

曹善茂,朱丽洁,聂鸿涛,等. 基于 16S 和 *COI* 基因探讨岩扇贝在扇贝科中的分类地位[J]. 江苏农业科学,2019,47(7):28-31.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.07.007

基于 16S 和 *COI* 基因探讨岩扇贝在扇贝科中的分类地位

曹善茂¹, 朱丽洁¹, 聂鸿涛², 印明昊³, 刘 钢¹, 邹建威¹, 王 尧¹

(1. 大连海洋大学/辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 辽宁大连 116023;

2. 大连海洋大学水产与生命学院/辽宁省贝类良种繁育工程技术研究中心, 辽宁大连 116023; 3. 辽宁省大连市海洋与渔业局, 辽宁大连 116023)

摘要:采用 PCR 扩增和序列测定等技术,对岩扇贝(*Crassadoma gigantea*)线粒体 DNA 16S rRNA 和 *COI* 基因片段进行初步研究,得到 16S rRNA 基因片段的大小在 613.0 ~ 634.0 bp 之间,A、T(U)、G、C 的平均含量分别为 26.5%、29.7%、24.5%、19.3%;*COI* 基因片段的大小为 660 bp,碱基 A、T、G、C 的平均含量分别为 17.2%、40.3%、27.2%、15.3%。16S 基因在岩扇贝中偏好使用 GUU、UUG、AUU、ACG、UAU、CAA、GAG、UUU、UCU、GAU、GGU、GAG、AGG 和 GGA 等 25 个密码子。*COI* 系统进化树表明,与岩扇贝亲缘关系最近的是栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*),其次是冰岛扇贝(*Chlamys islandica*)。16S 系统进化树亲缘关系由近到远依次是北美扇贝(*Patinopecton caurinus*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、*Chlamys islandica*。

关键词:岩扇贝;*COI* 基因;16S rRNA;密码子偏好性;系统进化树分析

中图分类号: S917.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)07-0028-04

岩扇贝(*Crassadoma gigantea*)隶属于软体动物门、瓣鳃纲、珍珠目、扇贝科。原产于北美洲太平洋沿岸海域,广泛分布于美国的阿拉斯加,加利福尼亚半岛以及墨西哥湾附近。该贝具有闭壳肌大、肉质鲜美、风味独特、生长速度快、对环境适应能力强等优点,2013 年大连海洋大学科研人员从加拿大温哥华岛引进岩扇贝成贝,在辽宁省沿海各地进行人工育苗和人工养殖,并对其进行了人工育苗技术和幼贝摄食生理等研究^[1-3]。国外学者对岩扇贝的营养成分、口味、冷藏肉质的稳定性、野生种群的生长速率、排精产卵机制、幼贝的饵料配比、附着生理、胚胎发育等方面进行了研究^[4-9]。日常岩扇贝通过岩扇贝壳型、颜色等形态特征进行分类,比较而言应用分子生物学的分析方法对岩扇贝的分类及鉴定较少。Bernard 建立了包含必须以固着而生的岩扇贝的岩扇贝属(*Crassadoma*)^[10]。Waller 扩展了岩扇贝属的范围,包含其他固着和非固着的 Hinnites 种,并创造了包括 *Caribachlamys* 属在内的 *Crassadomina*^[11]。可见岩扇贝在扇贝科下的亲缘关系并不明确,Saavedra 等研究了岩扇贝与太平洋部分扇贝和加勒比海扇贝的进化关系^[12]。本研究在其基础上增加国内经济贝类,如栉孔扇贝、虾夷扇贝等,应用 DNA 条形码技术进行进一步的研究。DNA 条形码是利用足够变异的标准化短基因片段构建物种的鉴别体系,具有对物种进行快速、准确鉴定的新生物身份识别的优势^[13-15]。本研究采用 PCR 扩增和序

列测定技术,对岩扇贝线粒体 DNA 16S rRNA 和 *COI* 基因片段进行初步研究,进一步证实岩扇贝在扇贝科中的分类地位及亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 试验材料

岩扇贝于 2016 年 11 月取自辽宁省旅顺河口养殖基地,鉴定后活体解剖取扇贝闭壳肌于液氮冷冻后转 -80 ℃超低温冰箱保存备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取和检测 随机选取岩扇贝 2 个,取大约 30 mg 闭壳肌组织,尽量剪碎,用 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,并溶解于 100 μL Tris-EDTA 缓冲 buffer(TE 溶液)中,用紫外分光光度计测定其浓度和纯度,然后将基因组 DNA 稀释至 50 ng/μL,4 ℃下保存备用。

