

## 牙鲆和半滑舌鳎 5S rDNA 基因的染色体定位及鲽形目 5 种鱼类的分子系统学分析

谢明树<sup>1,2</sup>, 孙冰<sup>1,2</sup>, 张博<sup>1</sup>, 邵长伟<sup>2</sup>, 王启龙<sup>2</sup>, 王磊<sup>2</sup>, 陈松林<sup>2\*</sup>

(1. 大连海洋大学水产与生命学院, 辽宁 大连 116023;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 利用荧光原位杂交(FISH)技术将 5S rDNA 基因定位在牙鲆和半滑舌鳎染色体上, 结果表明, 5S rDNA 基因在雌、雄性半滑舌鳎的一对同源染色体上分别存在 2 个杂交信号位点; 在二、三倍体牙鲆的同源染色体上分别存在 2 个和 3 个杂交信号位点, 杂交信号明显且特异。本研究首次将 5S rDNA 基因定位在半滑舌鳎和三倍体牙鲆的染色体上, 为牙鲆及半滑舌鳎倍性鉴定、染色体鉴别提供了有效方法。此外, 根据牙鲆 5S rDNA 基因编码区序列设计引物, 扩增出大菱鲆和半滑舌鳎 5S rDNA 基因编码区序列, 与鲽、塞内加尔鳎、大口黑鲈、七鳃鳗的 5S rDNA 基因序列进行同源性比较后发现, 5 种鲽形目鱼类 5S rDNA 基因序列同源性高达 98.3%, 系统发生分析结果显示 5 种鲽形目鱼类聚为一支; 各序列中 GC 含量均显著高于 AT 含量。

**关键词:** 牙鲆; 半滑舌鳎; 5S rDNA 基因; 荧光原位杂交; 鲽形目; 系统发生

**中图分类号:** Q 342; S 917.4

**文献标志码:** A

牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和半滑舌鳎 (*Cynoglossus semilaevis*) 分别属于鲽形目 (Pleuronectiformes) 中的鲆科 (Bothidae) 和舌鳎科 (Cynoglossidae), 主要分布于我国黄渤海, 属暖水性底层鱼类, 因其生长快, 味道鲜美, 经济价值高等特点, 已成为我国北方两个重要的海水鱼类养殖品种。随着基因组研究的深入及多倍体育种技术的发展, 单个染色体的鉴别成为鱼类染色体研究中亟待解决的问题, 因此, 寻找并利用稳定的遗传标记, 对研究牙鲆及半滑舌鳎染色体鉴定及多倍体育种至关重要。5S rDNA 基因 (5S rRNA) 是由编码区 (120 bp) 和间隔区组成的一类高度保守的串联重复序列<sup>[1]</sup>, 因鲽形目鱼类的 5S rDNA 基因拷贝数多且高度保守, 以及在核基因组不同拷贝间趋于相近等特点, 又被广泛应用于鱼类的染色体鉴别、倍性鉴定、物种分类及进化研究。近年来, 随着荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 技术在生物学领域广泛应用, 已成为一

种在分子水平上进行细胞遗传学研究的重要工具, 并在染色体鉴定、识别、重排、进化及基因图谱构建等方面取得令人瞩目的成绩<sup>[2-3]</sup>。

目前, 5S rDNA 基因已在大西洋鲑 (*Salmo salar*)<sup>[4]</sup>、斑马鱼 (*Brachydanio rerio*)<sup>[5]</sup>、虹鳟 (*Salmo gairdnerii*) 和银大马哈鱼 (*Oncorhynchus kisutch*)<sup>[6]</sup>、细鳞大麻哈鱼 (*Oncorhynchus gorbuscha*)<sup>[7]</sup>、兔脂鲤属 (*Leporinus*)<sup>[8]</sup> 等鲤科及鲑科鱼类染色体上进行了 FISH 定位研究。而有关鲽形目鱼类 5S rDNA 基因的研究相对较少。目前, 仅有 Fujiwara 等<sup>[9]</sup>、Cross 等<sup>[10]</sup> 和隋娟<sup>[11]</sup> 分别对二倍体牙鲆、塞内加尔鳎 (*Solea senegalensis*) 和夏鲆 (*Paralichthys dentatus*) 的 5S rDNA 基因进行了 FISH 定位研究, 而有关 5S rDNA 基因在半滑舌鳎染色体上的定位、在三倍体牙鲆倍性鉴定中的应用、以及鲽形目鱼类 5S rDNA 基因的序列分析等尚未见报道。

