

# 暗纹东方鲀线粒体基因组核苷酸全序列测定与分析

邵爱华<sup>①②</sup> 杜建<sup>①</sup> 陈葵<sup>①</sup> 盛焯<sup>①</sup> 郑峰丰<sup>①</sup> 史全良<sup>①</sup> 沈卫德<sup>①</sup> 朱江<sup>①\*</sup>

(<sup>①</sup> 苏州大学医学部 基础医学与生物科学学院 苏州 215123; <sup>②</sup> 苏州科技学院 化学与生物工程学院 苏州 215009)

**摘要:**以暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)肝的线粒体DNA为模板,参照红鳍东方鲀(*T. rubripes*)等近源鱼类的线粒体基因组DNA序列,设计合成14对特异引物,进行PCR扩增并测序,首次获得了暗纹东方鲀线粒体基因组全序列。结果表明,暗纹东方鲀线粒体基因组序列全长16 444 bp(GenBank登录号为GQ409967),A+T含量为55.8%,其mtDNA结构与其他脊椎动物相似,由22个tRNA基因、2个rRNA基因、13个蛋白质编码基因和1段819 bp非编码的控制区(D-loop)所组成。蛋白质基因除CO I和ND6的起始密码子为GTG、CCT以外,均为典型的起始密码子ATG。ND1、ATPase8、CO III、ND4L、ND5、Cyt b使用典型的终止密码子TAA,其他的使用不完全终止密码子。除ND6和tRNA<sup>Gln</sup>、tRNA<sup>Ala</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Cys</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>Ser</sup>、tRNA<sup>Glu</sup>、tRNA<sup>Pro</sup>在L-链上编码之外,其余基因均在H-链编码。基因排列顺序与已测定的鲀类一致,这显示了鲀类线粒体基因排列顺序上的保守性。tRNA基因核苷酸长度为64~73 nt,预测了22个tRNA基因的二级结构,均呈较为典型的三叶草状。基于19种鲀类mtDNA全序列构建的进化树表明,暗纹东方鲀与红鳍东方鲀、中华东方鲀(*T. chinensis*)聚成一个姊妹群。结果还支持东方鲀属鱼类为一单系类群。

**关键词:**暗纹东方鲀;线粒体基因组;全序列分析

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2010)05-18-11

## Sequence and Analysis of the Complete Mitochondrial Genome of *Takifugu fasciatus*

SHAO Ai-Hua<sup>①②</sup> DU Jian<sup>①</sup> CHEN Kui<sup>①</sup> SHENG Ye<sup>①</sup> ZHENG Feng-Feng<sup>①</sup>

SHI Quan-Liang<sup>①</sup> SHEN Wei-De<sup>①</sup> ZHU Jiang<sup>①\*</sup>

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

<sup>②</sup> Chemical and Biological Engineering Institute, Suzhou Science and Technology College, Suzhou 215009, China)

**Abstract:**The nucleotide sequence of the complete mitochondrial DNA (mtDNA) genome was determined in *Takifugu fasciatus*. DNA sequencing was based on PCR fragments from 14 primer pairs that were designed on the basis of mtDNA sequences of other related *Takifugu* species. The entire mitochondrial genome of *T. fasciatus* (GenBank accession no. GQ409967) was composed of 16 444 base pairs (bp) in length with 55.8% A + T content, which coded for 22 tRNAs, 2rRNAs, 13 protein-coding genes, as well as a control region (D-loop) of 819 bp, as was characteristic for mitochondrial genomes of other metazoans. All protein-coding genes of the *T. fasciatus* mitochondrial genome started with a typical ATG codon, except for CO I and ND6 with GTG

基金项目 农业部行业标准资助项目(No. 2002-04084) 苏州科技学院2005年度科研基金项目(No. 2005-Z862);

\* 通讯作者, E-mail: sdzjyz@hotmail.com;

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

收稿日期:2010-03-17,修回日期:2010-07-02

and CTT. The usual TAA termination codons were found for *ND1*, *ATPase8*, *CO III*, *ND4L*, *ND5* and *Cyt b*, however, the other 7 protein-coding genes had an incomplete termination codons (T or TA). It was confirmed that the gene arrangement of *T. fasciatus* could be used to identify other Tetrodontiformes fishes. Transfer RNA (tRNA) genes ranged in length from 64 to 73 nt, and their planar structures showed characteristic clover leaf. Construction of phylogenetic trees based on the entire mitochondrial genome sequence of 19 Tetrodontiformes species constructed by NJ and MP method has suggested that the *T. fasciatus* has closer relationship to the *T. rubripes* and *T. chinensis*, and that they constitute a sister group. The results also suggest that the genus *Takifugu* (Tetrodontiformes, Tetraodontidae) can be treated as a monophyletic group.

**Key words:** *Takifugu fasciatus*; Mitochondrial genome; Sequence analysis

暗纹东方鲀 (*Takifugu fasciatus*) 属硬骨鱼亚纲鲀形目鲀科东方鲀属, 为分布集中于中国、朝鲜的地区性鱼类。我国东方鲀属鱼类共有 22 种, 除 2 种分布范围达印度洋之外, 其余种均分布于南海、东海及黄渤海等海域<sup>[1-4]</sup>。1995 年, 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>[5-6]</sup>。

自 PCR 技术和直接测序方法广泛应用后, 鱼类线粒体 DNA (mitochondrial DNA) 作为一个相对独立的复制单位具有分子小、结构简单、进化速率快、不同区域进化速率存在差异等特点, 使其成为了鱼类分子遗传学、系统发育进化及物种鉴定系统的可靠标记。目前, 国内外已有大量的有关于 mtDNA 的信息、结构和功能遗传、系统进化的应用研究<sup>[7-10]</sup>, 尤其是, 越来越多的鱼类 mtDNA 全序列已进行了测定<sup>[11-17]</sup>。其中, 东方鲀属鱼类 mtDNA 全序列研究并不多见, 2002 年 Elmerot 等报道了红鳍东方鲀 mtDNA 全序列<sup>[18]</sup>, 2009 年 Yamanoue 等运用 mtDNA 全序列探讨了东方鲀属类群在进化生物学中的意义<sup>[19]</sup>。近几年来, 我们课题组以东方鲀属中分化程度适中、取材方便且有较高经济价值的暗纹东方鲀为研究对象, 陆续报道了线粒体相关基因的克隆<sup>[20-26]</sup>。迄今, 国内只有关于暗纹东方鲀线粒体基因序列的研究<sup>[27-28]</sup>, 但尚未见暗纹东方鲀 mtDNA 全序列的报道。