1.2.2 PCR 扩增及测序 本试验使用 *COI* 和 16S 引物序列进行 PCR 扩增(表 1),所有 PCR 反应均采用预混合酶试剂(premix),配制 10 μL 体系,在 PTC-100 型 PCR 仪上进行反应。PCR 反应程序为 94 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 30 s,16S 变性 1 min,*COI* 和 16S 分别 48 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,共运行 35 个循环;最后 1 个循环结束后 72 ℃再延伸 5 min。PCR 产物用含有溴化乙锭的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像系统观察、照相。用 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司生产]纯化后,进行双向测序。

1.2.4 数据处理 本试验选取 2 个岩扇贝个体进行测序,所获原始序列首先与其对应峰图对比检查,以确认序列质量;每个个体测得正反向序列并用 BioEdit 软件进行拼接,结合人工校正;在 NCBI 数据库中进行 Blast 比对分析,确定序列准确

收稿日期:2017-11-29

基金项目:辽宁省海洋与渔业厅项目(编号:201214);辽宁省大连市海洋与渔业局项目(编号:2012011)。

作者简介:曹善茂(1960—),男,山东烟台人,副教授,主要从事海洋贝类繁育、水域生态研究。E-mail:caoshm@dlou.edu.cn。

通信作者:聂鸿涛,博士,副研究员,主要从事贝类分子遗传学研究。

E-mail:htnie@dlou.edu.cn。

表 1 本试验引物序列

基因	引物名称	序列(5'→3')
mt <i>COI</i>	<i>COI</i> - F	ATYGGNGGNTTYGGNAAATG
	<i>COI</i> - R	ATNGCRAANACNGCNCCYAT
mt16S	16Sar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT
	16Sbr	CCGGTCTGAAGTACATCACGT

性。下载扇贝科下物种序列^[16],应用 MEGA 7 软件检查平均一致度估测联配结果的可信度;计算 16S 的种内遗传距离;基于 *COI* 和 16S rDNA,应用邻接树(neighbor joining,简称 NJ)法分别重建系统发生树;运用 MEGA 7 软件 Codonusage 功能计算同义密码子出现的次数及使用度^[17],16S 基因密码子偏好性分析,同义密码子使用度(RSCU)计算公式为

$$RSCU_{ij} = \frac{x_{ij}}{x} = \frac{x_{ij}}{\frac{1}{n_i} \sum_{j=1}^{n_i} x_{ij}}。$$

式中: x_{ij} 表示编码第*i*个氨基酸的第*j*个密码子的出现次数; n_i 表示编码第*i*个氨基酸的同义密码子数量(其值为 1~6)。当密码子的 RSCU 值等于 1 时,表示该密码子没有偏好性;当

表 2 16S 在岩扇贝 12 个个体扩增后的 A、T、G、C 含量

个体编号	含量(%)				片段长度 (bp)
	T(U)	C	A	G	
<i>Crassadoma gigantea</i> - 10	31.2	16.9	24.9	27.0	634.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 9	24.9	27.0	31.1	17.0	634.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 8	31.4	16.6	25.0	27.0	627.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 7	25.3	27.0	31.0	16.6	625.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 6	30.9	17.0	24.9	27.1	634.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 5	31.5	16.5	25.0	27.1	613.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 4	30.9	16.6	25.3	27.2	625.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 3	31.1	17.0	24.9	27.0	634.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 2	25.0	27.1	31.2	16.7	628.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 1	31.0	16.6	25.3	27.0	625.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 12	31.6	16.5	24.8	27.1	617.0
<i>Crassadoma gigantea</i> - 11	31.7	16.6	24.7	27.0	615.0
平均值	29.7	19.3	26.5	24.5	625.9

