

# 暗纹东方鲀线粒体 *CO II* 及两侧 tRNA 基因的克隆和序列分析

邵爱华<sup>①②</sup> 朱江<sup>①\*</sup> 陈葵<sup>①</sup> 史全良<sup>①</sup> 李新平<sup>①</sup> 沈颂东<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>苏州大学生命科学学院 苏州 215123; <sup>②</sup>苏州科技学院生物学系 苏州 215009)

**摘要:**用细胞色素氧化酶第二亚基基因(*CO II*)特异性引物对暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)的线粒体DNA(mtDNA)进行PCR扩增,克隆并测定了*CO II*及其侧翼tRNA基因的全序列,结果显示,*CO II*基因691 bp和5'端上游的tRNA<sup>Asn</sup>基因及3'端下游的tRNA<sup>Lys</sup>基因序列共890 bp。用DNA分析软件比较暗纹东方鲀与GenBank中9个目11种鱼类的*CO II*序列,显示暗纹东方鲀与这些鱼类的*CO II*基因具有较高的同源性,其中与同属红鳍东方鲀(*T. rubripes*)的同源性最高为99.0%。暗纹东方鲀*CO II*基因的核苷酸组成中,A+T含量为56%,与其他11种鱼类的A+T含量(55%~62%)相近。鱼类*CO II*序列组成对A+T核苷酸的偏倚程度比较低。根据暗纹东方鲀与其他11种鱼的*CO II*基因序列同源性所建立的分子进化树,与传统的分类地位基本吻合。推定的tRNA二级结构为典型的三叶草型结构。

**关键词:**暗纹东方鲀;线粒体DNA;细胞色素氧化酶第二亚基;系统学

中图分类号:Q959,Q754 文献标识码:A 文章编号:10250-326X(2005)06-01-08

## Cloning and Sequence Analysis of Mitochondrial *CO II* and its Connected tRNA in *Takifugu fasciatus*

SHAO Ai-Hua<sup>①②</sup> ZHU Jiang<sup>①</sup> CHEN Kui<sup>①</sup> SHI Quan-Liang<sup>①</sup> LI Xin-Ping<sup>①</sup> SHEN Song-Dong<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>Life Sciences School, Soochow University, Suzhou 215123;

<sup>②</sup>Department of Biology, Suzhou Science and Technology College, Suzhou 215009, China)

**Abstract:** Mitochondrial DNA (mtDNA) from the liver tissue of *Takifugu fasciatus* was prepared as template. The mitochondrial cytochrome oxidase II gene (*CO II*) and its connected tRNA genes were amplified by PCR with a pair of specific primers which were designed based on the same gene of *T. rubripes* from the GenBank. A sequence with a total length of 870 bp including 691 bp nucleotides of *CO II* gene and partial sequences at both sides was cloned. The *CO II* gene of *T. fasciatus* was proved to have good homology with the other 11 species of fishes recorded in the GenBank and it has 99.0% homology with *T. rubripes*. The percent of A and T (56%) was similar with that of the other 11 species (55% - 62%). The pattern of codon usage of the *CO II* gene was less biased. The phylogenetic tree based on the homology of mitochondrial *CO II* gene sequences is basically consistent with that obtained from morphological taxonomic results. Assumed secondary structures of tRNA<sup>Asn</sup> and tRNA<sup>Lys</sup> genes suggest that they have the classical cloverleaf structures with high rates of complementary base at each arm.

**Key words:** *Takifugu fasciatus*; mtDNA; Cytochrome oxidase II; Phylogeny

基金项目 农业部行业标准资助项目(No.2004-04084);

\* 通讯作者, E-mail: sdzjyz@hotmail.com;

第一作者介绍 邵爱华,女,硕士,讲师,研究方向:水生动物分子生物学, E-mail: ahs6892@yahoo.com.cn.

