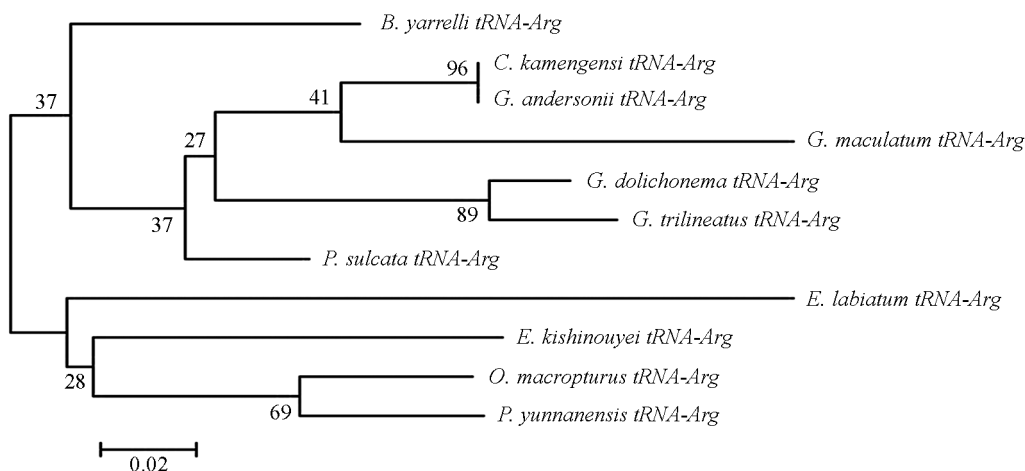


图 2 利用 ME 法构建 10 种鲷科鱼线粒体 *tRNA-Arg* 分子基因系统树

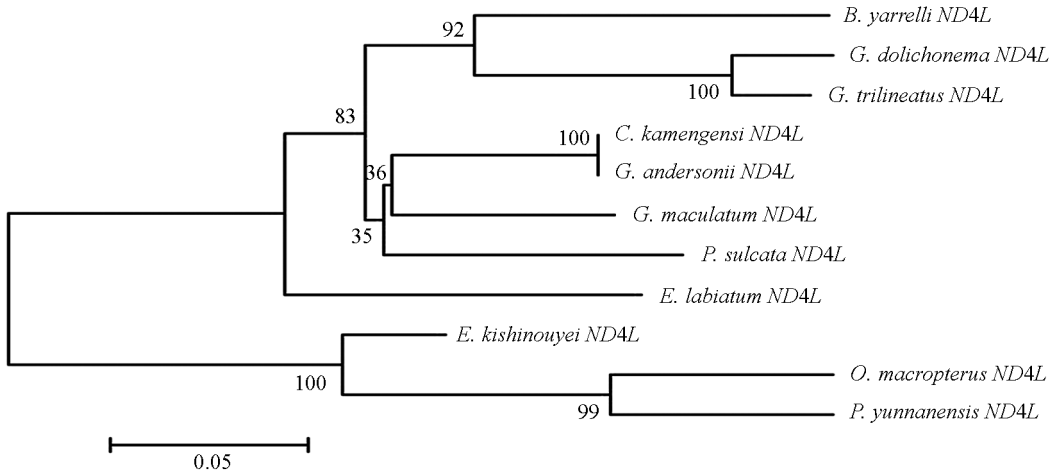


图 3 利用 ME 法构建 10 种鲮科鱼线粒体 ND4L 分子系统树

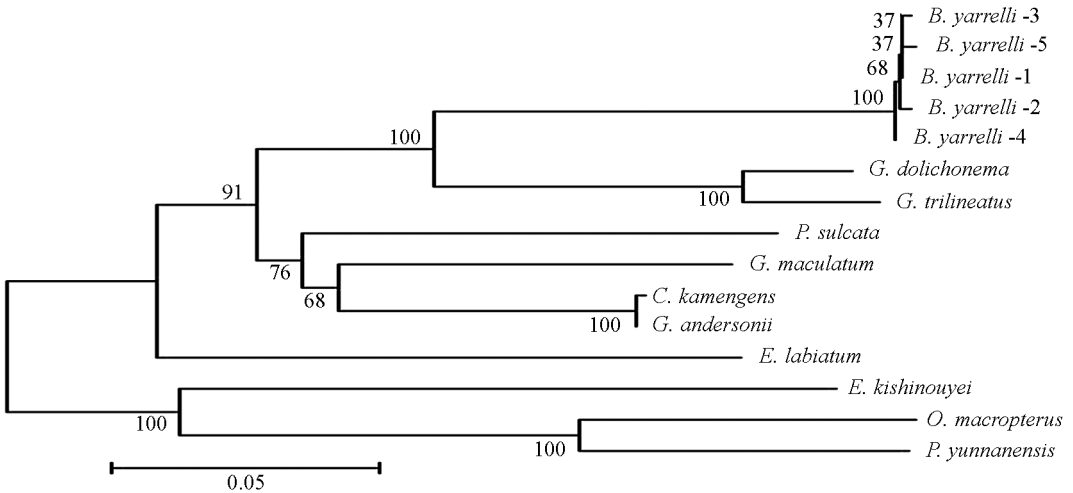


图 4 利用 ME 法构建 10 种鲮科鱼线粒体 ND3, tRNA-Arg 和 ND4L 全序列分子系统树

由母系统树发现巨鲃鱼单独聚为一支, 与纹胸鲃属相接近. 10 种鲮科鱼类基因片段的种类及在 GenBank 上面的登录号分别为三线纹胸鲃 *Glyptothorax trilineatus* (NC_021608), 尖须异齿鲃 *Oreoglanis macropterus* (NC_021607), 似黄斑褶鲃 *Pseudocheneis sulcata* (NC_021605), 藏鲃 *Exostoma labiatum* (NC_021603), 拟鲃 *Pseudexostoma yunnanensis* (NC_021604), 凿齿鲃 *Glaridoglanis andersonii* (NC_021600), 贡山鲃 *Creteuchiloglanis kamengensis* (NC_021599), 黑斑原鲃 *Glyptosternon