本研究利用荧光原位杂交技术, 首次将 5S rDNA 基因定位在半滑舌鳎染色体上, 运用 5S

收稿日期: 2011-12-18

修回日期: 2012-05-20

资助项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903046); 山东省泰山学者工程专项

通讯作者: 陈松林, E-mail: chensl@ysfri.ac.cn

rDNA 基因进行了三倍体牙鲆的倍性鉴定,克隆并获得了大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)和半滑舌鳎 5S rDNA 基因保守区序列。通过对牙鲆和半滑舌鳎 5S rDNA 基因的 FISH 定位及其系统发生分析,为其它鲽形目鱼类的染色体鉴别、倍性鉴定、遗传标记开发等提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用牙鲆、大菱鲆、半滑舌鳎均取自山东省海阳市黄海水产有限公司,其中,牙鲆三倍体按照王磊等<sup>[12]</sup>方法诱导产生。所用的二倍体、三倍体牙鲆体长为 30~35 cm,体质量为 420~500 g;大菱鲆体长为 25 cm 左右,体质量为 360 g 左右;半滑舌鳎体长为 25~35 cm,体质量为 200~500 g;运回实验室暂养 2 d 后使用。

### 1.2 染色体制片和 FISH

**染色体制备** 参照沙珍霞等<sup>[13]</sup>方法,略有改进。实验鱼先按 10 μg/g 剂量体腔注射 PHA,注射后将鱼放入 25 °C 海水中暂养 24 h,再按 1.2 μg/g 鱼体质量注射秋水仙素,3 h 后静脉抽血杀鱼取头肾并置于 0.8%生理盐水中撕碎,筛绢过滤,离心收集细胞(1 500 r/min, 5 min),用生理盐水洗涤细胞 2 次,再用 75 mmol/L KCl 溶液在 30 °C 低渗处理 30 min,最后用新鲜配制的卡诺氏液(甲醇:冰醋酸=3:1,体积比 v/v)固定 2 次,每次 30 min,采用冷片法滴片,空气干燥后于-20 °C 保存备用。

**探针标记** 根据 GenBank 上公布的牙鲆 5S rDNA 基因序列(GenBank: AB154836)设计引物,5'-GCTTACGGCCATACCACCCTGAAC-3',5'-AAGCTTACAGCACCTGGTATTCCCA-3'(引物合成由青岛金斯瑞科技有限公司完成),以牙鲆基因组 DNA 为模板,采用 biotin-16-dUTP(ROCHE)进行探针标记。总体积为 50 μL 的反应体系中含有 1.5 mmol/L 的 MgCl<sub>2</sub> 的 1×PCR 缓冲液 4.5 μL,0.2 mmol/L 的 dATP, dCTP 和 dGTP 各 2 μL,0.2 mmol/L 的 dTTP 0.13 μL,0.2 mmol/L 的 biotin-16-dUTP 0.07 μL,0.5 U 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.6 μL,上下游引物各 2 μL,0.5 μg 的牙鲆基因组 DNA 4 μL。进行 PCR 标记扩增,反应条件为:95 °C 变性 5 min,然后 33 个循环,95 °C 变性 30 s,59 °C 下退火 30 s,72 °C 下延伸 30 s,最后一个循环结束后在 72 °C 下延伸 5 min,4 °C 保存。取 3 μL 扩增产物经 1%的

琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪拍照。向剩下的探针溶液中加入 5 μL 3 mol/L 的乙酸钠和 200 μL 预冷无水乙醇-20 °C 沉淀过夜。4 °C 下 13 000 r/min 离心 20 min 去上清,超净台内吹干后加入 80 μL 杂交混合液(内含 50%去离子甲酰胺,10%硫酸葡聚糖,2×SSC)37 °C 溶解 2 h,充分溶解后置于-20 °C 保存备用。半滑舌鳎 5S rDNA 基因引物序列、探针标记方法及操作步骤与牙鲆的一致。

