

耳鲍(*Haliotis asinina*)核糖体小亚基(18S rRNA)编码基因的克隆与序列分析*

黄勃 方再光 刘均玲 周智 王小兵

(海南大学热带生物资源教育部重点实验室 海洋学院 海口 570228)

提要 采用分子生物学的方法,对南海不同海区的两个地理群体耳鲍(*Haliotis asinina*) 18S rRNA 基因全长进行了克隆和序列分析,并将耳鲍 18S rRNA 基因的序列与 NCBI 数据库中已收录的 18S rRNA 基因进行了比较。结果发现,南海耳鲍核糖体 18S rRNA 基因与耳鲍 *H. asinina* isolate H11 核糖体 18S rRNA 基因序列的相同率高达 98%;同一地理群体内耳鲍核糖体 18S rRNA 基因序列完全一致;不同地理群体间耳鲍核糖体 18S rRNA 基因在碱基组成上的相似率为 99%,仅在某些位点处发生了碱基替换,即腺嘌呤(T)被鸟嘌呤(G)替换;同时,将这两个不同群体中耳鲍的 18S rRNA 基因与泰国耳鲍 18S rRNA 基因序列进行比较分析发现,它们之间也只是发生了碱基替换。

关键词 地理群体,耳鲍,18S rRNA 基因
中图分类号 Q954.43

耳鲍贝壳较小、狭长且薄、略弯曲,散布有暗绿色或紫褐色的三角形斑纹及淡褐色的不规则的云状斑,贝壳顶部还常具有淡红色、紫红色、杏黄色及绿色的斑纹,形似耳状,故得其名,是暖水性种类,生活于低潮线以下的岩石或珊瑚礁及藻类丛生的海底,有时也生活于潮间带下区,分布于澳大利亚、新西兰的南岛、马来西亚、菲律宾、南海中国海域和中国台湾地区以及日本等地。耳鲍生长快速,年平均壳长增长率为 75.5%,与九孔鲍和杂色鲍相比,其年平均壳长增长率分别高出 13.8%和 13.5%(黄勃等, 2002),在南方海域将成为又一种重要的养殖经济鲍,故对耳鲍遗传资源的研究十分重要。

由于不同耳鲍地理群体在形态上的差异不显著,利用形态学方法无法对耳鲍不同群体,尤其是它和其他鲍之间的遗传关系进行确定。线粒体基因和核糖体 18S rRNA 编码基因以其特殊的组成结构和演化方式在海洋动物遗传亲缘关系的

研究中具有不可替代的重要作用。目前,线粒体 16S rRNA 编码基因、核糖体 18S rRNA 编码基因和核编码蛋白基因等先后已被用于动物的遗传关系分析(邵红光等, 1999, 2000; 潘宝平等, 2006; Carapelli *et al*, 2000; Giribet *et al*, 2000; Shultz *et al*, 2000);线粒体 16S rRNA 编码基因和核糖体 18S rRNA 编码基因也已经在鲍科动物的遗传关系研究中得到了广泛应用(Naganuma, 1998; 杨建敏等, 2003; Klinbunga *et al*, 2003)。但是由于线粒体 16S rRNA 编码基因的来源仍存在争论,而 18S rRNA 编码基因存在于核基因组中,因此在遗传上它比线粒体 16S rRNA 编码基因更具有遗传稳定性和可靠性,更适合于生物的遗传差异与遗传关系的研究。本文中作者研究了耳鲍核糖体 18S rRNA 编码基因序列变异以及与其他鲍之间的遗传关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验材料耳鲍(*Haliotis asinina*)地理群体

* 国家“863”资源环境技术领域项目, 2004AA603130 号; 国家自然科学基金项目, 40366001 号; 教育部科学技术研究重点项目资助, 03146 号; 海南省外国专家局重点项目资助, 20031211 号; 海南大学海洋生物重点学科项目资助, 200602 号。黄勃, 博士, 教授, E-mail: huangbohbl@163.com