本研究试图在前期线粒体 DNA 基因序列测定分析的基础上, 测定暗纹东方鲀 mtDNA 全序列, 对其序列进行拼接、注释, 以及序列组成、结构特征等的生物信息学分析, 同时结合研究结果探讨暗纹东方鲀与 GenBank 中东方鲀属

鱼类间系统发生与演化上的关系, 为线粒体基因组全序列在进一步探究物种进化关系和系统发育分析等方面提供基础资料。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 实验暗纹东方鲀 (养殖体, 15 尾 8~9 月龄, 平均体长为 20.2 cm, 平均体重为 350 g) 购自苏州南门水产品市场。活体解剖, 取新鲜的肝、肌肉组织 -70℃ 保存备用。

**1.2 线粒体基因组总 DNA 的提取** 参考吴乃虎等<sup>[29]</sup>的方法, 取肝组织 2 g 提取 mtDNA, 4℃ 保存备用。

**1.3 引物设计和 PCR 扩增** 参照红鳍东方鲀 (GenBank 序列号: AJ421455) 等线粒体全基因组, 利用 Clustal X 和在线 BLAST 进行序列比较, 再用 Primer Premier 5.0 设计了 13 对可覆盖暗纹东方鲀线粒体基因组全序列的引物 (表 1)。

PCR 反应体系: 10 × Buffer 2.5 μl, dNTP 2 μl (2.5 mmol/L), 模板 DNA 5 μl (约 1 μg), 上下游引物 P1、P2 各 1 μl (10 pmol/L), LA Taq 聚合酶 (Takara) 1 U, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μl。扩增条件: 每个循环包括 94℃ 变性 30 s, 50~56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后一次循环结束后, 72℃ 延伸 10 min。

扩增产物用 1.0% 琼脂糖电泳进行检测, 用 DNA Fragment Recovery Kit (Takara 公司产品) 纯化回收, PCR 纯化产物进行直接测序或克隆测序 (克隆使用的载体为 pMD18-T, Takara 公司产品), 委托上海生工生物工程技术服务有限公司测序 (ABI PRISM 377 型测序仪) 完

成。利用 DNASTAR 和测序峰图分析软件 Chromas 2.22 对测序结果进行序列拼接。在拼接中发现仍存在个别空隙处,又设计了相应的特异性引物(L14/H14,表1),再通过测序将空

隙处填补,最终拼接成一个完整的 mtDNA。所有引物序列委托上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

表 1 暗纹东方鲀线粒体基因组全序列扩增引物  
Table 1 PCR and sequencing primers for *Takifugu fasciatus*

编号 NO.	上游引物 Forward primer	序列 Sequences (5'-3')	下游引物 Reverse primer	序列 Sequences (5'-3')	产物长度 Product length (bp)
1	L1	TGAAAGTCCCGCAGGC	H1	GCGTCAACTCGGTGTAAGG	1 015
2	L2	GAGGCAAGTCGTAACATGGTAAGT	H2	GGTTGGAGGAGTCCGTAAGGT	1 740
3	L3	GGAGTAATCCAGGTCAGTTTCTA	H3	TGCTCGTGGGTGTTG	1 600
4	L4	CAATATGATACATCTCCACGCTAG	H4	ATGAAGAGAGAAGATGGTGAGGTC	2 504
5	L5	GCAATCTAACATGTAAACACC	H5	CTACCTTGACAAAAGTAGTG	1 766
6	L6	CCACTCTGTCACCTTCTT	H6	ACTCAACCCCGCACCC TTG	870
7	L7	CACCCTTAGTGAAATGCC	H7	AGCGACTGCTCCTGTTAG	1 884
8	L8	CTCTATCTACAAGAAAACGT	H8	GATGAGGGATAAAGCTGTG	890
9	L9	ACGTTTAATGGCCCATCAAGCAC	H9	ATGAGAATACCTCCAACCTACCAG	2 484
10	L10	ACACACAGCCGAACATACTACTTG	H10	ATTAATCCAATGTCTCCGACTCGA	2 493
11	L11	TTCCAAAGATGCCATCATCGAATC	H11	TTCCAAAGATGCCATCATCGAATC	2 018
12	L12	GAAAAACAAGCGCATAAAACA	H12	CAAAAAGAAGGGACTTCAAC	1 327
13	L13	TCTTGTAACCGAATGTC	H13	GCGTAGCTTAACCAAAGC	960
14	L14	TGAGGGACAATAACAG	H14	CCAACCTCCTATTTC	791

1.4 mtDNA 片段拼接及序列分析 对于测定的 DNA 片段序列首先采用电脑软件 Sequence Analysis 3.4.1 和 Seqman 5.05 进行拼接分析。通过对红鳍东方鲀、青黑斑河鲀 (*Tetraodon nigroviridis*, AP006046) 等的线粒体基因组序列进行比对,确定暗纹东方鲀 mtDNA 上蛋白质编码基因、tRNA 基因、rRNA 基因的位置。应用 MEGA 3 统计线粒体基因组中的基因间隔和重叠、碱基组成、氨基酸编码情况。用 RNADraw1.1b2 和 RNAstructure 3.7 软件对 tRNA 二级结构进行分析和预测。