2.2 系统发育树的物种鉴定

本试验选取珍珠贝科马氏珠母贝、牡蛎科长牡蛎、莺蛤科白斑珍珠蛤作为外群,在 *COI* 和 16S 进化树中 *C. gigantea* 单独聚为 1 支,马氏珠母贝(*Pinctada martensi*),白斑珍珠蛤(*Pinctada maculata*)聚为 1 支。*COI* 进化树的 p-distance < 0.8,16S 序列的 Jukes-Cantor 分析值为 0.246,这 2 个值分别说明 *COI* 和 16S 所选序列适合构建 NJ 树。*COI* 的 NJ 树表明,*C. gigantea* 进化依次接近于栉孔扇贝(*Azumapecten farreri*),冰岛扇贝(*Chlamys islandica*),北美扇贝(*Patinopecten caurinus*),虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*),其中后三者聚为 1 支(图 1)。16S 的 NJ 树表明,岩扇贝 5 个序列形成具有较高支持度的单分支且依次接近于北美扇贝(*Patinopecten caurinus*)、虾夷扇贝(*Mizuhopecten yessoensis*)、*Chlamys islandica*(图 2)。扇贝科的 5 个属,其中类栉孔扇贝属的华贵栉孔扇贝(*Mimachlamys nobilis*)单独聚为 1 支;海湾扇贝属的海湾扇贝(*Argopecten irradians*)、紫扇贝(*A. purpuratus*)、*A. ventricosus* 聚为 1 支;栉孔扇贝属的 *C. farreri*、*A. farreri* 和 *S. livida* 为 1 支;掌扇贝属的平濞掌扇贝(*Volachlamys hirasei*)、新加坡掌扇贝(*V. singaporina*)聚为 1 支;盘扇贝属的 *M.*

密码子的 RSCU 值小于 1 时,表示该密码子使用较少;当密码子的 RSCU 值大于 1 时,表示该密码子使用较多^[18]。

2 结果与分析

2.1 岩扇贝 *COI* 和 16S 的 DNA 序列组成

本研究对岩扇贝的 *COI* 和 16S 基因进行 PCR 扩增,得到清晰的基因片段扩增产物,纯化后直接进行双向序列测定,经过比对和校正后提交 GenBank 数据库。测序结果表明,*COI* 基因片断大小为 660 bp,序列的 A、T、G、C 平均含量分别为 17.2%、40.3%、27.2%、15.3%,其中 A+T 的含量(57%)明显高于 G+C 的含量(42%);16S 基因片段大小为 613.0~634.0 bp(不包含引物),序列 A、T(U)、G、C 平均含量分别为 26.5%、29.7%、24.5%、19.3%(表 2),其中 A+T(U)的含量(56.2%)高于 G+C 的含量(43.8%)。*COI* 和 16S 碱基均出现偏倚性,符合线粒体碱基组成的特点。将研究中测定及下载的所有 16S 序列进行整理,并裁剪为同一长度 529 bp 进行分析,其保守位点 153 个,变异位点 369 个,简约信息位点 315 个,单独位点 54 个。

yessoensis、*P. caurinus* 聚为 1 支,聚类结果基本与传统的分类结果一致。

2.3 岩扇贝中 16S 基因的密码子偏好性

16S 在岩扇贝中扩增偏向使用以 U 或 G 结尾的密码子,总使用度分别为 12.76、8.02。其中 GUU、UUG、AUU、ACG、UAU、CAA、GAG、UUU、UCU、GAU、GGU、GAG、AGG 和 GGA 等 25 个密码子的 RSCU 值均大于 1,其中 GUU 的 RSCU 值大于 2,为 16S 在岩扇贝中偏好性使用次数最多的(表 3)。

3 讨论

孔晓瑜等做了栉孔扇贝和海湾扇贝线粒体 16S rRNA 基因片段的比较研究,A+T 的含量分别为 54.73%、55.17%^[18]。胡丽萍等在紫扇贝和海湾扇贝中扩增 16S,获得基因片段长度均为 542 bp,紫扇贝和海湾扇贝的碱基组成 A+T 所占比例分别为 54.2%、55.1%^[19]。朱立静等对四角蛤蜊 *COI* 基因的研究表明,四角蛤蜊的 G+C 含量明显低于 A+T 含量^[20];程汉良等对帘蛤目中 6 种贝类进行 *COI* 序列的扩增结果也表明,A+T 含量明显高于 G+C 含量^[21]。这与本研究中 *COI* 在岩扇贝中的扩增结果相似。一般认为,