收稿日期:2005-04-05, 修回日期:2005-09-08

线粒体 DNA (mtDNA) 是一类广泛存在于生物体内的遗传物质。对进化过程中不同生物体 DNA 序列的核苷酸替换率的比较研究发现, mtDNA 基因组的替换率比 DNA 高 5~10 倍, 是研究生物进化的重要材料, 目前已被广泛应用于动植物的种群遗传学研究<sup>[1-2]</sup>。mtDNA 分析技术在国外已被遗传学家用于鱼类种群遗传结构及品系鉴定的研究; 国内研究者对哺乳动物的研究做了许多工作, 对鱼类酶切图谱、基因定位、片段克隆和结构分析也有一些研究, 但更多是对 mtDNA 限制性内切酶酶切图谱的分析<sup>[3-4]</sup>。

暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 隶属硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 辐鳍亚纲 (Actinopterygii) 鲈形总目 (Percomorpha) 鲀形目 (Tetraodontiformes) 鲀科 (Tetraodontidae) 东方鲀属 (*Takifugu*)。暗纹东方鲀的鲜美肉质和药用价值, 使其成为具有极高经济价值的特种水产养殖对象<sup>[5-7]</sup>。迄今为止, 东方鲀属的分类, 主要依据形态解剖学特征, 以及细胞遗传学和生化遗传学研究成果, 分子遗传学研究分类的成果不多<sup>[8-12]</sup>。1995 年, 东方鲀属的红鳍东方鲀 (*T. rubripes*) 正式被英国医学研究委员会接纳为新的模式动物<sup>[13]</sup>。线粒体 *CO II* 基因是动物线粒体 13 种结构蛋白的编码基因之一。细胞色素氧化酶是参与线粒体电子传递链末端氧化步骤的一种重要呼吸酶, 其 3 个大亚基由 mtDNA 编码, 其中细胞色素氧化酶亚基 II (cytochrome oxidase subunit II, *CO II*) 已经在脊椎动物中得到广泛研究。关于鱼类 mtDNA *CO II* 基因的研究报道不多, 暗纹东方鲀 mtDNA 的 *CO II* 基因研究迄今未见报道。

本文在首次克隆暗纹东方鲀 mtDNA *Cyt b* 基因后, 又克隆了 *CO II* 基因, 并与 GenBank 中多个目的鱼类 *CO II* 序列进行了同源性比较分析, 可为今后深入研究暗纹东方鲀 mtDNA 的分子结构、基因表达、种群之间的关系、不同地理和水域之间的物种鉴定及特有种的保护、暗纹东方鲀自然种群的健康发展和养殖群体的不断改良提供理论基础。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 实验用暗纹东方鲀购自苏州南门外水产品市场。限制性内切酶、Premix Ex Taq 酶、DNA Fragment Recovery Kit、pMD18-T Vector 为 Takara 公司产品, DNase I、RNase、连接酶及其他主要试剂为 Sigma 公司产品, 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

**1.2 线粒体 DNA 的提取、克隆与筛选** 活体解剖, 取肝脏组织 2 g, 线粒体 DNA 的提取参考吴乃虎等的方法<sup>[14]</sup>并稍加改进。参照红鳍东方鲀线粒体 DNA 序列 (GenBank 登录号 AJ421455) 选择位于 *CO II* 基因两侧保守性较高的区域, 设计合成暗纹东方鲀 *CO II* 基因的 PCR 扩增引物:

上游引物 P<sub>1</sub>: 5'CCACTCTGTCACTTTCTT 3'

下游引物 P<sub>2</sub>: 5'ACTCAACCCCGCACCTTG 3'

PCR 反应总体积为 25  $\mu$ l, 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 每个循环包括 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后一次循环结束后, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

参照 Sambrook 分子克隆手册<sup>[15]</sup>, 扩增产物纯化回收后, 与 pMD18-T Vector 进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 于含氨苄青霉素的平板上生长过夜, 挑选转化子, 进行质粒提取和重组子筛选。PCR 扩增法和限制性内切酶酶切法鉴定目的片段的插入。

**1.3 序列测定和数据分析** 选取 2 个经鉴定的重组质粒送上海博亚生物技术公司测序, 测序仪为 ABI PRISM<sup>TM</sup> 377 型。根据暗纹东方鲀线粒体 *CO II* 序列, 在 GenBank 数据库中有选择性地检索出其他 11 种鱼类的 *CO II* 序列 (GenBank 登录号见表 1)。利用 Clustal X 软件与 11 种鱼类 mtDNA 的 *CO II* 核苷酸序列和氨基酸序列进行同源性比较。应用 MEGA (version 2.0) 中 Kimura's 2-Parameter 模型<sup>[16]</sup>计算遗传距离, 构建分子系统树采用邻接法 (NJ), 最大简约法 (MP), 分别 NJ 程序和 MP 程序, bootstrap 1 000 次检查各支的置信度。

