

牛宝珍,杜 民,刘艳红,等. 巨鲶线粒体 DNA *ND6* 基因克隆及多态性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):62–65.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2016.04.016

巨鲶线粒体 DNA *ND6* 基因克隆及多态性分析

牛宝珍,杜 民,刘艳红,白 莉,艾家灵

(红河学院生命科学与技术学院/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)

摘要:利用 GenBank 数据库中鲢科鱼线粒体 *ND6* 基因序列保守区设计引物,采用 PCR 技术克隆并测序,共得到 12 尾巨鲶 *ND6* 基因全序列。用 DNAMAN 5.0 软件比对序列,MEGA 5.0 软件分析鲢科不同鱼类的进化关系,结果表明:巨鲶 *ND6* 基因序列全长为 516 bp,碱基含量分别为 14.20%、34.50%、40.20%、11.00%,其中“A+T”含量(54.40%)高于“G+C”含量(45.50%),存在 4 个单倍型,发生 3 次颠换;12 个个体 4 个单倍型间的平均相对遗传距离为 0.003;将巨鲶与其他 14 种鱼类的 *ND6* 基因用 Neighboring-joining (NJ) 法构建系统发育树,发现巨鲶单独聚为 1 支。研究将为今后鱼类线粒体基因组的研究提供科学依据。

关键词:巨鲶;线粒体;*ND6* 基因;多态性;系统进化

中图分类号:S917.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002–1302(2016)04–0062–04

巨鲶(*Bagarius yarrelli* Sykes)是云南省特有鱼类,主要分布于元江、澜沧江、怒江流域,属于鲇形目(Siluriforme)鲢科(Sisoridae)鲶属(*Bagarius*)。巨鲶个体很大,体质量约 50 kg,全身无鳞,皮肤表面布满细密的微小颗粒物,使其皮肤极为粗糙,此外其体表无黏液,身体背面颜色为灰黄色,腹面为白色,肌肉为黄色,所以又称“黄鱼”^[1]。巨鲶为底栖肉食性鱼类,具有口宽、上下颌都有齿带、牙齿呈锥形且排列紧密、鳃耙粗短、胃大、肠短等特点,主要食物为鱼类、虾、泥鳅、水生昆虫^[2]。田树魁等通过比较巨鲶、叉尾鲶、斑点叉尾鲶 3 种鱼肌肉中常规营养成分和氨基酸含量,发现巨鲶肌肉中蛋白质、粗脂肪和必需氨基酸的含量比常规鱼类高,是一种具有较高营养价值的有待驯养开发的野生鱼类^[3]。杜民等研究表明,野生巨鲶具有较高的遗传多样性^[4]。但是由于地理环境的改变和人为因素的影响,野生可利用的巨鲶资源越来越少。为了保护该鱼类,薛晨江等开展了巨鲶的人工驯养,并取得初步成功^[5]。

鱼类线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 是细胞核外(细胞质中)具有转录、自主复制和翻译能力的共价闭环状双链 DNA^[6]。鱼类的 mtDNA 主要包括 37 个基因(22 个 tRNA 编码基因、13 个疏水蛋白基因、2 个 rRNA 基因);其中 13 个疏水蛋白基因编码的多肽中包含了 7 个氢化辅酶 I (nicotinamide adenine dinucleotide hydrogen, NADH) 脱氢酶的亚单位(ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6)。ND6 蛋白编码基

