

# 几种腹蛇 12S rRNA 和 Cyt *b* 基因片段 序列的初步研究\*

沈 曦 周开亚 王义权

(南京师范大学生命科学学院遗传资源研究所 南京 210097)

摘要:首次对我国几种腹属蛇类的 12S rRNA 和 Cyt *b* 基因的部分序列进行了测定。12S rRNA 基因片段序列结果揭示:中介蝮有较大的种下分化。本文为蝮属蛇类的分子系统学研究提供了一些资料。

关键词:蝮蛇;12S rRNA;Cyt *b*

中图分类号:Q958.2 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2000)01-18-04

蝮属(*Agkistrodon*)是高度分化的蛇类。对我国的蝮属蛇类,除形态学性状外,已应用了核型、蛋白质电泳、DNA 复性动力学<sup>[1]</sup>等技术进行过研究。作者曾应用随机扩增多态性 DNA(RAPD)技术,根据基因组 DNA 的差异,对其系统发生和分类进行了探讨<sup>[2]</sup>。迄今尚无对我国蝮属蛇类线粒体 DNA 的核苷酸序列进行测定和分析的报道。下面简介几种蝮蛇

12S rRNA 和 Cyt *b* 基因序列的初步研究结果。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

---

\* 国家自然科学基金项目 No. 39470098;

第一作者介绍:沈 曦,男,26岁,硕士;

收稿日期:1998-05-26,修回日期:1999-10-18

实验所用蝮蛇种类主要根据 Gloyd 和 Co-nant *Agkistrodon*<sup>[3]</sup> 鉴定,其产地见表 1。

表 1 样品种类及产地

种名	数量	代号	采集地
短尾蝮	1	D	辽宁
<i>Agkistrodon brevicaudus</i>	2	A, Y	陕西汉阴
中介蝮指名亚种 <i>A. intermedius intermedius</i>	1	Z	内蒙古呼和浩特
中介蝮黑眉亚种 <i>A. intermedius saxatilis</i>	1	H	辽宁清源
乌苏里蝮 <i>A. ussuriensis</i>	1	W	辽宁老秃顶山
高原蝮 <i>A. strauchi</i>	1	G	甘肃卓尼

## 1.2 实验方法

(1) DNA 的提取 取肌肉组织约 0.5g, 提取总 DNA。经 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 标准  $\lambda$  DNA 做对照, 紫外透射仪下检测浓度。

(2) 引物 所用引物为 L1091(5'-AAA AAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCAC TTAT-3'), H1478(5'-TGACTGCAGAGGGT-GACGGGCGGTGTGT-3') 及 L14841(5'-AAAAAAGCTTCCTCCAACATCTCGCAATG-TG-3'), H15149(5-AAACTGCAGCCCT-CAGAATGATATTTGTCCTC-3')<sup>[3]</sup>

(3) PCR 扩增和测序 PCR 反应在 MJ/PTC-200-D 热循环仪上进行, 反应体系同文献<sup>[4]</sup>。94.5℃ 预变性 3 分钟后, 进入如下循环, 参数为: 94.5℃ 40s, 52℃ 1 分钟, 72℃ 2 分钟。完成 35 次循环后, 72℃ 延伸 7 分钟。12S rRNA 基因片段用 ECP3000 高压电泳仪银染测序 (Promega), *Cyt b* 基因片段用 AB1310 测序。

(4) 数据处理 用 MEGA 软件包对 12S rRNA 基因片段的碱基变异进行分析。

## 2 结果

测序结果见附录 1。12S rRNA 基因片段中, 发现 3 个位点有插入缺失。各样品碱基组成情况及 G+C 含量见表 2。12S rRNA 基因片段碱基变异分析结果见表 3。

表 2 各样品碱基组成情况及 G+C 含量(代号同表 1)

代号	A	T	G	C	(G+C)%
G	83	86	34	79	39.0
A	35	24	27	17	42.7
Y	35	24	28	17	43.3
D	35	24	28	17	43.3
B	37	24	27	16	41.3
H	39	22	26	18	41.9
Z	31	24	31	17	46.6

表 3 12S rRNA 基因片段碱基转换/颠换数目 (对角线以上) 及碱基差异百分数(对角线以下) (代号同表 1)

代号	A	Y	D	B	H	Z
A		0	0	4/1	3/3	4/2
Y	0		0	4/1	3/3	4/2
D	0	0		4/1	3/3	4/2
B	5.25	5.25	5.25		2/5	8/3
H	6.3	6.3	6.3	7.35		7/5
Z	6.3	6.3	6.3	10.48	12.6	

## 3 讨论

在 PCR 扩增时, L14841 和 H15149 引物对 *Cyt b* 基因片段的扩增在一些样品中效果较差。该对引物是参照人线粒体 *Cyt b* 基因序列设计的<sup>[3]</sup>, 为扩增动物 *Cyt b* 基因中约 300bp 的 DNA 片段的通用引物。但本文的结果表明, 蝮属蛇类在该对引物结合位点(特别是 3' 端)上的碱基变异较大, 不能很好与引物结合, 因而影响了扩增效果。即使扩增出产物, 但由于杂带多, 测序效果不好。可在今后的研究中, 重新设计适当的引物, 对该区域扩增测序, 以深入探讨种间及种下亲缘关系。