maculatum* (NC_021597), 黄石爬鲃 *Euchiloglanis kishinouyei* (NC_021598), 长丝黑鲃 *Gagata dolichonema* (NC_021596).

3 讨论

鱼类 mtDNA 基因序列分析中, 13 个蛋白质编码基因的结构和功能已了解得比较清楚, 且能用一些通用引物进行扩增, 因而被广泛地用来进行系统进化研究^[17]. 郭宪光^[18]基于 16S rRNA 技术构建鲮科鱼类的分子系统树表明, 鲮科鱼类是一个单系群. 王伟等^[19]采用 RAPD 技术在鲮科鱼类属级阶元的分析揭示, 原鲃属与纹胸鲃属亲缘关系较近, 原鲃属是一个比黄颡鱼更为特化的类群, 这与形态学描述的原鲃属为鲃群最原始的属结论相反. 周用武等^[20]利用 *Cytb* 基因片段支持褶鲃属鱼类构成单系群; 而 He Shun-ping 等^[21]分析了鲮科鱼类 *Cytb* 基因, 构建了鲮科鱼类系统发育树, 指出鲃鱼类不是一个单系群. 但对巨鲃的研究还较少, 对巨鲃的分类一直都采用传统的形态学分类方法, 而本

次实验从分子水平探讨巨鲇鱼遗传多样性, 运用 PCR 扩增和 DNA 测序技术, 对河口巨鲇鱼的线粒体 DNA 的 *ND3*, *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因序列进行分析, 从而反映出巨鲇鱼群体的种质特征, 适用于巨鲇鱼群体内的遗传多样性研究.