因位于 L 链上,处于细胞色素 b 与 ND4 之间的连续区域,是线粒体内膜呼吸链的重要组成成分^[7]。在氢化辅酶中,由于 *ND6* 基因序列不易发生变异,进化速度一般,且基因片段不长,因此常用来研究物种的遗传多样性、种群之间的亲缘关系以及系统进化关系^[8]。方月琴等用复合扩增体系,选择线粒体 *ND6* 基因进行种属鉴定,结果表明,该方法可以将 13 种不同的动物区分开来^[9]。也有研究表明,*ND6* 基因与人类疾病帕金森氏症等发生有关^[10],*ND6* 基因还被用于研究鸟类的亲缘关系^[11],但是大多应用于鱼类群体和亚种间的遗传变异研究^[12–13]。对巨鲶的线粒体 *ND6* 基因全序列进行检测分析,进而分析巨鲶遗传结构、变异及与其他物种之间的同源差异,可为今后巨鲶鱼种研究提供一定的试验数据与理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究采用的 12 尾巨鲶采自云南省河口县。剪取肌肉组织放于 1.5 mL EP 管中,贴上对应标签,再加入无水乙醇,于 4 ℃ 保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取及多态性引物筛选 DNA 的提取参考 Sambrook 等的酚/氯仿抽提法^[14]。用凝胶成像系统观察、照相记录后,将提取的 DNA 贮存在 –20 ℃ 冰箱中备用。

根据 GenBank 数据库中已公布的鲢科巨鲶鱼线粒体基因组 *ND6* 基因序列(登录号:NC_021606, JQ026260),用 Primer Premier 5 软件设计简并引物:上游引物:5′–GCACCT–CAGAAKGATATTGWCCTC–3′;下游引物:3′–TYTAAA–CAGCCGAAGCGC MC–5′,在 PCR 扩增仪上进行扩增,反应体系见表 1。

PCR 反应条件:94 ℃ 4 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 50 s,72 ℃ 90 s,30 个循环;72 ℃ 延伸 6 min;4 ℃ 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶在 120 V 电压下电泳 35 min,最后通过凝胶成像系统得到 PCR 产物条带并照相。

收稿日期:2015–11–12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31360638);云南省中青年学术带头人后备人才项目(编号:2015HB059);云南省教育厅科学研究基金重大专项(编号:ZD2013009);红河学院中青年学术带头人后备人才项目(编号:2014HB0203);红河学院博士专项(编号:14bs11)。

作者简介:牛宝珍(1979—),女,湖北枣阳人,硕士研究生,实验员,主要从事水生生物资源研究。E-mail:niu2011bao@126.com。

通信作者:杜 民,博士,副教授,主要从事水生生物技术与资源研究。E-mail:du2005min@126.com。

表 1 巨鲈鱼 ND6 基因 PCR 反应体系

试剂	体积(μL)
2 × Taq PCR Master Mix	25.0
上游引物(10 pmol/μL)	2.0
下游引物(10 pmol/μL)	2.0
DNA(80 ng/μL)	2.0
ddH ₂ O	19.0
合计	50.0

检测后的 PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外分析仪下切下目的片段,用 DNA 凝胶回收试剂盒(天根生物科技有限公司)进行回收纯化,具体步骤参照回收试剂盒说明书进行。

1.2.2 目的 DNA 片段的连接与转化 用 pMD18-T 载体与目的 DNA 进行连接、转化,具体步骤参照载体连接试剂盒说明书进行,用 LB 培养基进行扩大养后用 M13 进行阳性克隆筛选,送交南京金斯瑞科技生物公司测序。

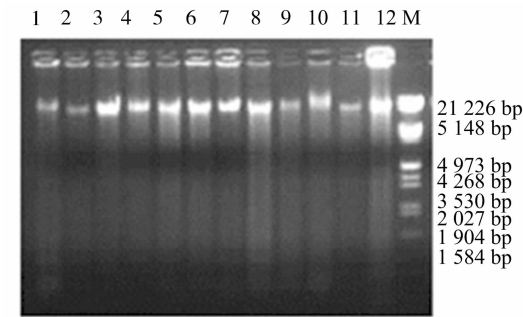
1.3 数据分析

利用 DNAMAN 5.0 软件将测得的巨鲈线粒体 ND6 基因部分序列与参照物种 ND6 基因部分序列进行比对。利用 MEGA 5.0 软件中的 Kimura2-parameter 方法计算遗传距离,采用邻接法(Neighbor-Joining, NJ)中的 Maximum Composite Likelihood 法构建系统发育树,通过自举检验(Bootstrap)获得系统分支的置信度(重复 1 000 次)。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取