采用 Clustal X 软件比较暗纹东方鲀与其他鱼类核苷酸序列和氨基酸序列的同源性。应用 MEGA 3 的邻接法 (NJ) 和最大简约法 (MP) 构建分子系统树,置信度 (bootstrap) 1 000 次循环检查。

## 2 结 果

2.1 暗纹东方鲀线粒体全序列基因组组成与排列 暗纹东方鲀线粒体基因组全序列全长为

16 444 bp (GenBank 序列号:GQ409967)。其由 22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因 (12S rRNA 和 16S rRNA)、控制区 (D-环区, D-loop)、轻链复制起始区和 13 个疏水性蛋白质多肽组成。

暗纹东方鲀线粒体基因组有 9 处基因间隔区,共 65 bp,最长的间隔位于 tRNA<sup>Asn</sup> 和 tRNA<sup>Cys</sup> 之间,为 34 bp;还存在 13 个基因重叠现象,共 37 bp。12S rRNA 和 16S rRNA 的长度分别为 947 bp 和 1 667 bp。蛋白编码基因包括 1 个细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, Cyt *b*)、2 个 ATP 合成酶亚基 (ATP synthase subunit; *ATPase8*, *ATPase6*)、3 个细胞色素氧化酶亚基 (Cytochrome oxidase subunit; *CO I*, *CO II*, *CO III*)、7 个 NADH 脱氢酶亚基 (NADH dehydrogenase subunit; *ND1*, 2, 3, 4L, 4, 5, 6) (表 2)。控制区位于 5'-tRNA<sup>Pro</sup> 和 3'-tRNA<sup>Phe</sup> 之间,长度为 819 bp。

基因的分布情况如图 1 所示,轻链 (L-strand) 编码 8 个 tRNA 基因 (Pro、Tyr、Ser、Ala、

Asn、Cys、Glu、Gln) 及 *ND6* 基因,其余 28 个基因皆由重链(H-strand)编码。

表 2 暗纹东方鲀线粒体基因组全序列的组成概况

Table 2 Organization and profile of the mitochondrial genome of *Takifugu fasciatus*

基因 Feature	位置 Position	间隔碱基 Intergenic nucleotide	密码子 Codon		碱基长度 Size (bp)	氨基酸 Amino acid (aa)	反密码子 序列/位置 Anti codon position	编码链 Strand
			起始 Start	终止 Stop				
tRNA <sup>Phe</sup>	1 ~ 68				68		GAA/31 ~ 33	H
12S rRNA	69 ~ 1 015	0			947			H
tRNA <sup>Val</sup>	1 016 ~ 1 088	0			73		TAC/35 ~ 37	H
16S rRNA	1 089 ~ 2 755	0			1 667			H
tRNA <sup>Leu</sup>	2 756 ~ 2 828	0			73		TAA/35 ~ 37	H
<i>ND1</i>	2 829 ~ 3 803	0	ATG	TAA	975	324		H
tRNA <sup>Ile</sup>	3 806 ~ 3 875	2			70		CAT/31 ~ 33	H
tRNA <sup>Gln</sup>	3 875 ~ 3 945	-1			71		TTG/31 ~ 33	L
tRNA <sup>Met</sup>	3 945 ~ 4 013	-1			69		GAT/31 ~ 33	H
<i>ND2</i>	4 014 ~ 5 059	0	ATG	TA +	1 046	348		H
tRNA <sup>Trp</sup>	5 060 ~ 5 130	0			71		TCA/32 ~ 34	H
tRNA <sup>Ala</sup>	5 132 ~ 5 200	1			69		TGC/32 ~ 34	L
tRNA <sup>Asn</sup>	5 203 ~ 5 276	2			74		GTT/35 ~ 37	L
tRNA <sup>Cys</sup>	5 311 ~ 5 374	34			64		GCA/37 ~ 39	L
tRNA <sup>Tyr</sup>	5 374 ~ 5 443	-1			70		GTA/26 ~ 28	L
<i>CO I</i>	5 445 ~ 7 004	1	GTG	T ++	1 560	520		H
tRNA <sup>Ser</sup>	6 996 ~ 7 066	-10			71		TGA/33 ~ 35	L
tRNA <sup>Asp</sup>	7 070 ~ 7 141	3			72		GTC/34 ~ 36	H
<i>CO II</i>	7 148 ~ 7 838	6	ATG	T ++	691	230		H
tRNA <sup>Lys</sup>	7 839 ~ 7 911	0			73		TTT/34 ~ 36	H
<i>ATPase8</i>	7 913 ~ 8 080	1	ATG	TAA	168	55		H
<i>ATPase6</i>	8 071 ~ 8 754	-10	ATG	TA +	684	227		H
<i>CO III</i>	8 754 ~ 9 539	-1	ATG	TAA	786	261		H
tRNA <sup>Gly</sup>	9 540 ~ 9 609	0			70		TCC/32 ~ 34	H
<i>ND3</i>	9 610 ~ 9 958	0	ATG	T ++	349	116		H
tRNA <sup>Arg</sup>	9 959 ~ 10 027	0			69		TCG/31 ~ 33	H
<i>ND4L</i>	10 029 ~ 10 325	1	ATG	TAA	297	98		H
<i>ND4</i>	10 319 ~ 11 699	-7	ATG	T ++	1 381	460		H
tRNA <sup>His</sup>	11 701 ~ 11 769	1			69		GTG/31 ~ 33	H
tRNA <sup>Ser</sup>	11 770 ~ 11 837	0			68		GCT/27 ~ 29	H
tRNA <sup>Leu</sup>	11 843 ~ 11 915	6			73		TAG/34 ~ 36	H
<i>ND5</i>	11 916 ~ 13 754	0	ATG	TAA	1 839	612		H
<i>ND6</i>	13 750 ~ 14 271	-5	CCT	T ++	522	173		L
tRNA <sup>Glu</sup>	14 272 ~ 14 340	0			69		TTC/33 ~ 35	L
<i>Cyt b</i>	14 345 ~ 15 481	4	ATG	TAA	1 137	378		H
tRNA <sup>Thr</sup>	15 485 ~ 15 556	3			72		TGT/33 ~ 35	H
tRNA <sup>Pro</sup>	15 556 ~ 15 625	-1			70		TGG/31 ~ 33	L
D-loop	15 626 ~ 16 444	0			819			H

间隔碱基一列中,正数表示基因间隔碱基数,负数表示基因重叠碱基数。

In the column of intergenic nucleotide, the positive number indicates interval base pairs between genes, while the negative number indicates overlapping base pairs between genes.