12 条巨鲇鱼 *ND3* 序列存在 5 种单倍型, 出现 6 个变异位点, 5 次转换, 1 次颠换. 12 条巨鲇鱼的 *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因序列都仅存在 1 种单倍型, 说明 *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因的序列都是高度保守的. 从碱基质量分数上分析, 巨鲇 *ND3* 基因的 A+T 平均质量分数(55.8%)明显高于 G+C 平均质量分数(44.2%), 与其他鲢科 10 个不同 *ND4L* 基因序列基本一致; *tRNA-Arg* 基因的 A+T 平均质量分数(47.8%)略低于 G+C 平均质量分数(52.2%), 与其他鲢科 10 个不同种类的 *tRNA-Arg* 基因序列组成相反; 巨鲇 *ND4L* 基因的 A+T 平均质量分数(50.9%)略高于 G+C 平均质量分数(49.1%), 与其他鲢科 10 个不同种类 *ND4L* 基因序列的碱基组成基本一致.

线粒体 mtDNA *ND3*, *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因测序表明巨鲇个体间的差异极小, 遗传距离从 0~0.012, 表明巨鲇鱼个体之间无明显差异; 种间的遗传差异极小, 平均差异不到 0.3%, 也支持巨鲇单独成一支. 而将巨鲇鱼与其他 10 种鲢科鱼类的 *ND3*, *tRNA-Arg* 和 *ND4L* 基因利用 ME 法构建的系统进化树, 表明巨鲇单独成一支, 与纹胸鲃属相接近, 这一结果与传统的形态学分类基本相似. 本实验结果为继续研究其他鲢科鱼类的系统发育提供了有价值的参考资料.

参考文献:

- [1] 陈小勇. 云南鱼类名录 [J]. 动物学研究, 2013, 34(4): 281-343.
- [2] 刘跃天, 田树魁, 冷云, 等. 野生巨鲇生物学特性研究 [J]. 现代农业科技, 2010(18): 302-303, 307.
- [3] 田树魁, 薛晨江, 冷云, 等. 巨鲇的生物学特性初步研究 [J]. 水生态学杂志, 2009, 30(3): 115-117.
- [4] 冷云, 田树魁, 刘跃天, 等. 巨鲇食性初步研究 [J]. 现代农业科技, 2011(19): 329-330.
- [5] 薛晨江, 张正雄, 马建颜, 等. 巨鲇人工繁殖初报与胚胎发育观察 [J]. 水生态学杂志, 2012, 33(5): 54-56.
- [6] 薛晨江, 罗永新, 雷春云, 等. 巨鲇苗种培育阶段斜管虫病的防治 [J]. 科学养鱼, 2014(3): 65-66.
- [7] 薛晨江, 薛邵伟, 雷春云, 等. 巨鲇胚胎发育研究 [J]. 现代农业科技, 2015(6): 264-269.
- [8] 陈四海, 区又君, 李加儿. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展 [J]. 生物技术通报, 2011(3): 13-20.
- [9] 吕国庆, 李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展 [J]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 94-99.
- [10] 袁娟, 张其中, 罗芬. 鱼类线粒体 DNA 及其在分子群体遗传研究中的应用 [J]. 生态科学, 2008, 27(4): 272-276.
- [11] 杜民, 牛宝珍, 贾梦应, 等. 巨鲇线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 基因克隆及多态性分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2017, 39(5): 83-89.
- [12] 韩家波, 赫崇波, 王强, 等. 辽东湾斑海豹线粒体 *ND4*、*tRNA-Arg*、*ND4L* 和 *ND3* 基因序列分析 [J]. 水产科学, 2006, 25(10): 500-504.
- [13] 陈瑜, 吴夏, 彭正松, 等. 四川黑熊 *ND3*、*ND4L* 和 *tRNA-Arg* 基因的克隆和序列分析 [J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2007, 30(3): 398-401.
- [14] 张四明, 张亚平, 郑向忠, 等. 12 种鲟形目鱼类 mtDNA *ND4L-ND4* 基因的序列变异及其分子系统学 [J]. 中国科学, 1999, 29(6): 607-614.
- [15] 杜民, 牛宝珍, 王婷婷, 等. 巨鲇鱼细胞色素氧化酶基因多态性及系统进化研究 [J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(3): 337-343.
- [16] DU M, ZHOU C J, NIU B Z, et al. The Complete Mitochondrial Genome of the *Bagarius yarrelli* from Honghe River [J]. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 2016, 41: 12031.
- [17] 肖海, 代应贵, 张晓杰, 等. 我国鲢科鱼类种质资源研究进展 [J]. 广东农业科学, 2010, (37)8: 180-182.
- [18] 郭宪光. 中国鲢科鱼类分子系统发育和石爬鲃属物种有效性的研究 [D]. 重庆: 西南师范大学, 2003.
- [19] 王伟, 李默怡, 何舜平. 中国鲢科鱼类 RAPD 分析及鳊鲃鱼类单系性的初步研究 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(1):

