

齐口裂腹鱼线粒体 DNA 控制区结构分析

谢佳燕

武汉工业学院 生物与制药工程学院 武汉 430023

摘要:利用直接测序法对齐口裂腹鱼(*Schizothorax prenanti*)线粒体 DNA 控制区进行了测序,并对其序列结构进行了分析。结果表明,齐口裂腹鱼线粒体控制区碱基组成中碱基 A 和 T 的含量明显高于 G 和 C 的含量,所有类型碱基组成中碱基 G 的含量最低,这与其他硬骨鱼类控制区碱基组成一致。通过与哺乳类和鲤形目鱼类控制区序列进行对比分析,在齐口裂腹鱼线粒体控制区中识别了相应的保守序列,包括终止相关序列、中央保守区的 F、E、D、B 盒,以及保守序列区的 CSB1、CSB2、CSB3 序列。

关键词:齐口裂腹鱼;线粒体控制区;保守序列

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2011)02-97-05

Structure Analysis of mtDNA Control Region in *Schizothorax prenanti*

XIE Jia-Yan

School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China

Abstract: Mitochondrial DNA control region of *Schizothorax prenanti* was sequenced and analyzed by comparing with other species. The content of A and T in the control region of *S. prenanti* was higher than that of G and C. Compared with mammals and other species of Cypriniformes, several conserved sequence blocks were identified in the mitochondrial DNA control region of *S. prenanti*, including extended terminal associated sequences (ETAS), blocks of central domain (F, E, D, B-box) and conserved sequence block (CSB1-3).

Key words: *Schizothorax prenanti*; mtDNA control region; Conserved sequence

控制区是脊椎动物线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 基因组中最长的一段非编码区。研究表明,控制区内具有许多重要的功能区域,它们在不同种属,甚至是更高的分类阶元间具有高度的保守性,表明这些区域受到强烈的选择性限制^[1-5]。控制区通常可分为 3 个区域,中间的保守区和 2 个侧翼区^[2]。中间的中央保守区 (central domain) 在脊椎动物中已识别了多个保守序列盒^[6]。左侧区域为终止序列区,包含延伸终止相关序列 (extended terminal associated sequences, ETAS), 其与子代 H 链复制终止有关^[2,7]。右侧区域为保守序列区,包含了线粒体基因组的主要调控元件,其与 mtDNA 复制起始和转录有关^[8]。在两侧的结构域中还发现多个可变数目的串联重复序列,

这些变异的存在导致种内长度变异和种间异质性的产生^[9]。控制区内不同结构域间进化模式不同,2 个侧翼区进化速度较快,而中央保守区在许多种属中维持较高的保守性^[2]。因此,对控制区结构与功能的研究将有助于了解 mtDNA 复制、转录的机制;同时对其结构特征的分析 and 对比,可识别不同分类阶元中重要功能域的保守序列,探讨序列组织的异同与进化模式的差异^[4,10]。

基金项目 湖北省教育厅科学技术研究项目 (No. Q20081802), 武汉工业学院启动费资助项目;

第一作者介绍 谢佳燕,女,博士;研究方向:分子生态学;E-mail: xjyaphid@yahoo.com。

收稿日期:2010-09-02,修回日期:2010-12-31

齐口裂腹鱼 (*Schizothorax prenanti*) 是我国特有的重要冷水性经济鱼类。隶属鲤科 (Cyprinidae) 裂腹鱼亚科 (Schizothoracinae) 裂腹鱼属。主要分布于我国长江上游的金沙江、岷江、大渡河、青衣江及乌江下游等水域^[11-12]。近年来,大量水利工程和人为因素的影响,齐口裂腹鱼野生种群数量急剧减少,已成为重要的人工繁育与驯养对象^[13-15]。有关线粒体控制区结构和组成的研究在哺乳动物、鸟类和鱼类中已开展了不少工作^[2-6,16-17],但在裂腹鱼中研究较少。本研究对齐口裂腹鱼的 mtDNA 控制区进行测序,结合 GenBank 中其他鲤科物种和哺乳类的同源序列进行比对,分析其结构组成,探讨裂腹鱼控制区特点及其规律,同时也为鱼类种质资源的保护提供重要的理论依据。