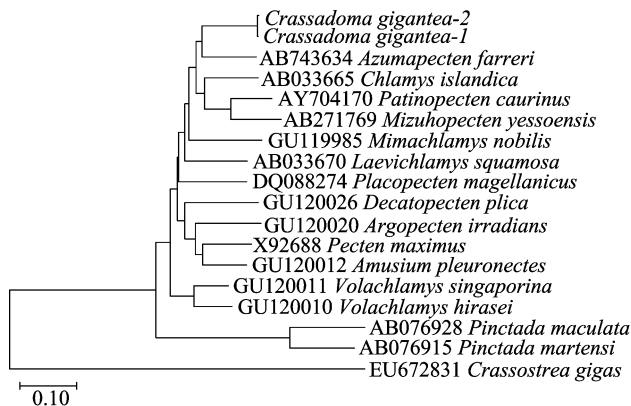
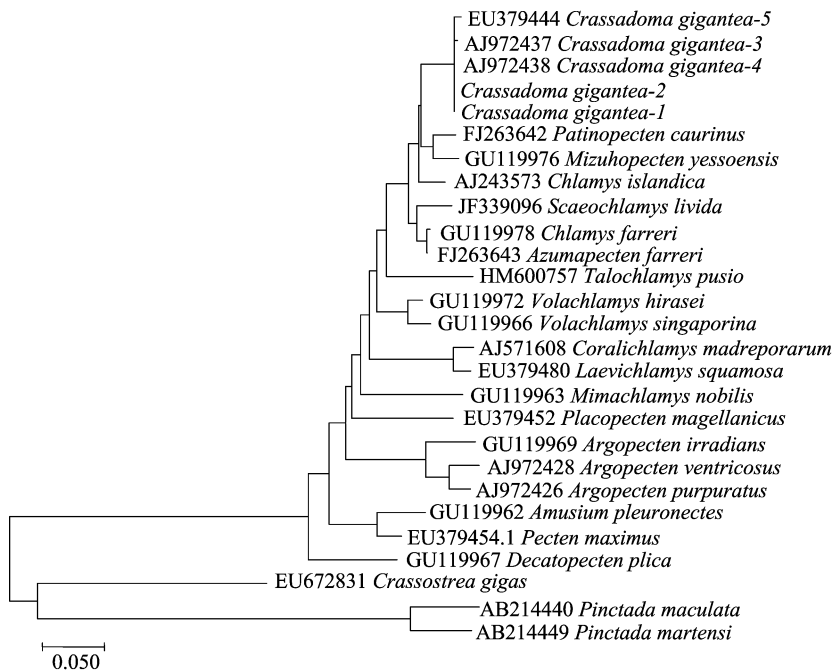
图1 基于 *COI* 构建扇贝科系统发育树

图2 基于 16S 构建扇贝科系统发育树

在线粒体基因组中,16S rRNA 基因进化速率低,比较保守,而 *COI* 基因为变异性较大的区域,在不少无脊椎动物中检测到了较大的变异^[22-23]。从本试验结果可以看出,在剪裁为 529 bp 的 16S rRNA 片段中,其保守位点 153 个,变异位点 369 个,变异位点比例达到 69.8%,即岩扇贝种内变异率较高,原因可能是 16S 存在较高的碱基转换和颠换,这部分有待后续进行进一步讨论。

Thompson 等认为成对联配的氨基酸序列的平均一致性百分比太低时,多序列联配的结果准确性会下降,一致性百分比等于 1 减去 $p - distance$ ^[24]。当 $p - distance < 0.8$,联配结果是可接受的;当 $p - distance \geq 0.8$ 则是不可靠的。本试验 *COI* 的 $p - distance$ 为 0.746,对应的一致性为 25.4%,介于 20% 和 30% 之间的临界区域,氨基酸残基的联配正确率在 80% 左右,另一项研究表明,氨基酸联配的精确性大于 50% 时,它对系统进化树准确性的影响就微乎其微了,即该 *COI* 系统进化树是可信且可用的^[25]。同理,16S 序列的 Jukes - Cantor 分析值为 0.246,说明 16S 的 NJ 树可信且可用。