收稿日期: 2005-08-12, 收修改稿日期: 2006-01-05

Q5、Q6 取自西沙群岛和海南岛沿海海域。

1.2 方法

1.2.1 耳鲍基因组 DNA 的制备 活体取样, 用蛋白酶 K 消化法从耳鲍肌肉组织中提取基因组 DNA。

1.2.2 耳鲍 18S rRNA 编码基因的克隆 根据动物 18S rRNA 的结构特点及其在进化上的保守区域设计正向和反向引物, 正向引物序列: 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'; 反向引物序列: 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTCA-3'。以耳鲍基因组 DNA 为模板, 采用 PCR 方法, 直接克隆 18S rRNA 编码基因, 在 1.2% 的琼脂糖凝胶上对 PCR 扩增产物进行电泳检测。用 UNIG-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒回收目的 DNA 条带。将 PCR 产物与 pGEM[®]-T easy Vector 连接, 然后将连接产物转入大肠杆菌感受态 XL1 中。

1.2.3 18S rRNA 基因测序和序列分析 从转化菌落中挑取阳性单菌落进行测序, 测序工作由上海晶泰生物技术有限公司完成。先将测序结果与 NCBI 数据库中收录的鲍 18S rRNA 编码基因进行 BLAST 分析, 然后采用 CLUSTALW 软件进行多序列匹配排列, 用 PHYLIP 软件构建遗传关系树。

2 结果

2.1 耳鲍基因组 DNA 的提取结果

采用蛋白酶 K 消化法从成年耳鲍肌肉组织中提取基因组 DNA, 由于成年耳鲍的肌纤维十分发达, 细胞核的含量相对较低, 因此基因组 DNA 的含量也比较小。在该实验中, 每个样品称取 0.3g 左右的肌肉, 用干净剪刀将肌肉组织充分剪碎, 加如一定量的蛋白酶 K(终浓度为 100 μg/ml), 50 °C 水浴处理 3h, 期间多次轻轻摇动试管, 用异丙醇沉淀, 结果提取得到了比较满意的基因组 DNA, 结果如图 1 所示。

2.2 耳鲍核糖体 18S rRNA 的编码基因克隆

以耳鲍基因组 DNA 为模板, 根据 18S rRNA 基因保守区域设计 PCR 扩增反应引物, 94 °C 变性 1min, 54 °C 退火 50s, 72 °C 延伸 1min 30s, 经过 30 个扩增反应后, 扩增得到了大小为 1.8kb 的耳鲍核糖体 18S rRNA 的编码基因片段, 结果如图 2 所示。琼脂糖凝胶电泳检测的结果表明, 在每个

个体基因组 DNA 模板上, 都能特异性的扩增到同样大小片段的 DNA 条带, 而且序列大小与目的片段完全吻合。

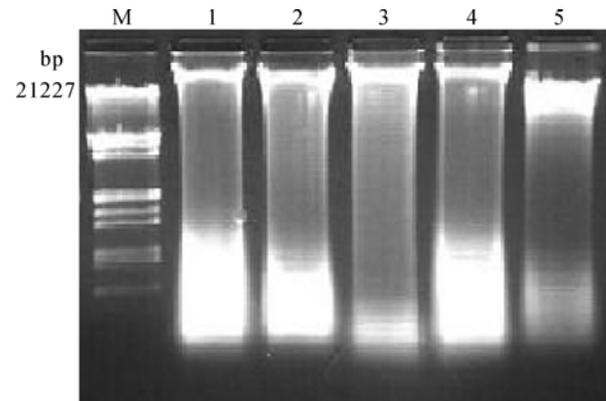


图 1 蛋白酶 K 消化法提取的耳鲍基因组 DNA
Fig. 1 Genomic DNA of *H. asinina* extracted by proteinase K
M: Lambda DNA/EcoR + HindI ; 1—5: 不同耳鲍个体中提取的基因组 DNA