从所测的序列结果看: 在 12S rRNA 基因 105bp 的片段上, 短尾蝮的陕西汉阳个体与东北地区个体间无差异, 而中介蝮指名亚种与中介蝮黑眉亚种间碱基变异较大。对于短尾蝮, Matsui 等<sup>[6]</sup> 推测短尾蝮很可能代表一个独立的种 *A. brevicaudus*。我们根据 Matsui 等把短尾蝮定为种级。Zhao 等<sup>[7]</sup> 将黑眉蝮蛇定为种级。我们依据 Gloyd 等<sup>[3]</sup> 将其列为中介蝮下的一个亚种。我们的 RAPD 研究结果提示, 中介蝮有较大的种下分化。本文的序列结果与

RAPD 分析的结果相吻合。

本文对部分蝮属蛇类线粒体 DNA 的初步研究虽得到了一些序列数据,但所获得的几种蛇的 12S rRNA 基因片段较短,还不足以作为

系统发生研究的依据。对这两个基因的进一步研究将会获得更多的序列数据。几种蝮蛇的 12S rRNA 基因片段序列见附录 1。

附录 1

几种蝮蛇的 12S rRNA 基因片段序列(代号同表 1)

A AAAACGACAG GTCGAGGTGT AACTTATGAA GGGGCCAAGA TGGGCTACAT TCTC-CCGA GAATACGAAT  
 Y AAAACGACAG GTCGAGGTGT AACTTATGAA GGGGCCAAGA TGGGCTACAT TCTCT-CCGA GAATACGAAT  
 D AAAACGACAG GTCGAGGTGT AACTTATGAA GGGGCCAAGA TGGGCTACAT TCTCT-CCGA GAATACGAAT  
 B AAAACGACAG GTCGAGGTGT AACTTATGAA GGGGCCAAGA TGGGCTACAT TCTCTTA-GA GAATACGAAT  
 H AAAACGACAG GTCGAGGTGT AACTTATGAA GGGGCCAAGA TGGGCTACAT TCTCAACCGA GAATACGAAT  
 Z AAAACGA-G GCCGAGGTGT ACCTTATGGG GGGGTCAAGA TGGGCTACAT TCTCT-CCGA GAATACGAAT

A AACACTATGA AATTAGTGCT TGAAGNCGGA TTTAG  
 Y AACACTATGA AATTAGTGCT TGAAGGCGGA TTTAG  
 D AACACTATGA AATTAGTGCT TGAAGNCGGA TTTAG  
 B AACACTATGA AACTAGTGCT TGAAGNCGGA TTTAG  
 H AACACTAAGA AACTAATCTT TGAAGNCGGA TTTAG  
 Z AACACTATGA AATTAGTGCT TGAAGGCGGA TTTAG

高原蝮 Cyt b 基因片段序列

CAAAANTTCT CACCTNTCTA AAAGGGCAAA TTATAACTGG TTTCTNCCTA ACAATCCATT ANACAGNAAA  
 CATTAGTCTC GCCTTCTCAT CCATCATCNA CACTTCCCGT GACGTACCC TACGGCTGAAT TATACAAAAC  
 ACACACGCTA TTGGTGCATC CTTATNCTTC ATTTGTATCT ATATCCATAT CGCACGGGGG ATCTACTATG  
 GCTCATATCT TAACAAAAAA GTCTGACTAT CAGGCACCAC CCTTTTAATC CTCCTAATAA CCACCGCNTT  
 CTTTGGTTAT

参 考 文 献

[1] 莫鑫泉,潘震河,单志英等. 东北蝮蛇基因的中度重复 DNA 序列的研究. 两栖爬行动物学研究, 1994, 3: 114~118.

[2] 沈曦,周开亚,王义权. 中国蝮属蛇类的 RAPD 分析. 动物学报, 1999, 45(1): 40~48.

[3] Gloyd, H. K., R. Conant. A Snake of the Agkistrodon Complex; A Monographic Review. Contributions to Herpetology (K. Alder ed.), No. 6, SSAR, Oxford, Ohio. U. S. A., 1990, 6 + 614. + one color illustration and 52 pls.

[4] Koehler, T. D., W. K. Thomas, A. Meyer et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86: 6196~6200.

[5] 杨光,周开亚. 中国水域江豚种群遗传变异的研究. 动物学报, 1997, 43(4): 411~419.

[6] Matsui, M., H. Ota. On Chinese herpetology. Herpetologica, 1995, 51: 234~250.

[7] Zhao, E.-M., K. Alder. Herpetology of China. Contribution to Herpetology (K. Alder ed.), No. 10, Society for the Study of Amphibians and Reptiles in cooperation with Chinese Society for the Study of Amphibians and Reptiles, Oxford, Ohio, U. S. A., 1993, 512. + one color illustration, 48 color pls. and one double fold map.

## 12S rRNA and Cyt *b* Gene Fragments Sequence of Some Species of the Genus *Agkistrodon*

SHEN Xi ZHOU Kai-Ya WANG Yi-Quan

( *Institute of Genetic Resource , Nanjing Normal University Nanjing 210097 ,China* )

**Abstract** : Sequences of 12S rRNA and Cyt *b* gene fragments of some species of the genus *Agkistrodon* were studied for the first time in the paper. Sequence analysis of the 12S rRNA fragments shows considerable intraspecific differentiation in *Agkistrodon intermedius*. The present paper provides some data for the study on molecular systematics of the genus *Agkistrodon*.

**Key words** : Pit-viper ; 12S rRNA ; Cyt *b*