## 2 结果与讨论

**2.1 暗纹东方鲀线粒体 CO II 及其侧翼 tRNA 基因的扩增和克隆** PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示有一条清晰明亮的区带,分子量近 0.9 kb。此扩增产物经纯化回收后与 T 载体连接,转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,筛选重组子,提取质粒。以重组质粒为模板, P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 为引物,扩增到近 0.9 kb 的片段。重组质粒经 *Eco*R I 和 *Hin*d III 酶切,结果显示除 2.7 kb 的载体外,还有约 0.6 kb 与 0.3 kb 的两条片段。上述结果证明,所挑选的质粒有目的片段的插入(图 1 2)。

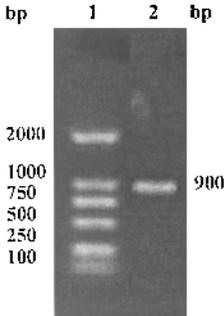


图 1 mtDNA CO II 基因片段的 PCR 扩增

Fig.1 The CO II PCR products

1. DL2000 Marker ; 2. 扩增片段。

1. DL2000 Marker ; 2. The PCR products.

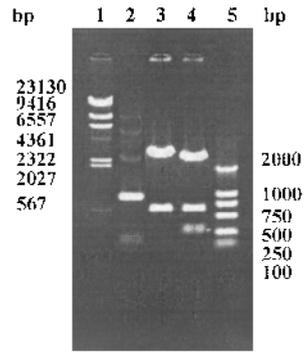


图 2 重组质粒的 PCR 鉴定及酶切鉴定

Fig.2 The identification of pMD18-T-CO II

1.  $\lambda$ -*Hin* dIII DNA Marker ; 2. 扩增片段 ; 3. *Eco*R I ; 4. *Eco*R I / *Hin* dIII ; 5. DL2000 Marker.

1.  $\lambda$ -*Hin* dIII DNA Marker ; 2. The PCR products ; 3. *Eco*R I ; 4. *Eco*R I / *Hin* dIII ; 5. DL2000 Marker.

序列分析表明,克隆片段全长为 870 bp,其中包括 CO II 基因 691 bp,含 1 个起始密码子 ATG 和不完全的终止密码子 T 以及 5' 端上游的 tRNA<sup>Asn</sup> 基因和 3' 端下游的 tRNA<sup>Lys</sup> 基因(图 3)。本文所克隆的基因序列已登录 GenBank 数据库(登录号 AY821783)。

### 2.2 CO II 基因

**2.2.1 暗纹东方鲀线粒体 CO II 与部分鱼类 CO II 的核苷酸序列和氨基酸序列比较** 用

表 1 暗纹东方鲀与其他 11 种鱼类 CO II 基因序列及推测的氨基酸序列同源性比较

Table 1 Comparison of homology(%) of CO II genes in *T. fasciatus* and other species

分类地位 Taxonomy	品种 Species	GenBank 登录号	核苷酸序列同源性	氨基酸序列同源性
		Accession number in GenBank	The nucleotide homology(%)	The amino acid homology(%)
鲀形目	<i>Takifugu rubripes</i>	AJ421455	99.0	99.1
鲀形目	<i>Masturus lanceolatus</i>	AF006239	81.8	92.3
鲀形目	<i>Mola mola</i>	AF006238	81.1	92.3
鲈形目	<i>Thunnus thynnus</i>	AF003091	80.4	92.3
鲑形目	<i>Salmo salar</i>	U12143	79.1	90.4
鲟形目	<i>Acipenser stellatus</i>	AJ585050	78.4	89.4
鳗鲡目	<i>Anguilla japonica</i>	AB038556	76.3	86.5
鲈形目	<i>Paralichthys olivaceus</i>	AB028664	75.3	83.4
鲃形目	<i>Gambusia affinis</i>	AF004422	74.7	86.0
角鲨目	<i>Squalus acanthias</i>	Y18143	74.5	88.4
鲤形目	<i>Cyprinus carpio</i>	X61010	72.9	88.4

DNA 分析软件 Clustal X 将暗纹东方鲀线粒体 *CO II* 基因的序列及其推导的氨基酸序列与 9 个目 11 种鱼的 *CO II* 核苷酸序列和推导的氨基酸序列比较,结果显示具有良好的同源性(表 1),与硬骨鱼纲 8 个目的核苷酸序列之间的同源性在 72.9% ~ 99.0%,与软骨鱼纲 (Chondrichthyes) 角鲨目 (Squaliformes) 白斑角鲨 (*Squalus acanthias*) 的同源性为 74.5%,与同目