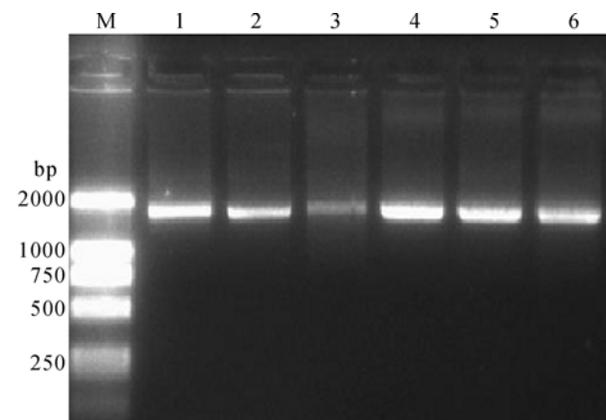


图 2 鲍核糖体 18S rRNA 编码基因的 PCR 扩增结果
Fig. 2 The 18S rRNA coding genes of different groups of *H. asinina* by PCR
M: DNA Ladder 2000; 1—6: 耳鲍核糖体 18S rRNA 编码基因的 PCR 扩增结果

2.3 两个不同耳鲍地理群体 18S rRNA 基因序列变异位点

用 CLUSTALW 软件对两个不同耳鲍地理群体耳鲍(Q5, Q6)核糖体 18S rRNA 编码基因的 3 端序列进行了比较分析, 结果发现这两个不同地理群体耳鲍 18S rRNA 编码基因在碱基组成上有 4 处发生了碱基替换, 其中 3 处为 G 与 A 之间的替换, 1 处为 C 与 T 之间的替换, 结果图 3 所示。

2.4 鲍核糖体 18S rRNA 编码基因的序列分析与比较

通过对 pGEM[®]-T easy Vector 插入的耳鲍核糖体 18S rRNA 编码基因进行测序, 并将耳鲍核糖体 18S rRNA 的编码基因序列与 NCBI 数据库

Q6 AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAATCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCT
Q5 AACCTGGTTGATCCTGCCAGTAATCATATGCTTGTCTCAAAGATTAAGCCATGCATGTCT

Q6 AAGTACAAACTCTAGCACGATGAAACTGCGAATGGCTCATTAGATCAGTTATGGTTCCTT
Q5 AAGTACAAACTCTAGCACGATGAAACTGCGAATGGCTCATTAGATCAGTTATGGTTCCTT

Q6 AGATGATACAATCCTACTTGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCACTGAAG
Q5 AGATGATACAATCCTACTTGGATAACTGTGGTAATTCTAGAGCTAATACATGCACTAAAG

Q6 CTCCGACCCTTTCTGAAGGCGGGGAAGAGCGGTTTATCAGTTCGACAAGCCAGCCGAGC
Q5 CTCCGACCCTTTCTGAAGGCGGGGAAGAGCGGTTTATCAGTTCGACAAGCCAGCCGAGC

Q6 CGCGAGGTCTCTCCACTTTGGTGACTCTGGATAACTCTAGCGGATCGCACGGCCTCGAGC
Q5 CGCAAGGTCTCTCCACTTTGGTGACTCTGGATAACTCTAGCGGATCGCACGGCCTCGAGC

Q6 CGGCGACGCATCTATCAAGTGTCTGCCCTATCAGACTGTTCGATGGTAAGTGTGTGCTTA
Q5 CGGCGACGCATCTATCAAGTGTCTGCCCTATCAGACTGTTCGATGGTAAGTGTGTGCTTA

Q6 CCATGGTGATAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAA
Q5 CCATGGTGATAACGGGTAACGGGGAATCAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCATGAGAAA

Q6 CGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTCGATACGAGGAG
Q5 CGGCTACCACATCCAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCTCGATACGAGGAG

Q6 GTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGTAATTGGAATGAGCGTA
Q5 GTAGTGACGAAAAATAACAATACGGGACTCTTTCGAGGCCCGTAATTGGAATGAGTGTA

Q6 CTCTAAACGTGTGCACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
Q5 CTCTAAACGTGTGCACGAGGATCTATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAA

Q6 TTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGCTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTC
Q5 TTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAGCTGTTGTGGTTAAAAAGCTCGTAGTTGGATCTC

Q6 AGGGTCGTTTCGCGTCGGTCCCTTGCTGCCAAATGGCTCGGAGTACTGCGCGGTGTCGTCC
Q5 AGGGTCGTTTCGCGTCGGTCCCTTGCTGCCAAATGGCTCGGAGTACTGCGCGGTGTCGTCC

Q6 CCCTTGGCCAGACCTCTCAAAAAGGTTGCTCTTGACTGAGTGGCCTGCTCGAGTGGCTGG
Q5 CCCTTGGCCAGACCTCTCAAAAAGGTTGCTCTTGACTGAGTGGCCTGCTCGAGTGGCTGG

Q6 AGAGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCACAGCCCGCCTGTATAATGGT
Q5 AGAGTTTACTTTGAAAAAATTAGAGTGTTCAAAGCAGGCACAGCCCGCCTGTATAATGGT

Q6 GCATGGAATAATGGAATAGGACCCCGGATCCTATTTTGCTGGTTTTTGGAGCTCAGGGGT
Q5 GCATGGAATAATGGAATAGGACCCCGGATCCTATTTTGCTGGTTTTTGGAGCTCAGGGGT

Q6 AATGATTAAGAGGAACAGGGCGGGGCATCCGTATTACGGCGTTAGAGGTGAAATTCTTG
Q5 AATGATTAAGAGGAACAGGGCGGGGCATCCGTATTACGGCGTTAGAGGTGAAATTCTTG

Q6 GATCGTCGTAAGACGCCCTACAGCGAAAGCATTTGCCAAGTATGTTTTTCATTAATCAAGA
Q5 GATCGTCGTAAGACGCCCTACAGCGAAAGCATTTGCCAAGTATGTTTTTCATTAATCAAGA

图 3 两个不同地理群体耳鲍 18S rRNA 编码基因序列变异位点

Fig. 3 The nucleotide variation sites of 18S rRNA genes in two different geographic groups

注: 黑体字母为变异位点

中收录的鲍的核糖体 18S rRNA 编码基因进行了比较分析。结果发现南海耳鲍 Q5-1、Q5-2 (Q5-1 和 Q5-2 来自地理群体 Q5)与 Q6-1、Q6-2 (Q6-1 和 Q6-2 来自地理群体 Q6)、*H. asinina* isolate H11、*H.*

tuberculata、*H. discus* 和 *H. iris* 的核糖体 18S rRNA 基因间相同率分别为 99%、98%、95%、96%和 95%; Q6 与 *H. asinina* isolate H11、*H. tuberculata*、*H. discus* 和 *H. iris* 的核糖体 18S rRNA 基因间相同率

分别为 98%、95%、96%和 95%; *H. asinina* isolate H11 与 *H. tuberculata* 和 *H. iris* 的核糖体 18S rRNA 基因间相同率分别为 98%和 98%; *H. tuberculata* 与 *H. discus* 和 *H. iris* 的核糖体 18S rRNA 基因间相同率分别为 95%和 94%; *H. discus*、*H. tuberculata* 和 *H. iris* 的核糖体 18S rRNA 基因间相同率高达 99%。根据各种鲍核糖体 18S rRNA 编码基因序列之间碱基组成的相同率, 利用 PHYLIP(v3.57) 软件构建了遗传关系树(图 4), 初步分析研究了各种鲍在遗传学上的关系。

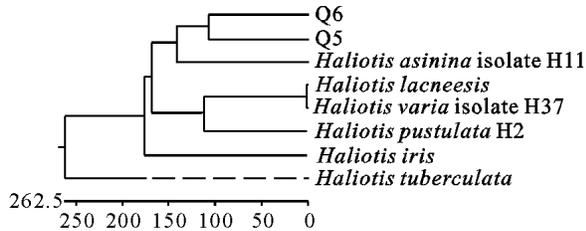


图 4 根据鲍 18S rRNA 编码基因的 Alignment 分析结果构建的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of abalones constructed according to the alignment of 18S rRNA coding gene sequences
注: Q5 和 Q6 来自不同的耳鲍地理群体