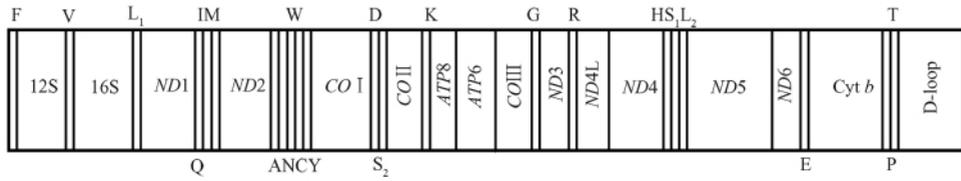


图 1 暗纹东方鲀线粒体基因组结构简图

Fig. 1 Gene organization for the mitochondrial genome of *Takifugu fasciatus*

tRNA 基因用氨基酸的单字母表示: F, V, I, M, W, D, K, G, R, H, T, Q, A, N, C, Y, E, P 分别表示 tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>; L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> 分别表示 tRNA<sup>Leu</sup> (CUN), tRNA<sup>Leu</sup> (UUR), tRNA<sup>Ser</sup> (AGN), tRNA<sup>Ser</sup> (UCN)。

The tRNA genes are designated by single letter amino acid codes (F, V, I, M, W, D, K, G, R, H, T, Q, A, N, C, Y, E, P denote the tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Ile</sup>, tRNA<sup>Met</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Lys</sup>, tRNA<sup>Gly</sup>, tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>His</sup>, tRNA<sup>Thr</sup>, tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Glu</sup>, tRNA<sup>Pro</sup>); L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, S<sub>1</sub> and S<sub>2</sub> denote the tRNA<sup>Leu</sup> (CUN), tRNA<sup>Leu</sup> (UUR), tRNA<sup>Ser</sup> (AGN) and tRNA<sup>Ser</sup> (UCN)。

2.2 暗纹东方鲀线粒体 DNA 基因组蛋白质编码基因分析 13 种蛋白编码基因总长为 11 435 bp, 占全基因组的 69.54%。ATPase8/ATPase6、ND4L/ND4、ND5/ND6 之间存在 5 ~ 10 bp 的基因重叠, 还发现有些与其他基因也有少许重叠。13 种蛋白编码基因中, 大多数以 ATG 为起始密码子, 而 COI 和 ND6 分别以 GTG 及 CCT 为起始密码子; ND1、ATPase8、CO III、ND4L、ND5、Cyt b 6 个以 TAA 为终止密码子, 其余 7 个则使用不完全终止密码子 (T, TA)。

所编码的 3 802 个的氨基酸中, 平均使用率从低到高依次为: Cys (C) 0.74、Asp (D) 2.00、Arg (R) 2.00、Lys (K) 2.05、Glu (E) 2.60、Gln (Q) 2.68、His (H) 2.71、Tyr (Y) 2.84、Met (M) 2.87、Trp (W) 3.05、Asn (N) 3.37、Val (V) 5.50、Pro (P) 5.81、Phe (F) 5.97、Gly (G) 6.13、Ser (S) 6.76、Thr (T) 8.02、Ala (A) 8.26、Ile (I) 9.42、Leu (L) 17.23 (表 3), Leu、Ile、Ala 和 Thr 的使用频率最高, 占有所有氨基酸的 42.93%。分析可知, 所编码的氨基酸中非极性氨基酸 (M, W, V, P, F, A, I, L) 所占比例最大为 60.98%, 其次是极性不带电氨基酸, 极性带电氨基酸最少 (R, K, H, D, E) 仅为 11.36%。

暗纹东方鲀线粒体 DNA 的蛋白质编码基因各碱基含量分别为: A, 30.2%; T, 26.0%; G,

14.6%; C, 29.0%; A + T 含量为 56.2%, 高于 tRNA 基因和 rRNA 基因的 A + T 含量, 但低于控制区的 (表 4)。另外, 在不同的密码子位置、全基因组以及不同基因组组成的各碱基使用也有一定的差异: 如密码子各位点 A + T 值均在 55% 之上, 也就是说 GC 含量均低于 AT (U) 含量。

表 3 暗纹东方鲀线粒体编码蛋白氨基酸组成  
Table 3 Amino acid compositions of protein-coding genes of mitochondrial genome in *Takifugu fasciatus*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	含量 (个) Composition (N)	比例 (%) Percent
Ala (A)	GCN	314	8.26
Arg (R)	CGN	76	2.00
Asn (N)	AAY	128	3.37
Asp (D)	GAY	76	2.00
Cys (C)	TGY	28	0.74
Gln (Q)	CAR	102	2.68
Glu (E)	GAR	99	2.60
Gly (G)	GGN	233	6.13
His (H)	CAY	103	2.71
Ile (I)	ATY	358	9.42
Leu (L)	CTN + TTR	655	17.23
Lys (K)	AAR	78	2.05
Met (M)	ATR	109	2.87
Phe (F)	TTY	227	5.97
Pro (P)	CCN	221	5.81
Ser (S)	AGY + TCN	257	6.76
Thr (T)	CAN	305	8.02
Trp (W)	TGR	116	3.05
Tyr (Y)	TAY	108	2.84
Val (V)	GTN	209	5.50

N: 编码蛋白氨基酸组成数量。

N: Number of amino acid compositions of protein-coding genes.