矛尾翻车鲀 (*Masturus lanceolatus*) 和翻车鲀 (*Mola mola*) 的同源性为 81.8% 和 81.1%,而与同属红鳍东方鲀的同源性最高达 99.0%。氨基酸序列的同源性比较也显示了相似的结果,与同纲 8 个目之间的同源性在 83.4% ~ 99.1%,与白斑角鲨的同源性为 88.4%,与矛尾翻车鲀和翻车鲀的同源性为 92.3%,而与红鳍东方鲀的同源性最高为 99.1%。

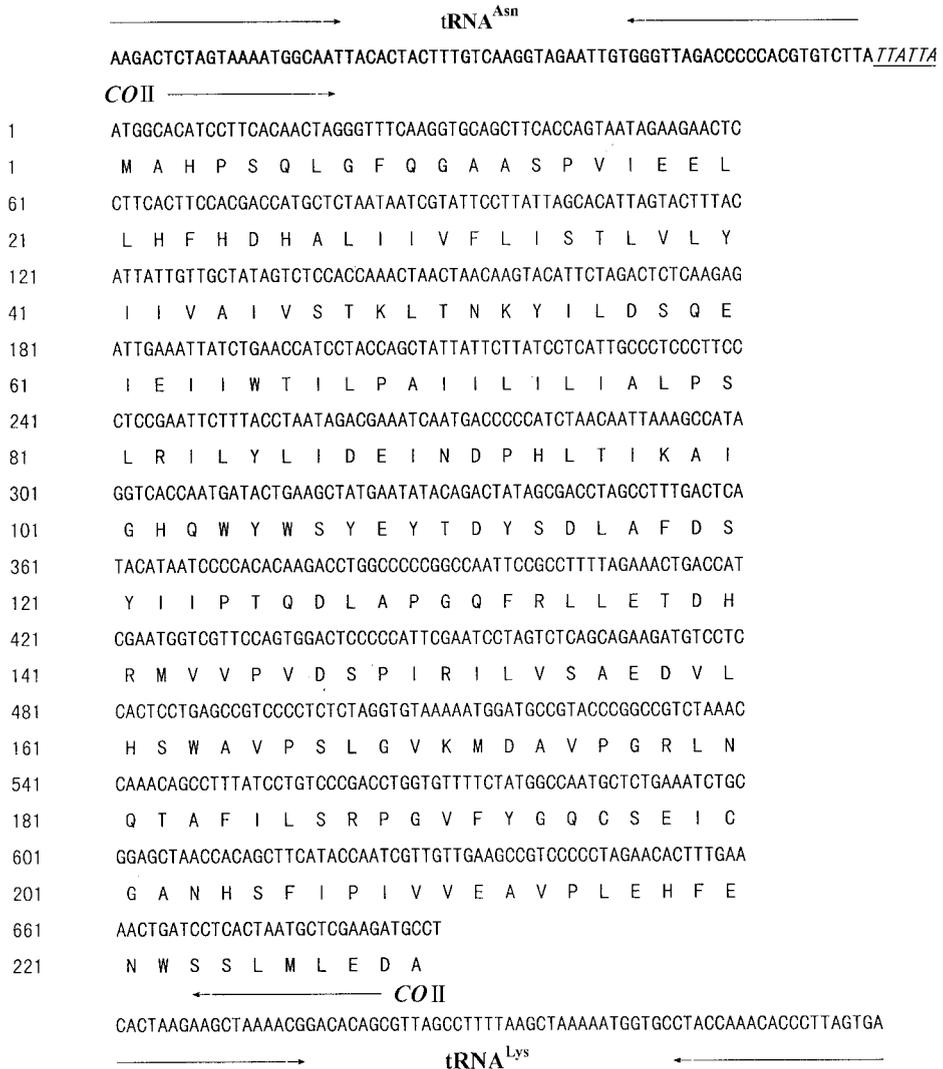


图 3 暗纹东方鲀线粒体 *CO II* 基因的核苷酸全序列和推测的氨基酸序列以及 tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Lys</sup> 基因的核苷酸序列

Fig.3 Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of *T. fasciatus* mtDNA *CO II* gene, tRNA<sup>Asn</sup> gene and tRNA<sup>Lys</sup> gene

表 2 暗纹东方鲀与其他 11 种鱼类线粒体基因组 *CO II* 基因碱基组成及密码子比较Table 2 Comparison of base composition and codons of *CO II* genes in *T. fasciatus* and other species