**荧光原位杂交** 用 0.1%胃蛋白酶在 37 °C 处理染色体制片 8 min,以去除制片上多余的 RNA 和蛋白成分,随后移入 10%多聚甲醛中固定 10 min,梯度无水乙醇(70%、90%、100%)中脱水各 5 min,自然干燥后将其置于 70%的甲酰胺中 70 °C 变性 1 min 10 s,之后立即转入梯度预冷无水乙醇中脱水,以防止 DNA 复性,脱水后自然干燥。

开始杂交前,向 1 μg 探针中加入 30 倍探针量的鲑精 DNA 和 10 倍探针量的相应鱼类的 *Cot*-1DNA,将杂交混合液置 75 °C 变性 10 min,冰上放置 10 min,转入 37 °C 预杂交 1 h,以封堵非特异性杂交信号;预杂交结束后,将杂交混合液滴加至染色体制片上,覆以盖玻片,指甲油封片,置暗盒中 37 °C 杂交 24 h;杂交结束后,小心揭去盖玻片,在 42 °C 下,依次将染色体制片置于 50%甲酰胺、2×SSC 中摇动洗脱 2 次,每次 5 min,以洗去非特异杂交探针;洗脱完成后,向制片上添加 100 μL 浓度为 1%的 blocking-1 并加盖玻片置暗盒中 37 °C 温育 40 min。取出后尽可能甩去制片表面多余的 blocking-1(切勿滴干),加 100 μL 10 μg/mL 的 avidin-FITC 于制片上,加盖玻片置暗盒中 37 °C 孵育 1 h;孵育结束后,将制片于 Washing-buffer(4×SSC,0.1%TWEEN20)中 37 °C 洗涤 2 次,每次 5 min。取出后尽力甩去制片表面多余的 SSC,加 50 μL 1 μg/mL 的 PI 复染,Nikon80i 观察,CCD 照相,所得照片用 NIS-element(Nikon) 和 Photoshop(Adobe)进行合成及对对比度调整。

### 1.3 5S rDNA 基因序列

**克隆及测序** 以牙鲆、大菱鲆和半滑舌鳎鳍条为材料,按照基因组 DNA 小提试剂盒(TIA Namp MarineAnimals DNA kit, TIAG GEN)提取基因组 DNA,用 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 质量及浓度后于-20 °C 保存备用。PCR 反应体系及温度均按照探针标记方法略加修改后进行,反应体系中不加标记物(biotin-16-dUTP),将

2.5 mmol/L 的 dTTP 加至 2 uL 即可, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后按照胶回收试剂盒 (Zymoclean Gel DNA Recovery Kit<sup>TM</sup>, TING GEN) 回收, 4 °C 保存备用。纯化后的片段连接到 pMD18-T 载体, 转化到 *E. coli* 菌株上。利用 M13 通用引物进行 PCR 扩增检测, 取阳性克隆送华大基因公司进行测序。

**序列分析** 牙鲆、大菱鲆、鲽、塞内加尔鳎、半滑舌鳎均隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲽形目(Pleuronectiformes)。其中, 牙鲆和大菱鲆属鲆科(Bothidae), 鲽属鲽科(Pleuronectidae), 塞内加尔鳎和半滑舌鳎分别隶属于鳎科(Soleoidae)和舌鳎科(Cynoglossidae); 大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)属硬骨鱼纲, 鲈形目(Perciformes), 太阳鱼科(Ceetrachidae); 七鳃鳗(*Lampetra japonica*)属软骨鱼纲(Chondrichthyes), 七鳃鳗目(Petromyzoniformes), 七鳃鳗科(Petromyzonidae)。以 GenBank 上公布的牙鲆 5S rDNA 基因序列(GenBank: AB154836)为参照, 与大菱鲆和半滑舌鳎所测序列在 NCBI(BLAS)上进行比对后获得大菱鲆和半滑

舌鳎 5S rDNA 基因编码区序列, 再与鲽(GenBank: HQ681115)、塞内加尔鳎(GenBank: HQ681116)、大口黑鲈(GenBank: L49397)、七鳃鳗(GenBank: X04308)的 5S rDNA 基因序列进行对位排列, 排列结果运用 MEGA5.0 软件进行同源性比较和碱基组成分析。