3 讨论

遗传多样性是指种内不同种群间或一个种群内部不同的个体的遗传变异, 是物种多样性的基础(施立明, 1990)。关于遗传多样性的研究越来越受到了国内外学者的关注(杨建敏等, 2006), 核糖体基因以其序列上的特殊性在海洋动物的遗传多样性研究中具有不可替代的作用, 目前在海洋生物领域方面的研究主要集于重要海洋水产经济动物(Muchmore, 1998; Naganuma, 1998), 如鲍的遗传与分子系统关系学研究方面。杨建敏等(2003)对引自日本的盘鲍(*H. discus discus*)、皱纹盘鲍(*H. discus hannai*)和大鲍(*H. gigantea*)3 个自然群体的线粒体 16S rRNA 基因片段进行了扩增和测序, 分析了 528bp 大小的碱基序列。结果发现这 3 个自然群体间 16S rRNA 基因的碱基片段序列差异不显著, 盘鲍与皱纹盘鲍、大鲍彼此均仅有 1 处核苷酸检测到变异, 皆为碱基转换, 同源性为 99.81%; 皱纹盘鲍与大鲍有 2 处碱基转换, 同源性为 99.61%, 可以看出 16S rRNA 基因在鲍属内表现出很高的保守性, 从而认为 16S rRNA 可能更适用于鲍属以上阶元的遗传多样性分析(杨建敏等, 2003)。

3.1 耳鲍不同地理群体之间的遗传差异

本研究中, 通过对耳鲍两个不同地理群体(Q5 和 Q6)的核糖体 18S rRNA 编码基因的一个 829bp 片段进行比较发现, 在耳鲍的同一地理群体内, 个体的核糖体 18S rRNA 编码基因在组成上是完全一致的, 但在不同地理群体之间, 个体的核糖体 18S rRNA 编码基因在某些碱基位点处发生了变换, 且均为碱基替换(A 与 G 或 T 与 C)。

上述遗传关系图是根据两个地理群体核糖体 18S rRNA 编码基因与 NCBI 网站数据库中提供的鲍核糖体 18S rRNA 编码基因之间的 Alignment 分析结果构建的。在遗传关系树中, 虽然 Q5、Q6 与泰国耳鲍归属于同一类, 但 Q5 和 Q6 之间的亲缘关系程度要高于它们与泰国耳鲍之间的亲缘关系, 说明耳鲍不同地理群体之间的遗传差异与地理隔离程度之间存在正相关, 原因有待进一步研究。

3.2 不同鲍种类之间的遗传差异

在遗传关系图中, 三个不同地理群体的耳鲍与其他种类的鲍归属于不同分支单元, 而且它们之间的遗传差异程度均小于它们与其他鲍之间的遗传差异, 结果与传统的分类方法一致, 说明利用鲍核糖体 18S rRNA 编码基因探索鲍之间的亲缘关系是可行的。同时, 本研究中取得了与前人研究相似的结果(Klinbunga *et al*, 2003)。

从目前来看, 尽管核糖体基因在海洋动物分子系统学的研究中较为广泛, 但多是以核糖体基因的一级结构为分子标记工具, 而关于核糖体基因高级结构在海洋动物的遗传关系研究中的应用, 以前的报道甚少(Nelles *et al*, 1984), 这势必使核糖体基因在用于海洋动物的遗传关系研究过程中存在一定的局限性。这些问题的解决就要求研究人员在利用核糖体基因对海洋动物做遗传关系研究时, 应该对核糖体基因的各级结构做综合分析。