品种 Species	核苷酸总数 Nucleotide length	氨基酸总数 Number of amino acid	A + T 含量 Ratio of A + T ( % )	第一位点 A + T Ratio of A + T on the 1 <sup>st</sup> site( % )	第二位点 A + T Ratio of A + T on the 2 <sup>nd</sup> site( % )	第三位点 A + T Ratio of A + T on the 3 <sup>rd</sup> site( % )	富 G + C/A + T 密码子 Ratio of rich codons
<i>Takifugu fasciatus</i>	691	230	56	42	66	59	0.82
<i>Takifugu rubripes</i>	691	230	56	42	66	59	0.80
<i>Mola mola</i>	691	230	56	42	66	59	0.91
<i>Masturus lanceolatus</i>	691	230	55	42	66	58	0.91
<i>Thunnus thynnus</i>	691	230	56	42	66	60	0.81
<i>Cyprinus carpio</i>	690	230	57	41	66	62	0.90
<i>Anguilla japonica</i>	691	230	58	42	66	67	0.88
<i>Gambusia affinis</i>	691	230	56	41	66	64	0.80
<i>Paralichthys olivaceus</i>	691	230	56	49	67	71	0.87
<i>Salmo salar</i>	691	230	56	43	67	59	0.90
<i>Acipenser stellatus</i>	691	230	55	41	66	57	0.83
<i>Squalus acanthias</i>	691	230	62	43	66	58	0.76

由表 2 可见,硬骨鱼纲 11 种鱼类 *CO II* 由 690 ~ 691 个碱基组成,编码 230 个氨基酸。*CO II* 基因序列中没有发现任何碱基的缺失或插入。11 种鱼类 *CO II* 基因的起始密码均为 ATG,暗纹东方鲀及大多数鱼类 *CO II* 基因的终止密码子仅一个“T”,需经添加 polyA 后才形成终止密码子。暗纹东方鲀 *CO II* 基因的核苷酸组成中,A + T 含量为 56% (A,28.1%;T,27.1%;C,29.7%;G,15.2%),与硬骨鱼亚纲其

他 11 种鱼类的 A + T 含量(55% ~ 58%)相近,比较骨鱼白斑角鲨的 A + T 含量(62%)低。

11 种鱼的 *CO II* 序列的平均碱基组成是 A,29.0%;T,26.8%;C,27.7%;G,16.5%。其中,密码子第一位点没有显示碱基组成的偏好,第二位点 T 的含量稍微偏高(T = 38.0%),但是第三位 G 的含量明显偏低(G = 6.8%),A、C 的含量基本相近(A = 36.3%;C = 33.1%) (表 3)。

表 3 12 种鱼类 *CO II* 基因密码子各位点的碱基替换分析Table 3 Numbers and frequencies of nucleotide substitution in *CO II* genes between *T. fasciatus* and other species

	第一位点 The 1 <sup>st</sup> site	第二位点 The 2 <sup>nd</sup> site	第三位点 The 3 <sup>rd</sup> site	所有位点 All sites	第一、二位点 The 1 <sup>st</sup> and the 2 <sup>nd</sup> sites
多态性核苷酸位点比例 Comparison of varied nucleotide sites( % )	32.0	9.13	94.8	45.3	20.6
转换数 Transition ,TS	17	2	59	78	19
颠换数 Transversion ,TV	5	2	49	56	7
替换总数 Total nucleotide substitution	22	4	108	134	26
碱基总数 Total of bases	231	230	230	691	461
替换率 Frequencies of nucleotide substitution( % )	9.52	1.74	46.9	19.4	5.63
转换/颠换 ( TS/TV )	3.20	1.10	1.20	1.40	2.15
碱基 A 的含量 Ratio of A( % )	23.0	27.7	36.3	29.0	25.4
碱基 C 的含量 Ratio of C( % )	26.7	23.4	33.1	27.7	25.1
碱基 G 的含量 Ratio of G( % )	31.7	10.9	6.8	16.5	21.3
碱基 T 的含量 Ratio of T( % )	18.5	38.0	23.8	26.8	28.3