1 材料与方法

1.1 样本 DNA 的提取、PCR 扩增反应及测序

样品为 2009 ~ 2010 年采集于长江干流四川至重庆江段,共分析齐口裂腹鱼样本 8 尾,取肌肉样品于 95% 的乙醇中固定,保存。采用标准的酚/氯仿法提取基因组 DNA^[18]。参考 Liu 等^[16]的方法设计引物扩增控制区,引物序列分别为 DF1:5'-ACC CCT GGC TCC CAA AGC-3', DR2:5'-ATC TTA GCA TCT TCA GTG-3'。PCR 扩增反应条件为 94℃ 预变性 2 min,随后进行 40 个循环。每个循环由 94℃,30 s;55℃,45 s;72℃,1 min 组成,最后一个循环结束后 72℃ 延伸 10 min。采用 Qiagen 的 QIAquick PCR 产物纯化试剂盒进行回收纯化,在 ABI 377 DNA 测序仪上利用扩增引物进行双向测序。

1.2 DNA 序列数据分析 从 GenBank 下载裂腹鱼亚科的细鳞裂腹鱼 (*S. chongi*, 序列号 AY095325)、黄河裸裂尻鱼 (*Schizopygopsis pylzovi*, 序列号 DQ409316)、嘉陵裸裂尻鱼 (*S. kialingensis*, 序列号 DQ533788), 鲤亚科的鲤 (*Cyprinus carpio*, 序列号 AB307054) 及岩原鲤 (*Procypris rabaudi*, 序列号 EU082030) 的控制区序列。汇同采集于雅砻江和岷江支流的齐口裂腹鱼控制区序列 (序列号 DQ201957 ~

DQ201965)^[15],采用软件 Clustal X1.83^[19]、SeaView^[20]对测定序列进行排列,综合哺乳类^[2,6,21]及鱼类^[16,22]控制区的分区结果,识别齐口裂腹鱼控制区保守区的序列组成。采用 Arlequin 3.0^[23]软件统计单倍型数和进行控制区核苷酸组成与序列分析。

2 结果

2.1 mtDNA 控制区序列变异分析 对齐口裂腹鱼个体的序列进行排列和人工校对,共检测到 6 种单倍型,序列号为 HQ455766 ~ HQ455771,共发现 55 个碱基变异位点,主要为转换,少数为颠换和缺失,其中 36 个位点为碱基转换,转换/颠换比例为 1.9。多态性核苷酸变异位点在整个控制区序列中分布不均匀(图 1),主要集中在侧翼区中,中间区域相对保守。在所有序列中,碱基 A、T、G 和 C 的含量分别为 33.2%、33.0%、14.0% 和 19.8%,碱基 A 和 T 的含量明显高于 G 和 C 的含量。在 3 个区域中,碱基 T 的含量基本一致,在 31.9% ~ 35.0% 之间;而碱基 G 的含量最低,在 8.8% ~ 14.4% 之间。

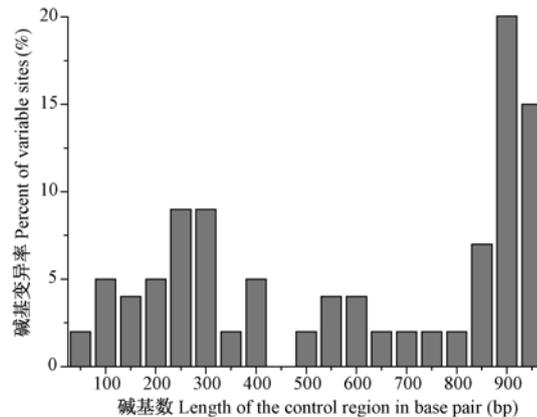


图 1 变异位点在齐口裂腹鱼控制区中的分布

Fig. 1 Distribution of variable sites in the control region of *Schizothorax prenanti*

2.2 终止序列区 通过与鲤形目鱼类控制区序列进行比较分析,发现齐口裂腹鱼 ETAS 的共有序列为 TACATATATGTA-T-TCACCA---TATTA TTTTAACCA--AA,与鲤形目鱼类的 ETAS 基本

一致^[16]。其内的序列 TACAT 与其反向互补序列 ATGTA 可形成发夹结构,在其下游还发现了多个 TACAT 序列,这些序列可能是 ETAS 的重复序列。