表 4 暗纹东方鲀线粒体基因组核苷酸组成

Table 4 Base compositions of the mitochondrial genome of *Takifugu fasciatus*

	A (%)	T (%)	G (%)	C (%)	A + T (%)	碱基个数 (n)
蛋白质编码基因 Protein-coding genes	30.2	26.0	14.6	29.0	56.2	11 435
密码子第一位点 1st code site	30.3	26.0	16.1	27.6	56.3	3 812
密码子第二位点 2nd code site	29.4	26.4	14.6	29.6	55.8	3 812
密码子第三位点 3rd code site	30.9	25.8	13.3	30.0	56.7	3 811
tRNA 基因 tRNA genes	32.1	24.0	18.6	25.3	56.1	1 590
rRNA 基因 rRNA genes	34.5	21.3	19.7	24.4	55.8	2 614
控制区 D-loop	35.7	32.1	13.2	19.0	67.8	819
全基因组 Whole genome	30.0	25.8	15.2	29.1	55.8	16 444

n: 碱基个数。n: Number of bases in corresponding sequence.

**2.3 tRNA 基因结构分析** tRNA 基因碱基含量分别为:A, 32.1%;T, 24.0%;G, 18.6%;C, 25.3%;A+T 含量高达 56.1% (表 4)。22 个 tRNA 基因的二级结构都为典型的三叶草状,包括 5~7 bp 的氨基酸接受臂、3~5 bp 的 T $\psi$ C 臂、4~5 bp 的反密码子臂和 3~4 bp 的 DHU 臂 (图 2)。tRNA 折叠存在碱基的错配,如 tRNA-Glu 的 DHU 臂及反密码子臂发生 A-G 错配和碱基不匹配现象。tRNA-Ser (AGY)、tRNA-Cys 二级结构利用在线软件无法查找到,使用 RNAstructure 3.7 分析和预测发现两者都缺少 DHU 臂。

**2.4 以 mtDNA 基因组为基础的分子系统进化树的构建** 比较暗纹东方鲀与 19 种鱼类 mtDNA 线粒体基因组的核苷酸序列同源性,结果显示,与鲀形目 18 种鱼的核苷酸序列之间具有良好的同源性:与东方鲀属 14 种鱼类,包括红鳍东方鲀、星点东方鲀 (*T. niphobles*, AP009526)、虫纹东方鲀 (*T. vernicularis*, AP009532)、弓斑东方鲀 (*T. ocellatus*, AP009536)、横纹东方鲀 (*T. oblongus*, AP009535)、黄鳍东方鲀 (*T. xanthopterus*, AP009533)、中华东方鲀 (*T. chinensis*, AP009534)、志斑东方鲀 (*T. chryrops*, AP009525)、花尾东方鲀 (*T. exascurus*, AP009540)、豹纹东方鲀 (*T. pardalis*,

AP009528)、斑点东方鲀 (*T. poecilonotus*, AP009539)、紫色东方鲀 (*T. porphyreus*, AP009529)、施氏东方鲀 (*T. snyderi*, AP009531)、密点东方鲀 (*T. stictonotus*, AP009530) 的核苷酸序列同源性均高达 95% 以上;与同目不同科的花冠扁背鲀 (*Canthigaster coronatus*, AP006743)、水纹扁背鲀 (*C. rivalatus*, AP006744)、青黑斑河鲀、翻车鲀 (*Mola mola*, NC005836) 4 种鲀的同源性为 76%~79% 左右。与软骨鱼亚纲角鲨目白斑角鲨 (*Squalus acanthias*, SAC18134) 的同源性为 71%。

选取上述 15 种东方鲀属鱼类的 mtDNA 线粒体全序列,以白斑角鲨和鲀形目不同科 4 种鱼类作为外类群,构建系统树。构建的 NJ 树和 MP 树在拓扑结构上基本一致,但存在着一定的差异 (图 3a, b)。所得结果均表明,东方鲀属鱼类构成了一个单系类群,NJ 树和 MP 树中所获的节点支持率均为 100。MP 树中,横纹东方鲀位于东方鲀属鱼类系统发育的基部位置;余下的 14 种东方鲀属鱼类构成了一个支系,其中又包括两支:紫色东方鲀位于此单系群的基部;另外 13 种东方鲀属鱼类聚成了 5 个姊妹群,其中暗纹东方鲀和红鳍东方鲀、中华东方鲀聚成一个姊妹群。但 5 个姊妹群的同属间节点支持率并不特别理想,存在低于 50 的值。