参照 Crozier 等<sup>[17]</sup>提出的富 G + C 密码子 (G + C-rich codon)与富 A + T 密码子(A + T-rich codon)比值,基于推导的 12 种鱼 CO II 多肽链的氨基酸组成,估计密码子使用模式的偏倚情况,其中富 G + C 密码子的氨基酸包括 Pro、Ala、Arg 和 Gly,富 A + T 密码子的氨基酸包括 Phe、Ile、Met、Tyr 和 Asn。在暗纹东方鲀的 CO II 多肽链中,由氨基酸组成估计的密码子使用模式,即富 G + C/富 A + T 密码子的比值为 0.82,这与其他 11 种鱼类的富 G + C/富 A + T 密码子的比值(0.80~0.91)也较相近(表 2)。鱼类 CO II 的序列组成对 A + T 核苷酸的偏倚程度比较低,这与孙红英等对中华绒螯蟹的研究分析结果一致<sup>[18]</sup>。但对使用与富 A + T 密码子的偏倚程度较有关的昆虫研究报道值低<sup>[19]</sup>。

暗纹东方鲀线粒体 CO II 与其他 9 个目鱼类的线粒体 CO II 相比(表 3),有 134 个多态性

核苷酸位点(45.3%),密码子第一位点和第二位点的替换率分别为 9.52% 和 1.74%,较第三位点(46.91%)的低得多,表明第三位点的碱基取代速率明显高于第一位点和第二位点。而且在各位点的碱基替换分析中表明,第三位点转换/颠换值虽仅为 1.20,但转换数与颠换数的绝对值最高(59/49),表明进化过程中,种属间发生了大量的碱基替换事件。东方鲀属两个种间只有 7 个碱基的转换(替换率 3.0%),没有颠换,而鲀科与翻车鲀科的碱基替换率达到了 14.6%左右。可见,同属间的替换以转换为主,而科间的替换中,颠换数已接近转换数。在传统分类学基础上,利用 mtDNA 的 Cyt b 以及细胞色素氧化酶(CO I, CO II, CO III)等基因从分子水平进行鱼类种属间的系统发育分类及良种标记具有广阔的前景<sup>[1, 20, 21]</sup>。

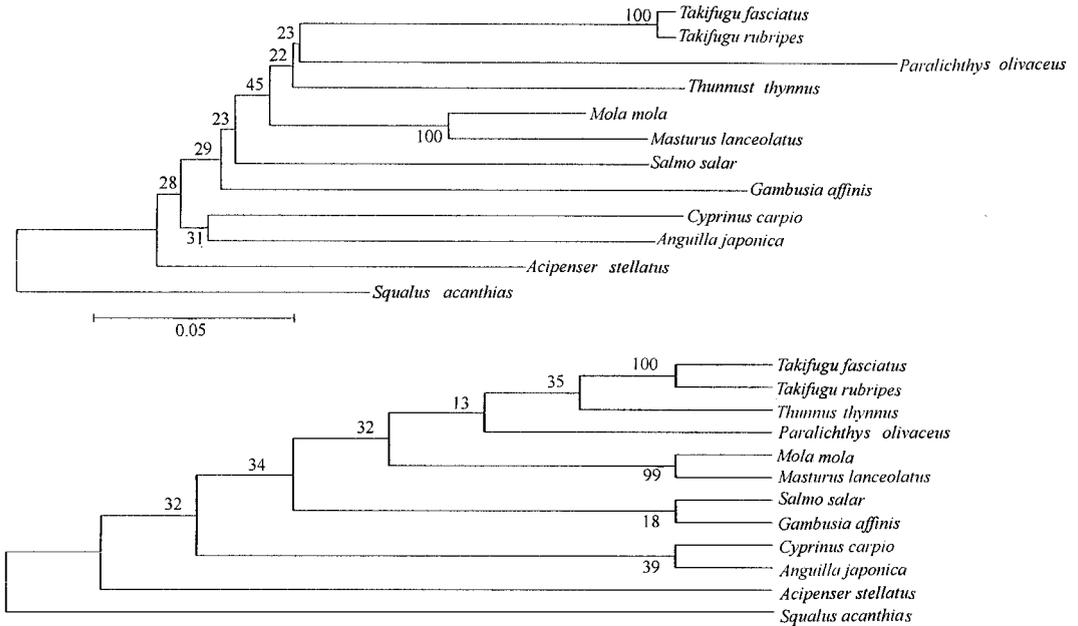


图 4 根据暗纹东方鲀等 12 种鱼 CO II 基因序列构建的分子系统树(上: NJ 树;下: MP 树)

Fig.4 The phylogenetic trees derived from the CO II nucleotide sequences of *T. fasciatus* and other 11 kinds of fish (Up: NJ Tree; Down: MP Tree)