从巨鲈鱼鳍条或肌肉提取 DNA,结果见图 1。可以看出, DNA 条带清晰。



M为λDNA/Hind III marker, 1~12为12尾巨鲈的编号;下同
图1 12尾巨鲈鱼 DNA 电泳检测结果

2.2 引物退火温度的优化

用设计的 Bayam18 引物退火温度的 ±10 ℃ 范围进行梯度 PCR(图 2),所用 marker 为 BM2000, Bayam18 引物的退火温度梯度见表 2。由图 2 可知, Bayam18 号引物能扩增出条带的温度为 55、55.6、56.4、57.5、59.2、60.7、61.9 ℃,根据条带明亮度,初步确定 Bayam18 引物最适的退火温度。

2.3 扩增产物与 DNA 回收

利用凝胶回收试剂盒对 PCR 产物(图 3)进行回收,回收产物(图 4)于 -20 ℃ 保存。

2.4 菌液退火温度优化

通过梯度 PCR 优化 M13 通用引物的退火温度(图 5)。M13 通用引物序列见表 3,退火温度梯度见表 4。由图 5 可

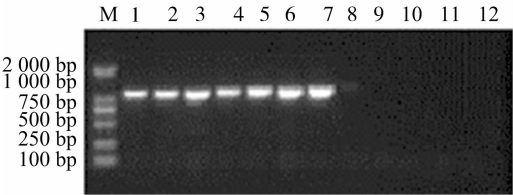


图2 Bayam18 引物退火温度优化结果

表 2 梯度 PCR 优化 Bayam18 引物退火温度

泳道序号	温度梯度(℃)
1	55.0
2	55.6
3	56.4
4	57.5
5	59.2
6	60.7
7	61.9
8	63.3
9	64.8
10	65.8
11	66.5
12	67.0

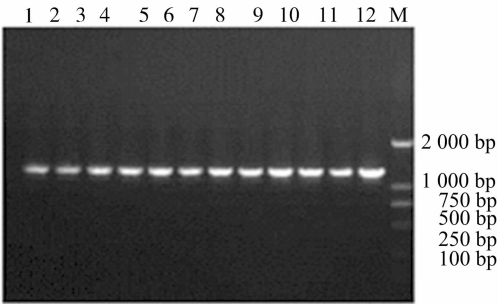


图3 PCR 扩增结果

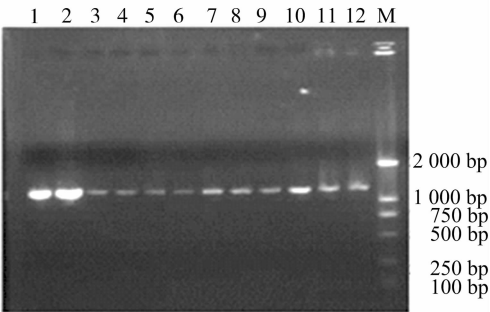


图4 PCR 产物回收结果

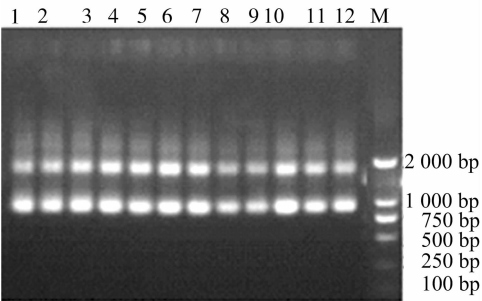


图5 M13 引物退火温度优化结果

知, M13 通用引物在每个泳道都扩增出了明亮条带。

表 3 M13 引物序列

M13F(-47)	M13R primer NEW
5' - CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC -3'	3' - GAGCGGATAACAATTCACACAGG -5'

表 4 梯度 PCR 优化 M13 引物的退火温度

泳道序号	温度梯度(℃)
1	45.0
2	46.0
3	47.3
4	49.3
5	51.9
6	54.4
7	56.5
8	58.8
9	61.3
10	63.2
11	64.2
12	65.0