**系统发生分析** 根据 5S rDNA 基因编码区氨基酸序列, 通过 Clustal X<sup>[14]</sup>进行多重序列比对, 运用 MEGA5.0 软件, 通过最大似然法进行系统发生分析。选择大口黑鲈和七鳃鳗作为外群作图。

## 2 结果

### 2.1 染色体制备

采用静脉抽血杀鱼取头肾的方法制备牙鲆和半滑舌鳎染色体, 随机统计牙鲆二倍体、三倍及半滑舌鳎雌、雄鱼染色体中期分裂相各 100 个, 其中 70% 的染色体中期分裂相分散良好、结构清晰、数目齐全(牙鲆二倍体 48 条, 三倍体 72 条; 半滑舌鳎二倍体 42 条), 半滑舌鳎及牙鲆染色体均为端着丝粒(图 1-a,d; 图 2-a,d), 适合 FISH 作图。

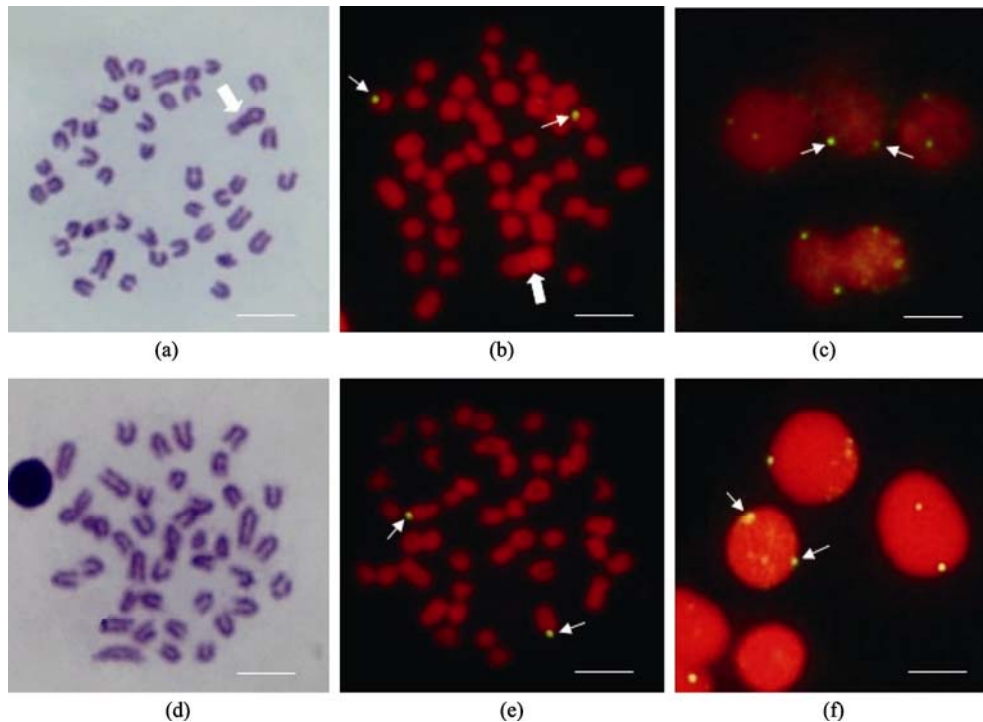


图 1 5S rDNA 基因在半滑舌鳎染色体及细胞上的定位结果

(a)、(d)半滑舌鳎雌、雄鱼染色体中期分裂相; (b)、(e)5S rDNA 基因在半滑舌鳎雌、雄鱼染色体定位; (c)、(f)5S rDNA 基因在半滑舌鳎雌、雄鱼细胞上定位; 小箭头所示为杂交信号, 大箭头所示为 W 性染色体, 标尺=5 μm。

Fig. 1 The 5S rDNA gene location result in chromosome and cell of *C. semilaevis*

(a),(d): showed the Metaphases of *C. semilaevis* female(a) and male(d) individual; (b),(e): showed the 5S rDNA gene location in the chromosome of *C. semilaevis* female(b) and male(e) individual; (c),(f): showed the 5S rDNA gene location in the cells of *C. semilaevis* female(c) and male(f) individual. Little arrows indicated signals in some chromosomes, big arrows indicated the W chromosome, Bar 5

μm.