2.3 中央保守区 对比控制区两侧序列,中央保守区相对保守。与哺乳类和其他鲤科鱼类进行对比,其内可识别相似的保守序列,分别对应 CSB-F、CSB-E、CSB-D、CSB-B(表 1)。齐口裂腹鱼 CSB-F 的关键序列为 ATATTAATGTAGTA AGAAACCACCAA,其为划分终止序列区和中

央保守区的标志,在所有样本单倍型中仅有一个位点发生变异,而与其他鲤科鱼类对应序列间均无差异。紧接其后的是 CSB-E,基于 GTGGGGG 序列可对其进行识别,齐口裂腹鱼单倍型间有 2 个位点发生变异,与其他鲤科鱼类相比也有一定的变异。其上游为 CSB-D 序列,在所用鱼类个体序列间均无差异,表明了 CSB-D 序列在鲤科鱼类中的高度保守性。在 CSB-D 序列之后,还识别了与哺乳类 CSB-B 相似的序列,该序列在齐口裂腹鱼个体间无变异。

表 1 9 个物种 D-loop 序列中央保守区中的保守序列盒

Table 1 Conserved sequence blocks of central domain of D-loop sequences from 9 species

物种 Species	CSB-F	CSB-E	CSB-D	CSB-B
齐口裂腹鱼	ATATTAATGTAGTAA	-----AAGG-ACAAAA-AAT	TATTACTGGCATCTG	TTATATGCATAACGT-
<i>Schizothorax prenanti</i>	GAAACCACCAA-----	GTGGGGGT-----	GTTCTATTTCAGG-----	ATTTTTT
细鳞裂腹鱼	ATATTAATGTAGTAA	-----AGGG-ACAAAA-AAT	TATTACTGGCATCTG	TTATATGCATAACGT-
<i>S. chongi</i>	GAAACCACCAA-----	GTGGGGGT-----	GTTCTATTTCAGG-----	ATTTTTT
黄河裸裂尻鱼	ATATTAATGTAGTAA	-----AGGG-ACGCAC-GGC	TATTACTGGCATCTG	TTATATGCATAACGTT
<i>Schizopygopsis pylzovi</i>	GAAACCACCAA-----	GTGGGGGT-----	GTTCTATTTCAGG-----	ATCTTTT
嘉陵裸裂尻鱼	ATATTAATGTAGTAA	-----AGGG-ACGCAG-GGC	TATTACTGGCATCTG	TTATATGCATAACGTT
<i>S. kialingensis</i>	GAAACCACCAA-----	GTGGGGGT-----	GTTCTATTTCAGG-----	CTCTTTT
岩原鲤	ATATTAATGTAGTAA	-----AGGG-ACAATA-AAT	TATTACTGGCATCTG	TTATATGCATAACGT-
<i>Procypris rabaudi</i>	GAAACCACCAA-----	GTGGGGGT-----	GTTCTATTTCAGG-----	ATCTTTT
鲤	ATATTAATGTAGTAA	-----AGGG-ACAATA-ATT	TATTACTGGCATCTG	TTATATGCATAAGGT-
<i>Cyprinus carpio</i>	GAAACCACCAA-----	GTGGGGGT-----	GTTCTATTTCAGG-----	ATCTTTT
海豚 ^[21]	ACC---ATGCCGCGT	CTCTTCTCGACCGGGCCCATGATACC	-----CATCTG	-CATA-CATTTGGT-
<i>Cephalorhynchus commersonii</i>	GAAACCAGCAACCCGC	GTGGGGGTAGCTA	GTTCTTACTTCAGGACCAT	ATTTTTT
牛 ^[21]	ACC---ATGCCGCGT	CTCTTCTCGCTCCGGGCCATAA-ATC	-----CATCTG	-CATA-CATTTGGT-
<i>Bos taurus</i>	GAAACCAACAACCCGC	GTGGGGTTCGCTA	GTTCTTTCTTCAGGGCCAT	ATTTTTT
小鼠 ^[21]	ACC---ATCCTCCGT	CTCTTCTCGCTCCGGGCCATTA-AAC	-----CATCTG	-CAT-GCATTTGGT-
<i>Mus musculus</i>	GAAACCAACAACCCGC	TTGGGGGTAGCTA	GTTCTTACTTCAGGGCCAT	ATCTTTT
	* **	** *	*****	** *** **
	***** **	*****	**** * *****	* ****

物种间一致的核苷酸用“*”表示,缺失用“-”表示。

Positions identical with the *S. prenanti* sequence are indicated by asterisks and deleted positions and gaps in the sequence are indicated by dashes.