2.5 巨鲉鱼 ND6 基因序列的碱基含量

本试验中,利用下载序列通过 DNAMAN 5.0 软件对比排位,得到 ND6 基因片段长度 516 bp,12 条序列中发现 4 个单倍型,其中 6 号、7 号、11 号个体序列相同,为 1#单倍型;1 号、3 号、4 号、5 号、8 号、9 号、12 号个体序列相同,为 2#单倍型;10 号个体为 3#单倍型;2 号个体为 4#单倍型。采用 MEGA 5.0 软件计算它们的碱基组成(表 5),可以得出 T、C、A、G 4 种碱基含量分别为 14.10%、34.80%、40.10%、11.00%,其中“A+T”含量(54.20%)高于“G+C”含量(45.80%)。

2.6 巨鲉鱼 ND6 基因 12 个个体的相对遗传距离

用 MEGA 5.0 软件中的双参数法,通过转换加颠换、转换

比颠换分别计算 12 个个体之间的相对遗传距离^[15],详见表 6。由表 6 可知,12 个个体的 4 个单倍型之间的差异(转换加颠换)为 0.002~0.004。

表 5 巨鲉 ND6 序列碱基含量

单倍型	含量(%)						总长 (bp)
	T	C	A	G	A+T	G+C	
Baya - ND6 - 1	14.10	34.70	40.10	11.00	54.20	45.70	516
Baya - ND6 - 2	14.10	34.70	40.10	11.00	54.20	45.70	516
Baya - ND6 - 3	14.00	34.90	40.10	11.00	54.10	45.90	516
Baya - ND6 - 4	14.00	34.90	40.10	11.00	54.10	45.90	516
平均值	14.10	34.80	40.10	11.00	54.20	45.80	516

表 6 12 条巨鲉鱼线粒体 ND6 遗传距离

单倍型	Baya - ND6 - 1	Baya - ND6 - 2	Baya - ND6 - 3	Baya - ND6 - 4
Baya - ND6 - 1	0.000			
Baya - ND6 - 2	0.000	0.000		
Baya - ND6 - 3	0.002	0.002	0.000	
Baya - ND6 - 4	0.002	0.002	0.004	0.000

注:数据是转换加颠换结果。

2.7 基于 ND6 基因构建系统发育树

将巨鲉鱼 ND6 基因与其他 14 物种(表 7)进行比对,用 MEGA5.0 软件构建系统发育树^[16-17],从图 6 可以看出,系统发育树分为两大支,巨鲉单独聚为 1 支。

表 7 14 个鲷科种类及登录号

物种	属名	登录号
大鳍异齿鳐(<i>Oreoglanis macropterus</i>)	异齿鳐属(<i>Oreoglanis</i>)	NC_021607
黄斑褶鲢(<i>Pseudecheneis suLcata</i>)	褶鲢属(<i>Pseudecheneis</i>)	NC_021605
云南拟鳐(<i>Pseudexostoma yunnanensis</i>)	拟鳐属(<i>Pseudexostoma</i>)	NC_021604
细尾鲢(<i>Pareuchiloglanis gracilicaudata</i>)	鲢属(<i>Pareuchiloglanis</i>)	NC_021603
安氏凿齿鲢(<i>Glaridoglanis andersonii</i>)	凿齿鲢属(<i>Glaridoglanis</i>)	NC_021600
扁头离鲢(<i>Creteuchiloglanis kamengensis</i>)	离鲢属(<i>Creteuchiloglanis</i>)	NC_021599
黄石爬鲢(<i>Euchiloglanis kishinouyei</i>)	石爬鲢属(<i>Euchiloglanis</i>)	NC_021598
黑斑原鲢(<i>Glyptosternon maculatum</i>)	原鲢属(<i>Glyptosternon</i>)	NC_021598
长丝黑鲢(<i>Gagata dolichonema</i>)	黑鲢属(<i>Gagata</i>)	NC_021597
藏鳐(<i>Exostoma labiatum</i>)	鳐属(<i>Exostoma</i>)	NC_021596
中华纹胸鲢(<i>Glyptothorax sinensis</i>)	纹胸鲢属(<i>Glyptothorax</i>)	NC_024672
中华鲢(<i>Pareuchiloglanis sinensis</i>)	鲢属(<i>Pareuchiloglanis</i>)	NC_024434
福建纹胸鲢(<i>Glyptothorax fokiensis</i>)	纹胸鲢属(<i>Glyptothorax</i>)	NC_018769
三线纹胸鲢(<i>Glyptothorax trilineatus</i>)	纹胸鲢属(<i>Glyptothorax</i>)	NC_021608