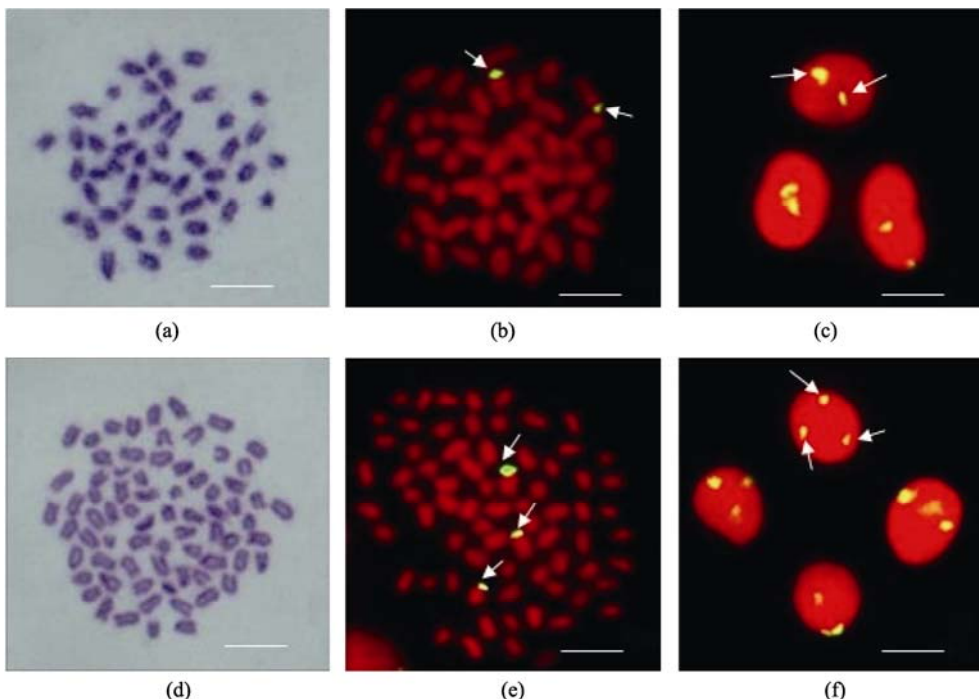


图 2 5S rDNA 基因在牙鲆染色体及细胞上的定位结果

(a)、(d)二、三倍体牙鲆染色体中期分裂相;(b)、(e)5S rDNA 基因在二、三倍体牙鲆染色体定位;(c)、(f): 为 5S rDNA 基因在二、三倍体牙鲆细胞上定位;箭头所示为杂交信号,标尺=5 μm。

Fig. 2 The 5S rDNA gene location result in chromosome and cell of *P. olivaceus*

(a),(d): showed the metaphases of *P. olivaceus* diploid(a) and triploid(d) individual; (b),(e): showed the 5S rDNA gene location in the chromosome of *P. olivaceus* diploid(b) and triploid(e) individual; (c),(f): showed the 5S rDNA gene location in the cells of *P. olivaceus* diploid(c) and triploid(f) individual. Arrows indicated fluorescence in situ hybridization (FISH) signals, Bar 5 μm.

2.2 探针标记

对于 PCR 标记的探针,采用琼脂糖凝胶电泳方法进行检测<sup>[15]</sup>。牙鲆 5S rDNA 基因经 PCR 扩增后,扩出一条 120 bp 的单一一条带,标记生物素后,目的条带明显增大至 150 bp;采用同样的方法对半滑舌鲷 5S rDNA 基因标记后发现,标记前片段为 120 bp),标记后条带增大至 150 bp (图 3),标记结果与牙鲆的标记结果一致,条带单一且清晰,证明标记成功。

2.3 荧光原位杂交

以牙鲆和半滑舌鲷头肾分别制备了分散良好的染色体中期分裂相,对 PCR 标记扩增的 5S rDNA 基因进行了染色体定位研究,结果显示,5S rDNA 基因分别定位于半滑舌鲷雌、雄鱼的一对染色体端着丝粒上(图 1-b, e),细胞上信号明显(图 1-c, f),杂交信号强弱无差异,信噪比相对较高;通过对二倍体牙鲆染色体定位后发现,5S rDNA 定位于二倍体牙鲆的一对染色体上,杂交信号明显(图 2-b,c),杂交信号强弱有一定差异;为进一步验证