2.4 保守序列区 齐口裂腹鱼的保守序列区中可识别 CSB1、CSB2 和 CSB3 序列,3 个序列在齐口裂腹鱼个体间相似性较高。其中 CSB1 的序列组成为 TTAATTATCGTAAGACATA,所

有齐口裂腹鱼样本中有一个单倍型位点发生变异;CSB2 序列组成为 CAAACCCCCCTACCCC CC,在鱼类中较为保守,容易识别,齐口裂腹鱼样本中有一个位点发生变异;CSB3 序列为

TGTCAAACCCCTAAACCAA,在齐口裂腹鱼个体间无变异,鲤形目 CSB3 的通式为 TGTCAAACCCCGAAACCAA^[16]。在齐口裂腹鱼的 CSB3 下游约 50 bp 处还发现了一段保守的 TT(AT)nGTG 序列片段,该片段在鲤形目其他鱼类中也普遍存在,AT 重复片段数目的不同,可导致不同鱼类保守序列区长度的变异。

3 讨 论

线粒体控制区主要包含了控制线粒体基因组复制和表达的调控元件,对其结构功能的研究将有助于了解 DNA 复制、转录机制和进化规律。不同的研究在动物线粒体控制区内已识别了多个功能保守序列^[2-3,21-22,24-25]。与其他脊椎动物一样,齐口裂腹鱼线粒体控制区可分为 3 个区域,并在控制区内也识别了相似的保守序列。齐口裂腹鱼控制区核苷酸组成特征与鲤形目的其他鱼类相似^[16],核苷酸平均组成中碱基 A 和 T 的含量明显高于 G 和 C 的含量,碱基 G 的含量最低;碱基 T 的含量在控制区的 3 个区域中基本一致。另外,序列变异主要分布在控制区的两侧区域中,表明位点变异在控制区中分布不均匀。

终止相关序列区位于 D-loop 的 3'端,为子代 H 链合成的终止区。Doda 等^[7]首先在 D-loop 3'端识别了人 (*Homo sapiens*) 15 bp 的保守序列,随后在其他的脊椎动物线粒体控制区相似的位置也发现了对应的序列。Sbisà 等^[2]对哺乳类控制区的研究表明,在 TAS 区存在 2 个序列长约 60 bp 的保守序列框,由于其包含了 TAS 序列,因此分别称为扩展终止相关序列 1 和 2(ETAS1 和 ETAS2)。在齐口裂腹鱼的终止相关序列区中也识别了一个 ETAS 序列,其与鲤形目鱼类 ETAS 序列组成基本一致^[16]。研究表明,TACAT 是 ETAS 区内的关键序列,与其反向互补序列 ATGTA 形成发夹结构,参与完成子链合成的终止^[16]。同时,在控制区 ETAS 序列下游还发现多个 TACAT 序列,可能为 ETAS 的序列重复,但可能不行使其功能^[20]。

Anderson 等^[6]最初在人和牛 (*Bos taurus*)

的线粒体中央保守区中识别了多个保守序列。Southern 等^[21]在 4 种哺乳类中确认了 5 个保守序列 (B、C、D、E 和 F-block)。鸟类中也识别了相似的保守序列 B、C、D、E 和 F-box^[3,24]。Lee 等^[22]在硬骨鱼类中识别了保守序列 D-box, Liu 等^[16]识别了鲤形目鱼类的 D、E、F-box。我们在裂腹鱼亚科中也识别了与鲤形目序列组成基本一致的 D、E、F-box,同时还识别了与哺乳类 B-box 序列相匹配的序列,其序列组成的 23 个核苷酸中有 12 核苷酸与哺乳类的 B-box 完全一致^[21]。

保守序列区以 CSB 1 为分界点,其与 mtDNA 复制起始和转录有关^[8]。在齐口裂腹鱼的保守序列区中识别了 3 个保守序列 CSB 1~3,这些序列个体间差异较小,其组成与鲤形目鱼类对应的序列几乎一致^[16],序列组成的高相似性表明了序列区中结构上的保守性。控制区的保守序列区包含了线粒体基因组重要的调控元件,包括 H 链复制起始位点 (O_H)、L 链及 H 链启动子 (HSP, LSP)。其内的 3 个保守序列盒 CSB 1~3,可能与 H 链复制起始中 RNA 引发有关^[8]。研究表明 CSB 1 元件是复制过程中所必须的^[2],其可通过保守片段 GACATA 进行识别,该序列片段在脊椎动物线粒体控制区中较保守^[2-3,6]。CSB2 和 CSB3 元件也存在于大部分脊椎动物的线粒体控制区中,但也发现一些物种中缺失该元件^[6],或是两者融合成为一个功能元件^[2]。