*Takifugu fasciatus*(暗纹东方鲀);*Takifugu rubripes*(红鳍东方鲀);  
*Mola mola*(翻车鲀);*Masturus lanceolatus*(矛尾翻车鲀);*Thunnus thynnus*(金枪鱼);*Cyprinus carpio*(鲤);  
*Anguilla japonica*(日本鳗鲡);*Gambusia affinis*(食蚊鱼);*Paralichthys olivaceus*(牙鲆);  
*Salmo salar*(鲑);*Acipenser stellatus*(闪光鲟);*Squalus acanthias*(白斑角鲨)。

2.2.2 以 CO II 基因为基础的分子系统进化树的构建 应用 MEGA 中 Kimura's 2-Parameter 模型计算遗传距离、由 NJ 和 MP 法构建了 9 个目 12 种鱼 mtDNA CO II 基因的聚类分析图和分子系统树(图 4), NJ 聚类分析图的枝长表示分歧度 枝上的数值是 bootstrap 1 000 次后的置信值。构建的 NJ 树和 MP 树在拓扑结构上基本一致。由构建的 MP 分子系统树可见,根据 CO II 基因序列获得的分类结果与传统分类结果、系统发育演化基本吻合。

我国东方鲀属已报道的有 22 个种<sup>[6,7]</sup>。成庆泰等依据东方鲀属鱼类头骨的形态特征,结合外部形态和地理分布,深入探讨了其中 15 种的种间关系,将东方鲀属的 15 个种分为二大支,暗纹东方鲀和红鳍东方鲀分属地理分布局限于北太平洋西部一支的第四和第五小支<sup>[6]</sup>。本研究结果表明,上述二种鱼类 CO II 基因核苷酸序列之间的同源性(99.0%)、氨基酸序列间的同源性(99.1%)比较以及分子系统树的研究结果与成庆泰等的结论一致。

在分子系统学研究中,目的基因的选择非常重要。暗纹东方鲀线粒体 CO II 基因构建的分子系统树在各支点的支持率低于 Cyt b 基因。Zardoya 等考察了脊椎动物 mtDNA 基因上 13 个蛋白编码基因包含的系统发育信息情况,

不考虑数据处理和加权的方法,将 13 个基因分为好、中、差三组。好的一组基因含有良好的系统发育信息:ND4、ND5、ND2、Cyt b 和 CO I;中等的一组基因含有一定的系统发育信息:CO II、CO III、ND1 和 ND6;差的一组基因不能很好地提供系统发育信息:ATPase6、ND3、ATPase8 和 ND4L<sup>[22]</sup>。CO II 基因构建的 NJ 树和 MP 树各节点支持率较低表明,对于鱼类,CO II 基因并不适合作为高分类阶元的系统发育标记。而一些昆虫研究学者则认为 CO II 基因是非常有效的分子标记<sup>[19,23,24]</sup>,特别是对属内不同种、种内不同亚种或不同地理型之间的物种鉴定。据此推测,CO II 可能成为东方鲀属不同种间聚类分析与分子系统进化学研究的合适基因。分子分类依据的优劣评价不同,可能与所研究的物种不同有关系。从本研究结果看,根据 mtDNA CO II 基因构建的分子系统进化树,尽管可反映这一组物种的亲缘关系,然而鱼类物种数目多,所处的生态环境、迁移活动范围及繁殖方式各异,所以遗传变异较为丰富,进行分子进化分析时,往往与形态分类有所矛盾。因此,在采用线粒体基因序列进行分子进化分析时,应该综合考虑其繁殖模式及生态特点,将分子与形态、生态行为和化石等多方面的证据结合起来,方可对生物多样性和物种进化作出更客观的描述和解释。

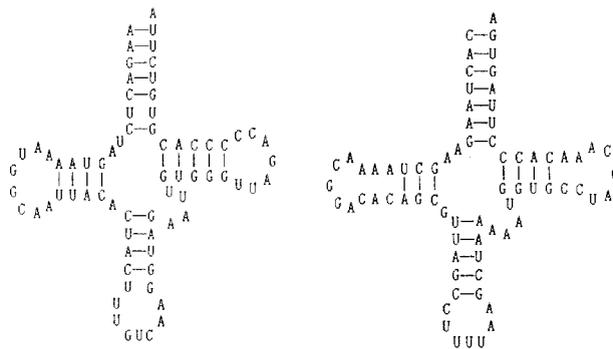


图 5 推定的暗纹东方鲀线粒体 tRNA<sup>Asn</sup>(GAC) (左) tRNA<sup>Lys</sup>(AAA) (右) 二级结构

Fig.5 Deduced secondary structures of mitochondrial tRNA<sup>Asn</sup>(Left) and tRNA<sup>Lys</sup>(Right) genes