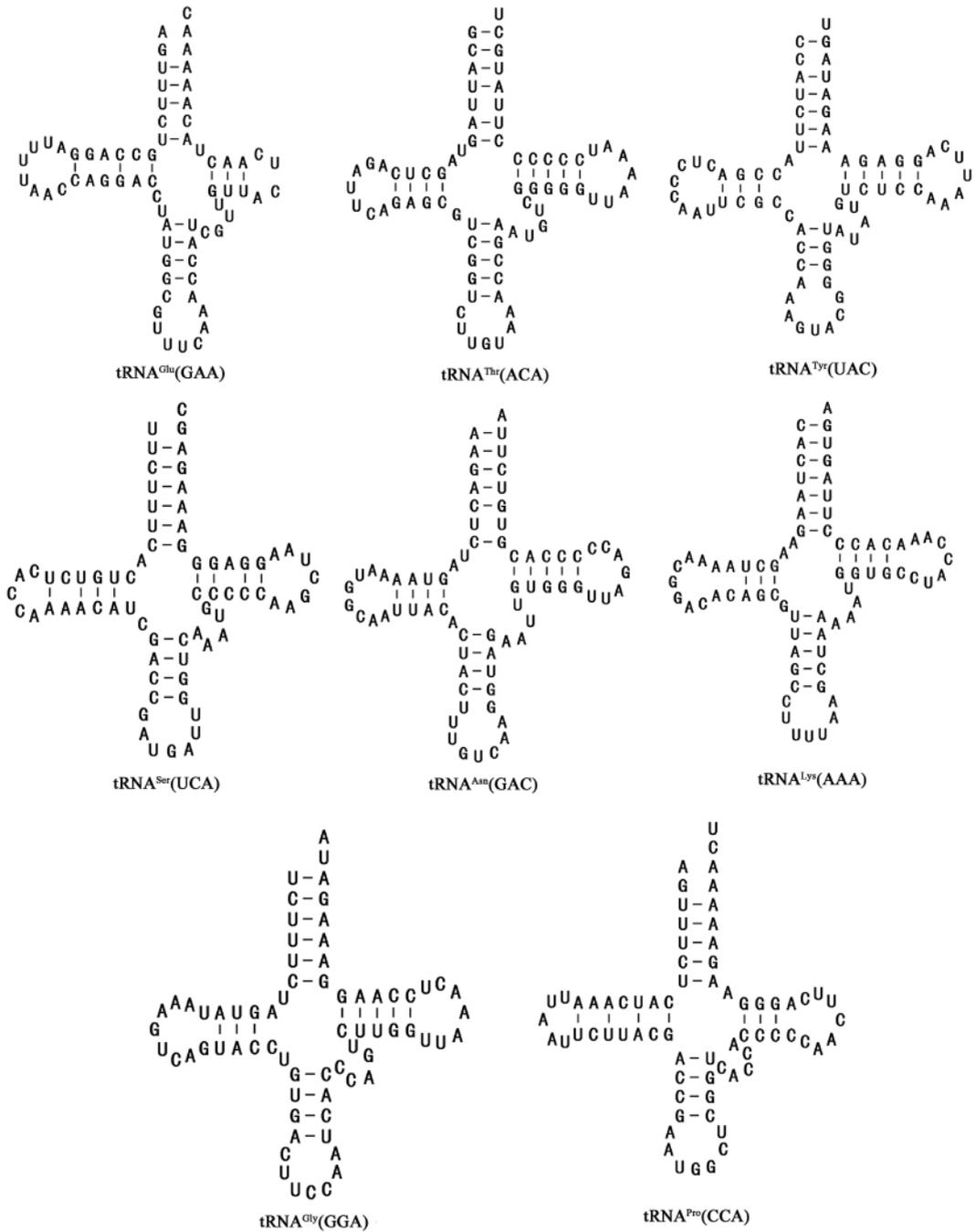


图 2 推断的暗纹东方鲀线粒体 tRNA 的二级结构(部分)

Fig. 2 Deduced secondary structures for tRNA genes from *Takifugu fasciatus* mtDNA

### 3 讨论

本文以 PCR 产物直接测序法测得并报道了东方鲀属的暗纹东方鲀线粒体全基因组序列

数据,其具有硬骨鱼类线粒体基因组的典型结构。已报道的 30 多种鲀形目鱼类线粒体基因组的全长大多在 16.5 kb 左右,其中编码区的长度固定在 15.4 ~ 15.6 kb 之间,非编码区(D-

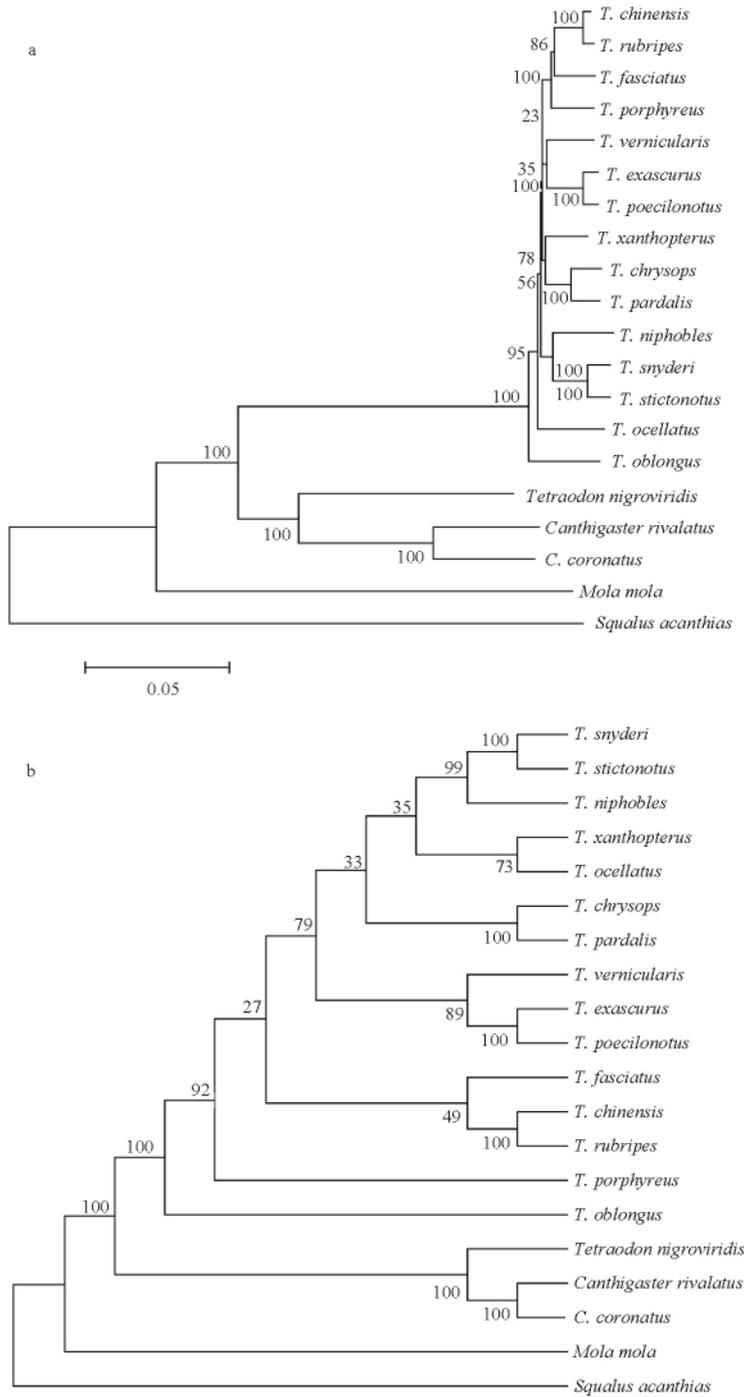


图 3 基于暗纹东方鲀等 20 种鱼类的线粒体基因组核苷酸全序列构建的分子系统树

Fig.3 Phylogenetic tree derived from *Takifugu fasciatus* and the other kinds of fish' mtDNA genome nucleotide sequences

a: NJ 树; b: MP 树。 a: NJ tree; b: MP tree.