FISH 结果的可靠性及对三倍体牙鲆进行倍性鉴定,

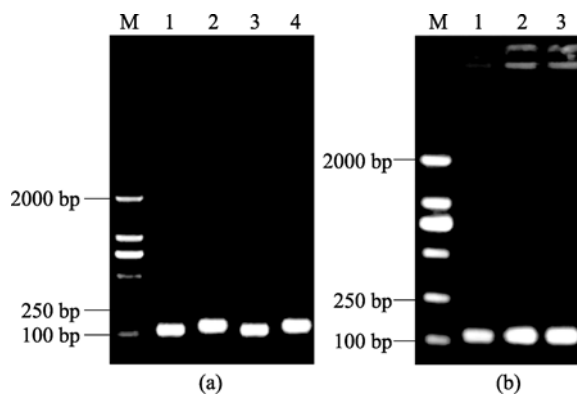


图 3 5S rDNA PCR 扩增产物

(a)M, Lane1, Lane3 分别代表 Marker, 牙鲆和半滑舌鲷 5S rDNA 基因标记 biotin 之前的 PCR 扩增产物, Lane2, Lane4 分别代表标记 biotin 之后的牙鲆和半滑舌鲷 5S rDNA 基因 PCR 扩增产物。(b)Lane1, Lane2, Lane3, Lane4 分别代表 Marker, 牙鲆, 大菱鲆, 半滑舌鲷 5S rDNA 基因 PCR 扩增产物。

Fig. 3 The PCR amplification products of 5S rDNA (a) M, Lane1 and Lane3 showed the Marker, the PCR amplification products of 5S rDNA before labeled with biotin in *P. olivaceus* and *C.semilaewis* respectively; Lane2 and Lane4 showed the PCR amplification products of 5S rDNA after labeled with biotin in *P. olivaceus* and *C.laewis* respectively (b) Lane1,

Lane2, Lane3, Lane4 showed the Marker, the PCR amplification products of 5S rDNA sequence in *P. olivaceus*, *S. maximus* and *C.semilaervis* respectively.

以三倍体牙鲆染色体中期分裂相为材料进行了实验, 结果显示, 携带有 5S rDNA 的三个染色体被准确鉴别出, 且细胞上信号明显(图 2-e,f), 杂交信号强弱仍存差异; 各实验均重复了 3 次, 每次各观察了 100 个中期分裂相及细胞, 发现 80%左右的分裂相和细胞上杂交信号特异, 未发现信号数量的增减和位置的变异, 杂交结果可信。

2.4 序列分析

经 PCR 扩增, 分别获得了大菱鲆和半滑舌鲷 5S rDNA 基因扩增产物, 均为 120 bp 的单一一条带(图 3-b, Lane2、3), 条带清晰明亮, 无 RNA 污染; 经克隆和测序, 获得了大菱鲆和半滑舌鲷 5S rDNA 基因编码区序列(120 bp), 且不含引物序列(图 4

SM、CS), 与 GenBank 中的鲽、塞内加尔鲷、大口黑鲈、七鳃鳗的 5S rDNA 基因序列在 MEGA 5.0 软件里进行对位排序(图 4), 从图中可以看出, 7 个序列中无碱基插入或缺失, 5 种鲽形目鱼类 5S rDNA 基因序列高度保守, 同源性高达 98.3%, 均只有 2 个核苷酸位点不同, 其中有 2 个为(G→C)颠换, 5 个(C→T)和 1 个(G→A)转换。而大口黑鲈与鲽形目鱼类序列同源性 96.7%, 有 4 个不同的核苷酸位点, 且均为转换(3 个 T→C, 1 个 A→G); 七鳃鳗与鲽形目鱼类同源性为 94.2%, 有 7 个不同核苷酸位点, 且均为转换(4 个 C→T, 3 个 A→G)。通过计算 7 种鱼类 5S rDNA 基因的碱基组成(表 1)可以看出, 7 种鱼类 5S rDNA 基因序列中 A 碱基和 T 碱基含量大致相等, 未出现碱基偏倚性, 各序列中 G+C 含量显著高于 A+T 含量, 其中, 5 种鲽形目鱼类中