3 讨论与分析

本试验通过从 GenBank 数据库中查询已公布的鲷科巨鲉线粒体基因组中 ND6 基因序列保守区设计引物,采用 PCR 反应扩增、克隆及测序巨鲉 ND6 基因,共得到 12 条 ND6 基因全序列。对巨鲉线粒体 ND6 基因序列进行研究,得到 ND6 基因全序列长 516 bp。

利用 MEGA 5.0 软件分析对巨鲉鱼线粒体 ND6 基因 12

个个体进行分析,得到 T、C、A、G 这 4 种碱基含量分别为 14.10%、34.80%、40.10%、11.00%,其中“A+T”含量(54.20%)高于“G+C”含量(45.80%),说明 ND6 基因序列中富含碱基 A、T。共发现 4 个单倍型,3 个变异位点,都为单突变位点,表明 ND6 基因序列多态性贫乏,序列之间差异不大,这与赖瑞芳等比较鲂属鱼类线粒体基因组,研究鲂属鱼类系统发育的结果^[18]是一致的。ND6 基因序列共发生 3 次颠换,表明本研究的 4 个单倍型的 ND6 基因核苷酸变异类型以

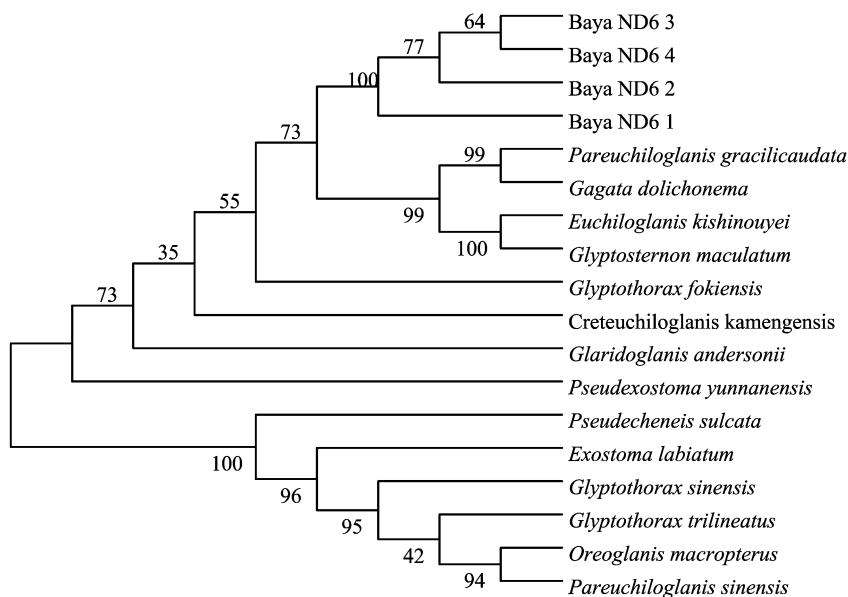


图6 基于14个鲃科 *ND6* 基因构建系统发育树

颠换为主。12 个个体的 4 个单倍型之间平均相对遗传距离为 0.003, 转换和颠换的比值为 0.667, 表明这 12 个个体之间亲缘性近, *ND6* 基因序列变异并不显著, 这与于美玲等对鲃科鱼类系统发育关系的研究结果^[19]一致。