总之,对齐口裂腹鱼线粒体控制区序列组成的研究中,发现其控制区主体框架结构与其他脊椎动物较为相似。在与哺乳类动物和其他鲤科鱼类控制区序列进行比对分析时,识别了多个保守序列,这些序列间的相似性表明了它们在控制区中可能具有功能上的重要性^[6]。

参 考 文 献

- [1] Saccone C, Pesole G, Sbisà E. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *J Mol Evol*, 1991, 33: 83-91.
- [2] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, et al. Mammalian

- mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. *Gene*, 1997, 205: 125 - 140.
- [3] Randi E, Lucchini V. Organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris*. *J Mol Evol*, 1998, 47: 449 - 462.
- [4] Larizza A, Pesole A, Reyes E, et al. Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D-loop region in rodents. *J Mol Evol*, 2002, 54: 145 - 155.
- [5] Iyengar A, Diniz F M, Gilbert T, et al. Structure and evolution of the mitochondrial control region in oryx. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 40: 305 - 314.
- [6] Anderson S, De Bruijn, Coulson M H, et al. Complete sequence of bovine mitochondrial DNA. Conserved features of the mammalian mitochondrial genome. *J Mol Biol*, 1982, 156: 683 - 717.
- [7] Doda J N, Wright C T, Clayton D A. Elongation of displacement-loop strands in human and mouse mitochondrial DNA is arrested near specific template sequences. *PNAS*, 1981, 78: 6116 - 6120.
- [8] Walberg M W, Clayton D A. Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9: 5411 - 5421.
- [9] Hoelzel R A, Lopez J V, Dover G, et al. Rapid evolution of a heteroplasmic repetitive sequences in the mitochondrial DNA control region of carnivores. *J Mol Evol*, 1994, 39: 191 - 199.
- [10] Douzery E, Randi E. The mitochondrial control region of cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Mol Biol Evol*, 1997, 14: 1154 - 1166.
- [11] 武云飞, 吴翠珍. 青藏高原鱼类. 成都: 四川科学技术出版社, 1992.
- [12] 陈毅峰, 曹文宣. 裂腹鱼亚科//乐佩琦, 单乡红, 林人端, 等. 中国动物志: 硬骨鱼纲 鲤形目下. 北京: 科学出版社, 2000: 273 - 390.
- [13] 若木, 王鸿泰, 殷启云, 等. 齐口裂腹鱼人工繁殖的研究. *淡水渔业*, 2001, 31(6): 3 - 5.
- [14] 杜宗君. 齐口裂腹鱼人工养殖的生物学研究. *中国水产*, 2003, 4: 81.
- [15] Song Z, Song J, Yue B. Population genetic diversity of Prenant's schizothoracin, *Schizothorax prenanti*, inferred from the mitochondrial DNA control region. *Environmental Biology of Fishes*, 2008, 81(3): 247 - 252.
- [16] Liu H Z, Tzeng C S, Teng H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny of the Cypriniformes. *Can J Zool*, 2002, 80: 569 - 581.
- [17] 赵丽丽, 赵金良, 曹阳. 闽江和漓江暗鳉 mtDNA 控制区序列差异分析. *动物学杂志*, 2007, 42(1): 54 - 58.
- [18] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W; 黄培堂等译. 分子克隆实验室指南. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 463 - 618.
- [19] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876 - 4882.
- [20] Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol*, 2010, 27(2): 221 - 224.
- [21] Southern S O, Southern P J, Dizon A E. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome. *J Mol Evol*, 1988, 28: 32 - 42.
- [22] Lee W J, Conroy J, Howell H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control region. *J Mol Evol*, 1995, 41: 54 - 66.
- [23] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47 - 50.
- [24] Ruokonen M, Kvist L. Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, 23: 422 - 432.
- [25] Saccone C, Attimonelli M, Sbisà E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Evol*, 1987, 26: 205 - 211.