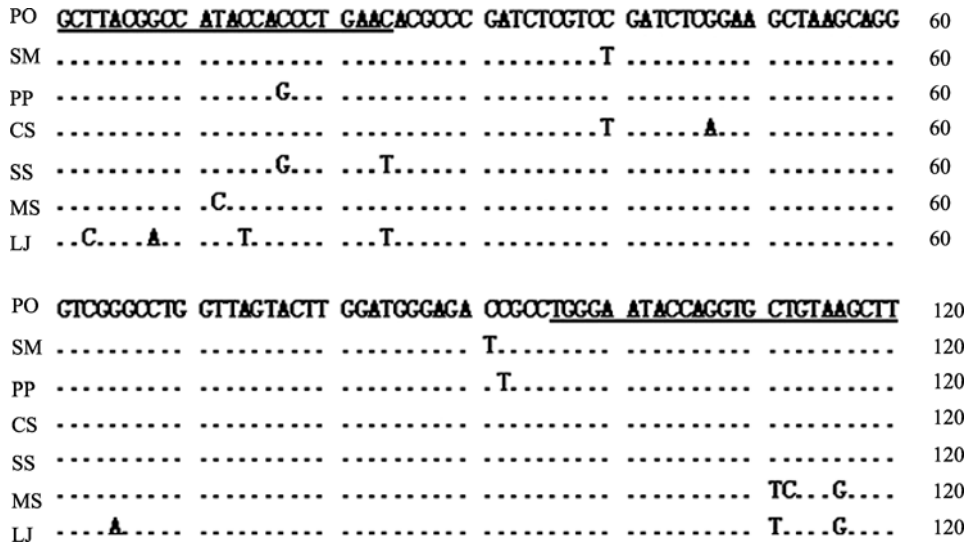


图 4 7 种鱼类 5S rDNA 基因序列比对结果

PO. 牙鲆, SM. 大菱鲆, PP. 鲽, CS. 半滑舌鲷, SS. 塞内加尔鲷, MS. 大口黑鲈, LJ. 七鳃鳗。下划线部分为引物序列。

Fig. 4 The result of 5S rDNA gene sequence alignment of 7 fishes

PO: *P. olivaceus*, SM: *S.maximus*, PP: *P. platessa*, CS: *C. semilaervis*, SS: *S. senegalensis*, MS: *M. salmoides*, LJ: *L. japonica*. The underlined parts represent primer sequence.

表 1 7 种鱼类 5S rDNA 基因序列碱基组成

Tab. 1 The base composition of 5S rDNA gene sequence in seven species of fishes

Table with 7 columns: species, total bases, A, T, G, C, C+G. Rows include Paralicthys olivaceus, Scopthalmus maximus, Pleuronectes platessa, Cynoglossus semilaervis, Solea senegalensis, and Micropterus salmoides.

七鳃鳗 <i>Lampetra japonica</i>	120	21.67	22.5	29.17	26.7	55.87
------------------------------	-----	-------	------	-------	------	-------

各序列的 G+C 含量无明显差异, 平均含量为 57.18%, 大口黑鲈序列中 G+C 含量为 60%, 而七鳃鳗 G+C 含量则为 55.83%。

2.5 系统发生分析

基于 5S rDNA 基因编码区氨基酸序列, 利用 MEGA 5.0 软件, 通过最大似然法构建系统发生树的拓扑结构(图 5)。从系统发育树的结果可以看出, 5 种鲽形目鱼类首先聚为一支, 再与大口黑鲈聚为一大支, 七鳃鳗单独为一支。

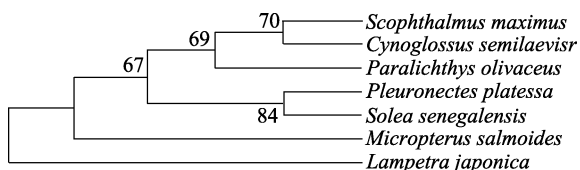


图 5 基于鲽形目 5 种鱼类和外群二种鱼类 5S rDNA 基因编码区序列构建的系统发生树

Fig. 5 The phylogenetic tree constructed with 5S rDNA in five species of Pleuronectiformes and two species of outgroup