loop) 长度差异较大<sup>[10, 18-19, 25, 30]</sup>。我们获得的暗纹东方鲀线粒体基因组的全长为 16 444 bp, 包括两个部分: 即长 15 639 bp 占基因组 95% 的编码区和长 819 bp 含有 H 链复制起点的非编码区 (D-loop), 用以编码两种 rRNA 基因 (12S rRNA 和 16S rRNA)、22 个 tRNA 以及 13 种参与线粒体能量代谢的蛋白质。暗纹东方鲀线粒体基因组结构非常紧凑: 相邻基因间不编码的核苷酸很少甚至没有, 一些相邻基因序列还存在碱基重叠现象。其所含基因的组成、排列次序、编码链的选择、tRNA 的结构、4 种碱基百分比比例, 比如较低的 G 的含量、编码 mtDNA 的基因时 AT(U) 偏好性以及蛋白质编码基因密码子第 3 位对碱基 A 的偏好等, 都与大多数其他脊椎动物相同或相近<sup>[10, 14, 17]</sup>。DNA 比较还表明: 标准终止密码子 (TAA) 只出现在 6 个蛋白质编码基因中, 还有一部分基因虽然其 DNA 序列中没有终止密码子, 不完全终止密码子 (T, TA) 在动物线粒体 DNA 中都很常见, 对此的解释是转录的 mRNA 会动用其 PolyA 尾完成终止密码子从而终止翻译。另外, 蛋白质编码序列之间核苷酸变化主要发生在密码子的第 3 位点, 替换大多数为同义替换, 一些研究认为, 这种核苷酸发生变化但所编码氨基酸序列没有改变的“同义取代”是线粒体系统在其较快的进化速度下维持蛋白质结构和功能稳定的方式之一<sup>[9, 14-16]</sup>。

暗纹东方鲀线粒体基因组结构具有高度保守性, 尤其在蛋白质编码和 rRNA 区域。基因组中的诸个特征均与其他鲀形目鱼类十分类似<sup>[13, 15, 18-19, 30]</sup>。暗纹东方鲀线粒体 DNA 的 tRNA 基因大多数位于各基因之间, 预测的 22 个 tRNA 基因都为较为典型的三叶草状, 其 tRNA 茎环结构中茎序列比较保守, 而环的序列及环的长度变化较大<sup>[23]</sup>。暗纹东方鲀线粒体 DNA 非编码区的位置、长度、基本结构以及碱基含量中富含 A + T 等方面的特点与已研究显示的其他种鱼类的控制区较为一致, 在基本结构中也较容易识别主要的功能单元。序列变化最大、进化速度最快的 D-loop 区已成为近缘类

群间的系统进化探讨的重要分子标记之一<sup>[10, 25, 28]</sup>。暗纹东方鲀线粒体 rRNA 基因具有较高的保守性, 同各种鱼类线粒体 DNA 序列的比较表明, rRNA 基因除位置比较保守外 [12S rRNA 基因位于 A + T 富集区的 5' 端和 tRNA<sup>Val</sup> 基因的 3' 端, 16S rRNA 基因位于 tRNA<sup>Val</sup> 基因的 5' 端和 tRNA<sup>Leu</sup> (CUN) 基因的 3' 端]<sup>[26]</sup>, 分子中还有若干不同长度的同源序列。由于 12S 和 16S rRNA 二级结构的结构域含有几十种茎环, 在不同的物种中不同位置的环的长度与大小均存在差异, 因此可以通过预测其二级结构的信息, 根据需求选择合适的基因区段来研究特定分类阶元的系统发育问题。

从本文中提供的 20 种鱼类的 NJ 树可以看出, 东方鲀属 15 种鱼类之间的遗传距离 (0.025 ~ 0.042) 十分相近, 反映出该属鱼类物种及个体间的关系非常密切。MP 树各节点支持率特别是在东方鲀同属间存在一些低于 50 的值, 但所建立的进化树与从形态学角度所得的阶元关系基本吻合<sup>[2, 4]</sup>。研究结果再次支持东方鲀属鱼类为一个单系类群<sup>[19, 27-28, 31-32]</sup>, 横纹东方鲀位于东方鲀属鱼类系统发育树的基部, 符合形态分类学者提出的东方鲀属鱼类起源的解释。可以直观看出, 暗纹东方鲀和中华东方鲀、红鳍东方鲀直接的关系比较接近, 这同已有的研究结果也是一致的<sup>[10, 25, 27-28]</sup>。一直以来, 关于鲀形目鱼类的物种数目、属间和种间 (特别是东方鲀属内部) 亲缘关系等说法不一, 目前已经积累了一些属内系统发育关系研究的形态学、细胞遗传学、分子系统学等层面的资料, 但迄今诸多研究并没有彻底解决东方鲀属内系统发育关系。结合我们的工作和相关的研究报道, 提示在运用各种分析方法构建鲀形目鱼类分子系统树时, 所选择的基因或区域不同, 结果往往受到较大的影响<sup>[20-28, 31-35]</sup>。我们将在以后的研究中进一步探讨线粒体 DNA 全序列所含的系统发育信息用于了解东方鲀属鱼类系统演化关系的可行性。