参 考 文 献

- 杨建敏, 郑小东, 王如才等, 2003. 三种鲍鱼线粒体 16S rDNAs 的比较分析研究. 青岛海洋大学学报, 33(1): 36—40
杨建敏, 郑小东, 李 琪等, 2006. 中国沿海脉红螺 (*Rapana venosa*) 居群数量性状遗传多样性研究. 海洋与湖沼, 37(5): 385—392
邵红光, 张亚平, 柯 欣等, 2000. 南极隐瑶线立体 CO 基因序列及无翅类昆虫分子进化. 中国科学(C 辑),

- 30(3): 330—336
- 邵红光, 张亚平, 谢荣栋等, 1999. 原尾虫 DNA 序列变异及无翅类昆虫的系统进化. 科学通报, 44(17): 1836—1841
- 施立明, 1990. 遗传多样性及其保存. 生物科学信息, 2: 158—164
- 黄 勃, 王小兵, 刘杰俊, 2002. 耳鲍人工养殖的可行性研究. 海洋科学, 26(7): 40—41
- 潘宝平, 吴 琪, 张素萍等, 2006. 文蛤属(*Meretrix*)16S rRNA 基因及 ITS1 序列的系统学分析. 海洋与湖沼, 37(4): 342—347
- Carapelli A, Frati F, Nardi F *et al.*, 2000. Molecular phylogeny of apterygotan insects based on nuclear and mitochondrial genes. *Pedobiologia*, 44(4): 361—373
- Giribet G, Ribera C, 2000. A review of arthropod phylogeny: new data based on ribosomal DNA sequences and direct character optimization. *Cladistics*, 16: 204—231
- Klinbunga S, Pripue P, Khamnamtong N *et al.*, 2003. Genetic diversity and molecular markers of the tropical abalone (*Haliotis asinina*) in Thailand. *Mar Biotechnol (NY)*, 5(5): 505—517
- Muchmore M-E, 1998. Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of Eastern Pacific abalone. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 7(1): 1—6
- Naganuma T, 1998. Molecular distinction of two resemblant abalones, *Haliotis discus* and *Haliotis discus hannai* by 18S rDNA sequences. *Journal of Marine Biotechnology Research*, 17(3): 795—799
- Nelles I, Fang B I, Volckaert G *et al.*, 1984. Nucleotide sequence of a crustacea 18S ribosomal RNA gene and secondary structure of eukaryotic small subunit ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res*, 12(23): 8749—8768
- Shultz J W, Regier J C, 2000. Phylogenetic analysis of arthropods using two nuclear protein-encoding genes supports a crustacean+hexapod clade. *Proc R Soc Lond B*, 267: 1011—1019

CLONING AND SEQUENCING OF GENES ENCODING *HALIOTIS ASININA* 18S rRNAs

HUANG Bo, FANG Zai-Guang, LIU Jun-Ling, ZHOU Zhi, WANG Xiao-Bing

(Tropical Bio-resources of Education Department Key Laboratory, Ocean College, Hainan University, Haikou, 570228)

Abstract Genetic differences of *Haliotis asinina* from 2 different geographic groups in the South China Sea were studied. One from the area near the Xisha Island and another near Hainan Island were analyzed by polymerase chain reaction (PCR) of 18S rRNA genes. The amplified 18S rRNA genes of individuals from the 2 groups were cloned and sequenced, and then aligned with other abalone 18S rRNA genes registered with NCBI GenkBank. Results indicated that 18S rRNA genes of individuals from the same group had no differentiation, the similarity in the 18S rRNA genes neared 100%, whereas partial differentiation between the 2 groups was observed with the similarity up to 99%, and basal substitution took place at some sites. A neighbor-joining tree was constructed from sequence divergence of 18S rRNA genes, which all was built up by ocated accurately those sequences according to species of abalone. An unweighted pair-group dendogram method with arithmetic mean was constructed from divergence among the individuals from the 2 groups. The *H. asinina* in China and Thailand were genetically closer than other species of abalones, revealing a close relation in phylogeny among them.

Key words Geographic group, *Haliotis asinina*, 18S rRNA gene