Saavedr 等分析表明, *C. gigantea* 进化上接近 *C.*

islandica, 其次是岩扇贝属的其他成员如 *Crassadoma multistriata*、*Mimachlamys varia*^[12]。在本试验 16S 的 NJ 树中, *C. gigantea* 更接近 *P. caurinus* 和 *M. yessoensis*, 其次是 *C. islandica*, 在 *COI* 的 NJ 树中更接近于 *A. farreri*, 2 个 NJ 树不一致的原因可能是 2 个基因片段剪裁序列的长度不同导致联配一致度不同。Feng 等研究表明,在 *COI* 进化树中芬香海扇蛤 (*D. plica*)、大海扇蛤 (*P. maximus*)、*A. pleuronectes*、*A. irradians* 聚为 1 支,在 16S 进化树中 *Pecten maximus*、*Amusium pleuronectes*、*Argopecten irradians* 和其他扇贝聚为 1 支而 *Decatopecten plica* 单独聚为 1 支^[16]。

参考文献:

- [1] 曹善茂,汪 健,王 谦,等. 岩扇贝人工育苗的初步研究[J]. 大连海洋大学学报,2017,32(1):1-6.
- [2] 曹善茂,王 昊,陈 炜,等. 岩扇贝闭壳肌营养成分的分析及与中国 3 种扇贝的比较[J]. 大连海洋大学学报,2016,31(5):544-550.
- [3] 曹善茂,梁伟锋,汪 健,等. 岩扇贝幼贝滤食率的基础研究[J].

表 3 岩扇贝 16S 同义密码子使用度 (RSCU)

密码子	总数	同义密码子使用度	密码子	总数	同义密码子使用度	密码子	总数	同义密码子使用度	密码子	总数	同义密码子使用度
UUU(F)	6.5	1.30	UCU(S)	4.3	1.39	UAU(Y)	2.3	1.65	UGU(C)	1.8	0.54
UUC(F)	3.5	0.70	UCC(S)	2.4	0.78	UAC(Y)	0.5	0.35	UGC(C)	4.8	1.46
UUA(L)	2.8	0.78	UCA(S)	2.4	0.78	UAA(*)	7.9	1.16	UGA(*)	7.5	1.10
UUG(L)	7.3	1.99	UCG(S)	3.0	0.96	UAG(*)	5.0	0.73	UGG(W)	0.8	1.00
CUU(L)	2.8	0.76	CCU(P)	1.5	0.88	CAU(H)	4.0	1.33	CGU(R)	1.8	1.00
CUC(L)	4.8	1.31	CCC(P)	2.3	1.32	CAC(H)	2.0	0.67	CGC(R)	2.5	1.43
CUA(L)	2.5	0.69	CCA(P)	1.6	0.93	CAA(Q)	3.8	1.64	CGA(R)	1.5	0.86
CUG(L)	1.8	0.48	CCG(P)	1.5	0.88	CAG(Q)	0.8	0.36	CGG(R)	1.3	0.71
AUU(I)	4.5	1.57	ACU(T)	1.6	0.68	AAU(N)	3.6	0.89	AGU(S)	3.0	0.96
AUC(I)	0.5	0.17	ACC(T)	2.3	0.96	AAC(N)	4.5	1.11	AGC(S)	3.5	1.13
AUA(I)	3.6	1.25	ACA(T)	1.6	0.68	AAA(K)	7.5	1.28	AGA(R)	1.5	0.86
AUG(M)	2.8	1.00	ACG(T)	3.9	1.68	AAG(K)	4.3	0.72	AGG(R)	2.0	1.14
GUU(V)	8.7	2.04	GCU(A)	2.3	1.15	GAU(D)	5.4	1.29	GGU(G)	3.8	1.04
GUC(V)	3.5	0.82	GCC(A)	1.8	0.89	GAC(D)	3.0	0.71	GGC(G)	2.0	0.55
GUA(V)	2.6	0.61	GCA(A)	2.3	1.15	GAA(E)	0.7	0.27	GGA(G)	3.3	0.92
GUG(V)	2.3	0.53	GCG(A)	1.6	0.81	GAG(E)	4.3	1.73	GGG(G)	5.3	1.48

注:括号内字母表示氨基酸;*表示终止密码子。

大连海洋大学学报,2016,31(6):612-617.