此外, 由系统发育树可知, 系统发育树分为两大支, 其中巨鲃单独聚成 1 支, 置信值为 100%, 表明与其他 14 种鲃科鱼亲缘性远。另一支又分为 2 支, 分别是细尾鲃、长丝黑鲃先聚为 1 支, 黄石爬鲃、黑斑原鲃先聚为 1 支后, 这 4 个种类进而聚为一个大的分支后与本研究的 4 个巨鲃聚在一起。大鳍异齿鲃和中华鲃先聚为 1 支, 二者与三线纹胸鲃聚在一起后与中华纹胸鲃聚为 1 支, 再与藏鲃聚在一起, 然后与黄斑褶鲃聚为较大的分支。巨鲃单独聚成 1 支, 这与形态学分类结果与基于细胞色素 *b* (Cytochrome *b*)、*rpS7* 基因研究的遗传进化是一致的^[20-21]。本研究通过研究巨鲃鱼 *ND6* 基因序列多态性, 可为以后研究巨鲃与其他鱼类的亲缘性、系统进化等研究提供科学依据。

参考文献:

- [1] 田树魁, 薛晨江, 冷云, 等. 巨鲃的生物学特性初步研究[J]. 水生生态学杂志, 2009, 30(3): 115-117.
- [2] 冷云, 田树魁, 刘跃天, 等. 巨鲃食性初步研究[J]. 现代农业科技, 2011, 37(19): 329-330.
- [3] 田树魁, 易勇, 薛晨江, 等. 野生巨鲃肌肉营养成分测定和分析[J]. 淡水渔业, 2009, 39(3): 73-76.
- [4] 杜民, 牛宝珍, 罗彩艳, 等. 巨鲃野生群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 淡水渔业, 2015, 45(1): 15-19, 24.
- [5] 薛晨江, 张正雄, 马建颜, 等. 巨鲃人工繁殖初报与胚胎发育观察[J]. 水生生态学杂志, 2012, 33(5): 54-56.
- [6] 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): 95-104.
- [7] 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, 27(3): 13-20.
- [8] 海汀, 柴志欣, 张成福, 等. 西藏牦牛 mtDNA *ND6* 遗传多样性

- 及系统进化分析[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(11): 11-17.
- [9] 方月琴, 顾准, 侯一平. 线粒体基因种属鉴定复合扩增体系[J]. 盐城工学院学报: 自然科学版, 2012, 25(1): 19-24.
- [10] Piccoli C, Ripoli M, Quarato G, et al. Coexistence of mutations in PINK1 and mitochondrial DNA in early onset Parkinsonism[J]. Journal of Medical Genetics, 2008, 45(9): 596-602.
- [11] 陈晓芳, 王翔, 袁晓东, 等. 鸮形目 15 种鸟类线粒体 *ND6* 基因序列差异及其系统进化关系[J]. 动物学报, 2003, 49(1): 61-66.
- [12] 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.
- [13] 郭新红, 刘少军, 刘巧. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 983-1000.
- [14] Sambrook J, Fitch E, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 1024-1031.
- [15] Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(30): 11030-11035.
- [16] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [17] Dopazo J. Estimating errors and confidence intervals for branch lengths in phylogenetic trees by a bootstrap approach[J]. Journal of Molecular Evolution, 1994, 38(3): 300-304.
- [18] 赖瑞芳, 张秀杰, 李艳和, 等. 鲂属鱼类线粒体基因组的比较及其系统发育分析[J]. 水产学报, 2014, 38(1): 1-14.
- [19] 于美玲, 何舜平. 鲃科鱼类系统发育关系分析及其分歧时间估算[J]. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(4): 277-285.
- [20] 周伟, 李旭, 杨颖. 中国鲃科鳊群系统发育与地理分布格局研究进展[J]. 动物学研究, 2005, 26(6): 673-679.
- [21] 李旭. 中国鲃形目鲃科鳊群鱼类的系统发育及生物地理学分析[D]. 昆明: 西南林业大学, 2006.