92—94.

- [20] 周用武, 庞峻峰, 周 伟, 等. 鲢科褶鲢属鱼类部分线粒体 DNA 序列分析与分子进化 [J]. 西南林学院学报, 2007, 27(3): 45—51.
- [21] HE Shun-ping, CHEN Yong-jiu, ZHANG Ya-ping. Preliminary Study on Mitochondrial Cytochrome b DNA Sequences and Phylogeny of Formalin Fixed Sisorid Fishes (Teleostei: Siluriformes) [J]. Zoological Research, 1999, 20(2): 81—87.

Cloning and Polymorphism Analysis of Mitochondrial *ND3*, *tRNA-Arg* and *ND4L* Genes of *Bagarius yarrelli*

DU Min^{1,2}, YE De-lai^{1,2}, NIU Bao-zhen^{1,2}, DUAN Jia-ming^{1,2},
YUE Ran^{1,2}, SONG Tao-wen^{1,2}, WANG Wen-tao^{1,2}, LIU Yan-hong^{1,2}

1. Key Lab for Quality, Efficient Cultivation and Security Control of Crops in Colleges and Universities of Yunnan Province, Honghe University, Mengzi Yunnan 661199, China;
2. College of Life Science and Technology, Honghe University, Mengzi Yunnan 661199, China

Abstract: In order to understand the situation of the germplasm resources of *Bagarius yarrelli*, PCR was used for amplification, cloning and sequencing, and 12 NADH dehydrogenase subunit-3 (*ND3*) sequences, 12 *tRNA-Arg* sequences and 12 NADH dehydrogenase subunit-4 L (*ND4L*) sequences of *B. yarrelli* were obtained. DNAMAN 5.2.2 software was applied for sequence alignment, and MEGA 5.02 software was used to analyze base content and genetic distance, and to construct a phylogenetic tree. The full-length of *ND3* gene sequence of *B. yarrelli* was shown to be 346 bp, the start codon was ATG while the stop codon was T—, the content of A, T, C and G was 26.2%, 29.6%, 28.8% and 15.4%, respectively, in which the A+T content (55.8%) was higher than that of G+C (44.2%). There were 5 haplotypes in the 12 sequences of *ND3* gene, and 5 transitions and 1 transversion occurred. The average relative genetic distance was 0.007 between the 5 haploid types. The full-length of *tRNA-Arg* gene sequence of *B. yarrelli* was 71 bp, the content of A, T, C and G was 23.9%, 23.9%, 29.6% and 22.6%, respectively, in which the A+T content (47.8%) was lower than that of G+C (52.2%). There was only one haploid type between the 12 *tRNA-Arg* gene sequences. The full-length of *ND4L* gene sequence of *B. yarrelli* was 297 bp, the start codon was ATG while the stop codon was TAA. The content of A, T, C and G was 24.6%, 26.3%, 33.3% and 15.8%, respectively, in which the A+T content (50.9%) was higher than that of G+C (49.1%). The 12 gene sequences were completely consistent with each other. A phylogenetic tree was constructed through the minimum evolution (ME) method based on 10 species of Sisoridae and the 12 sequences of *ND3* gene of *B. yarrelli*, and the results indicated that *B. yarrelli* in this study clustered into a single clad, which was similar to the traditional morphological classification.

Key words: *Bagarius yarrelli*; *ND3*; *tRNA-Arg*; *ND4L*; sequence analysis; phylogeny