- [4] Phleger C F, Holtz R B, Grimes P W, et al. Chemical and sensory analysis of the purple - hinge rock scallo *Hinnites multirugosus* Gale [J]. Journal of Food Science, 1978, 43(6): 1793-1796.
- [5] Maxwell - Miller G, Josephson R V, Spindler A A, et al. Chilled (5 ℃) and frozen (-18 ℃) storage stability of the purple - hinge rock scallop, *Hinnites multirugosus* Gale [J]. Journal of Food Science, 1982, 47(5): 1654-1661.
- [6] Monical James B. Comparative studies on growth of the purple - hinge rock scallop *Hinnites multirugosus* (Gale) in southern California[J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1979, 10(1/2/3/4): 648.
- [7] Laurén D J. Oogenesis and protandry in the purple - hinge rock scallop, *Hinnites giganteus*, in upper Puget Sound, Washington, U. S. A. [J]. Canadian Journal of Zoology, 1982, 60(10): 2333-2336.
- [8] Cary S C, Leighton D L, Phleger C F. Food and feeding strategies in culture of larval and early juvenile purple - hinge rock scallops, *Hinnites multirugosus* (Gale) [J]. Journal of the World Aquaculture Society, 1981, 12(1): 156-169.
- [9] Culver C S, Richards J B, Page H M. Plasticity of attachment in the purple - hinge rock scallop, *Crassadoma gigantea*: implications for commercial culture [J]. Aquaculture, 2006, 254(1/2/3/4): 361-369.
- [10] Bernard F R. *Crassadoma* gen. nov. for “*Hinnites*” *giganteus* (Gray, 1825) from the North - eastern Pacific Ocean (Bivalvia: Pectinidae) [J]. Venus 1986, 45: 70-74
- [11] Waller T R. The evolution of “*Chlamys*” (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae) in the tropical western Atlantic and eastern Pacific [J]. Am Malacol Bull, 1993, 10: 195-249.
- [12] Saavedra C, Peña J B. Phylogenetics of American scallops (Bivalvia: Pectinidae) based on partial 16S and 12S ribosomal RNA gene sequences [J]. Marine Biology, 2006, 150: 111-119.
- [13] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(S1): 96-99.
- [14] Ball S L, Hebert P D N, Burian S K, et al. Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes [J]. Journal of the North American Benthological Society, 2005, 24(3): 508-524.
- [15] 程希婷, 王爱民, 顾志峰, 等. DNA 条形码研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(6): 748-758.
- [16] Feng Y W, Li Q, Kong L F, et al. DNA barcoding and phylogenetic analysis of Pectinidae (Mollusca: Bivalvia) based on mitochondrial *COI* and 16S rRNA genes [J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(1): 291-299.
- [17] 宋乔乔, 柴志欣, 钟金城. 禽流感病毒基因的密码子偏好性及聚类分析 [J]. 生物技术, 2014, 24(2): 48-53.
- [18] 孔晓瑜, 刘亚军, 喻子牛, 等. 栉孔扇贝和海湾扇贝线粒体 16S rRNA 基因片段的比较研究 [C]// 中国动物学会、中国海洋湖沼学会贝类学分会代表大会暨学术讨论会, 1999.
- [19] 胡丽萍, 姜黎明, 黄晓婷, 等. 基于 16S rDNA 基因序列探讨引进物种紫扇 (*Argopecten purpuratus*) 在 海湾扇贝属 (*Argopecten*) 中的分类地位 [J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(6): 1149-1157.
- [20] 朱立静, 陈淑吟, 许晓凤, 等. 四角蛤蜊江苏群体线粒体 *COI* 基因片段序列研究 [J]. 江苏农业科学, 2010, 38(4): 33-35.
- [21] 程汉良, 夏德全, 吴婷婷, 等. 6 种帘蛤科贝类及 4 个地理种群文蛤线粒体 *COI* 基因片段序列分析 [J]. 海洋学报, 2007, 29(5): 109-116.
- [22] Howland D E, Hewitt G M. Phylogeny of the colepters based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data [J]. Insect Mol Bio, 1995, 4: 203-205.
- [23] Spicer G S. Phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome oxidase gene: molecular evolution of the *Drosophila buzzatii* species complex [J]. Journal of Molecular Evolution, 1996, 41(6): 749-759.
- [24] Thompson J D, Plewniak F, Poch O. A comprehensive comparison of multiple sequence alignment programs [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(13): 2682-2690.
- [25] Odenw T H, Rosenberg M S. Multiple sequence alignment accuracy and phylogenetic inference [J]. Systematic Biology, 2006, 55(2): 314-328.