本文首次报道了暗纹东方鲀的线粒体 DNA 全序列, 以及对基因组成、结构及其所编

码蛋白的结构特征等所进行的初步分析,以期对检验模式生物东方鲀属鱼类的形态分类学提供分子依据,以及对暗纹东方鲀线粒体基因组的遗传特点、物种进化关系和多样性的分析提供新的线索。

## 参 考 文 献

- [1] 孟庆闻,苏锦祥,缪学祖. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- [2] 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.
- [3] Miya K, Tabeta O, Kayano H. Karyotypes in 6 species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes). Fish Sci, 1995, 61: 594-598.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] Crnogorac-Jurcevic T, Brown J R, Lehrach H, et al. Tetraodon fluviatilis, a new puffer fish model for genome studies. Genomics, 1997, 41: 177-184.
- [7] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNAs // Nei M, Koehn R K. Evolution of Genes and Proteins. New York: Sinauer Association Inc Press, 1983, 62-88.
- [8] Meyer A. DNA Technology and phylogeny of fish // Beaumont A R. Genetic and Evolution of Aquatic Organisms. London: Chapman & Hall, 1994.
- [9] 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.
- [10] 郭新红,刘少军,刘巧,等. 鱼类线粒体研究新进展. 遗传学报, 2004, 31(9): 983-1000.
- [11] Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences. Mol Biol Evol, 2001, 18: 1993-2009.
- [12] Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, et al. Mitochondrial genomes and phylogeny of the ocean sunfishes (Tetraodontiformes: Molidae). Ichthyol Res, 2004, 51: 269-273.
- [13] Minegishi Y, Aoyama J, Inoue J G, et al. Molecular phylogeny and evolution of the freshwater eels genus *Anguilla* based on the whole mitochondrial genome sequences. Mol Phylogenet Evol, 2005, 34: 134-146.
- [14] 赫崇波,高祥刚,王效敏,等. 圆斑星鲽线粒体基因组全序列结构及其进化. 中国水产科学, 2007, 14(4): 584-592.
- [15] Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, et al. Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. Mol Phylogenet Evol, 2007, 45: 89-101.
- [16] Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, et al. A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: basal ecological diversification? BMC Evol Biol, 2008, 8: 212.
- [17] 杨琴玲,李思发,徐嘉伟,等. 鲷的线粒体基因组核苷酸全序列分析. 生物技术通报, 2009, 2: 112-117.
- [18] Elmerot C, Arnason U, Gojobori T, et al. The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships. Gene, 2002, 295: 163-172.
- [19] Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, et al. Explosive speciation of *Takifugu*: Another use of *fugu* as a model system for evolutionary biology. Mol Biol Evol, 2009, 26(3): 623-629.
- [20] 邵爱华,朱江,陈葵,等. 暗纹东方鲀线粒体细胞色素 *b* 及其侧翼 tRNA 基因的克隆与序列分析. 中国水产科学, 2005, 12(6): 675-681.
- [21] 邵爱华,朱江,陈葵,等. 暗纹东方鲀线粒体 *CO II* 及两侧 tRNA 基因的克隆和序列分析. 动物学杂志, 2005, 40(6): 1-8.
- [22] 邵爱华,朱江,史全良,等. 暗纹东方鲀线粒体 *CO III* 克隆及序列分析. 水产科学, 2006, 25(8): 391-396.
- [23] 邵爱华,叶亚新,王金虎,等. 暗纹东方鲀线粒体若干 tRNA 基因的克隆及序列分析. 苏州科技学院学报: 自然科学版, 2006, 23(4): 37-42.
- [24] 邵爱华,朱江,陈葵,等. 暗纹东方鲀线粒体 *CO I* 及其侧翼 tRNA 基因的克隆与序列分析. 遗传, 2006, 28(8): 963-971.
- [25] 邵爱华,朱江,史全良,等. 暗纹东方鲀线粒体 DNA 控制区结构和系统发育分析. 中国水产科学, 2007, 14(3): 352-359.
- [26] 邵爱华,杜建,朱江. 暗纹东方鲀线粒体 DNA 16S rRNA 基因克隆、测序与在分子系统发育分析中的应用. 江苏农业科学, 2009, 268(2): 15-19.
- [27] Zhang Y B, He S P. Investigations into the perplexing interrelationship of the genus *Takifugu* Abe, 1949 (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). Chinese Science Bulletin, 2008, 53(2): 233-244.
- [28] 张玉波,甘小妮,何舜平. 线粒体 D-loop 序列变异与东方鲀属鱼类系统发育. 水生生物学报, 2009, 33(4):

- 656 – 663.
- [29] 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.
- [30] Yamanoue Y, Miya M, Inoue J G, et al. The mitochondrial genome of spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* (Teleostei: Tetraodontiformes) and divergence time estimation among model organisms in fishes. *Genes Genet Syst*, 2006, 81: 29 – 39.
- [31] Song L S, Liu B Z, Xiang J H, et al. Molecular phylogeny and species identification of pufferfish of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). *Mar Biotechnol*, 2001, 3: 398 – 406.
- [32] Holcroft N I. A molecular analysis of the interrelationships of tetraodontiform fishes (Acanthomorpha: Tetraodontiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2005, 34: 525 – 544.
- [33] Miya M, Nishida M. Organization of the mitochondrial genome of a deep-sea fish, *Gonostoma gracile* (Teleostei: Stomiiformes): first example of transfer RNA gene rearrangements in bony fishes. *Mar Biotechnol*, 1999, 1: 416 – 426.
- [34] Alfaro M E, Santini F, Brock C D. Do reefs drive diversification in marine teleosts? Evidence from the puffer-fishes and their allies (order Tetraodontiformes). *Evolution*, 2007, 61: 2104 – 2126.
- [35] Reza M S, Furukawa S, Mochizuki T, et al. Genetic comparison between torafugu *Takifugu rubripes* and its closely related species karasu *Takifugu chinensis*. *Fish Sci*, 2008, 74: 743 – 754.