2.3 tRNA 基因 暗纹东方鲀线粒体 CO II 基因两侧各有一个 tRNA 基因,其中,5'端上游的

tRNA<sup>Asn</sup> 基因由 72 个碱基组成,3'端下游的 tRNA<sup>Lys</sup> 基因由 73 个碱基组成。推定的 tRNA<sup>Asn</sup> 和 tRNA<sup>Lys</sup> 的二级结构模型如图 5 所示,都为典

型的二叶草型结构。

## 参 考 文 献

- [1] 肖武汉,张亚平.鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化.水生生物学报,2000,24(4):384~391.
- [2] 郭新红,刘少军,刘巧等.鱼类线粒体研究新进展.遗传学报,2004,9(31):983~1000.
- [3] Meyer A. Evolution of mitochondria DNA in fishes. *Biochem and Mol Bio of Fishes*, 1993, 2:1~38.
- [4] Miyaki K, Tableeta O, Kayano H. Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu*. *Fishes Science*, 1995, 61(4):594~598.
- [5] 张春霖.黄渤海鱼类调查报告.北京:科学出版社,1955,309~329.
- [6] 成庆泰,王存信,田明诚等.中国东方鲀属鱼类分类研究.动物学报,1975,21(4):359~378.
- [7] 王奎旗,陈梅,高天翔.东方鲀属鱼类的分类与区系分布研究.青岛海洋大学学报,2001,31(6):855~860.
- [8] 王金星,赵小凡.鲀形目三种鱼的染色体研究.动物学研究,1993,14(4):345~346.
- [9] 余多慰,华元渝,顾志峰等.暗纹东方鲀(*Takifugu obscurus*)核型研究.南京师范大学学报(自然科学版),2002,25(2):121~122.
- [10] 王可玲,张培军,尹青等.东方鲀属鱼类肌浆蛋白的种间差异及其聚类的分析.海洋与湖沼,1984,15(5):493~499.
- [11] 刘玲玲,李悦民,陆佩洪等.暗纹东方鲀同工酶生化表现型的研究.遗传,1998,20(2):23~26.
- [12] 刘振辉,石拓,柳学周等.RAPD 标记鉴别红鳍东方鲀和假睛东方鲀种群的初步研究.海洋湖沼通报,1999,(4):38~41.
- [13] 周巍,杨焕明,刘国仰.河鲀鱼与人类基因组计划.遗传,1997,19(6):37~40.
- [14] 吴乃虎,王钢锋,阎景智等.草鱼和鲤鱼线粒体 DNA 的分离纯化及其 *CO I* 基因的分子克隆.动物学报,1991,37(4):375~382.
- [15] Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor-Laboratory Press, 2001. 26~118, 611~627.
- [16] Kumar S, Tamura K, Jackbosen I B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software. Arizona, USA: Arizona State University Press, 2001.
- [17] Crozier R H, Crozier Y C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization. *Genetics*, 1993, 133(1):97~117.
- [18] 孙红英,周开亚,龚美蓉等.中华绒螯蟹线粒体 *CO II* 基因全序列测定.南京师范大学学报(自然科学版),2001,24(4):88~92.
- [19] 邵红光,张亚平,柯欣等.南极鳕线粒体 *CO II* 基因序列及无翅类昆虫的分子进化.中国科学(C辑),2000,30(3):330~336.
- [20] 项方,邹记兴,邓凤姣等.用细胞色素 *b* 部分序列研究斑马鱼的分子分类与系统发育.动物学杂志,2004,39(5):13~18.
- [21] 王成辉,李思发.中国红鲢线粒体 *CO II* 的遗传变异和亲缘关系.遗传学报,2004,11(31):1226~1231.
- [22] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(7):933~942.
- [23] 沈兴家,赵巧玲,张志芳等.蓖麻蚕线粒体基因组中 *nd1* 及其侧翼 tRNA 基因的克隆与结构分析.蚕业科学,2002,28(4):289~293.
- [24] 陈复生,魏兆军,李庆宝等.蓖麻蚕线粒体基因组中 *cox2* 基因的克隆、序列测定和分子系统学分析.蚕业科学,2004,30(1):38~43.