3 讨论

3.1 荧光原位杂交

FISH 技术作为进行染色体上基因或 DNA 标记定位的分子细胞遗传学技术得到广泛应用, 不同学者利用该技术对近 50 种鱼类进行了 5S rDNA 定位<sup>[10-11]</sup>。但目前运用 FISH 技术对鲽形目鱼类相关基因的定位研究报道较少。本研究首次将 5S rDNA 基因分别定位于雌、雄性半滑舌鲷的一对同源染色体上, 经多次重复实验后未发现杂交信号位点的变化及信号强弱差异, 因此, 我们认为 5S rDNA 基因在半滑舌鲷二倍体染色体上存在 2 个信号位点。通过对二倍体牙鲆的染色体定位后发现, 5S rDNA 基因在二倍体牙鲆染色体及细胞上存在 2 个杂交信号位点, 信号强弱出现明显差异, 这与日本学者 Fujiwara 等<sup>[9]</sup>的研究结果(杂交信号强弱无差异)略有不同。为验证实验结果的可靠性, 首次对三倍体牙鲆染色体进行了 FISH 定位, 结果显示: 将携带有 5S rDNA 基因的三条染色体被准确鉴别出, 染色体及细胞上的杂交信号强弱也存在明显差异, 经多次重复实验仍出现相同结果, 究其原因, 我们认为可能是由于不同地理群体及进化

环境导致牙鲆染色体上 rDNA 的拷贝数差异、基因扩增、不等交换等因素所造成, Fujiwara 等<sup>[9]</sup>是以日本近海牙鲆作为实验材料, 而本研究所用的是我国近海牙鲆。

由于 5S rDNA 基因具有高度保守性, 通过 FISH 定位可为鱼类的倍性鉴定、染色体鉴别提供新的有效途径。目前, 朱华平<sup>[16]</sup>采用 5S rDNA 基因对银鲫染色体定位及单个染色体的描绘为银鲫提供了直接的三倍体细胞遗传学证据。本研究运用 5S rDNA 基因准确鉴别出三倍体牙鲆的三条染色体, 从而为其它鲽形目鱼类的倍性鉴定提供参考。利用 FISH 技术开发染色体特异性探针标记是一种很有效的染色体鉴别方式<sup>[17]</sup>, Wang 等<sup>[18]</sup>利用 9 个 P1 克隆以及染色体的形态特点成功鉴别了东方牡蛎(*Crassostrea virginica*)的 10 条染色体。Zhang 等<sup>[19]</sup>利用 8 个 Fosmid 克隆鉴别了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)的 8 条染色体。5S rDNA 基因在牙鲆和半滑舌鲷染色体上均出现稳定且特异的杂交信号, 可用作牙鲆和半滑舌鲷染色体鉴别的特异性探针标记使用, 有效应用于染色体鉴别和重排、杂交种的同源性分析及基因作图等研究领域。

3.2 序列及系统发生分析

通过对 5S rDNA 基因序列分析后发现, 7 种鱼类 5S rDNA 序列中 G+C 含量显著高于 A+T 含量。由于 GC 碱基对之间是由 3 个共价键连接的, 而 AT 之间只有 2 个, 生物个体 GC 含量越高, 破坏 GC 间共价键所需要的能量越高, 故 GC 含量高的个体不易发生突变<sup>[20-21]</sup>。5 种鲽形目鱼类的 G+C 含量高达 57.12%, 说明 5S rDNA 基因在鲽形目鱼类中的保守性极高。此外, 5 种鲽形目鱼类的 5S rDNA 基因碱基同源性高达 98.3%, 与硬骨鱼纲中的大口黑鲈同源性为 96.7%, 与软骨鱼纲中的七鳃鳗同源性为 94.2%, 这说明不同鱼类的 5S rDNA 基因编码区序列间的同源性是随种间亲缘关系的远近而表现出不同差异, 这为种间物种亲缘关系的鉴定提供了现实依据。通过构建 5S rDNA 基因的系统发生关系树后发现, 5 种鲽形目鱼类首先聚为一支, 这与 5S rDNA 基因各序列间的同源性高低保持一致。然而, 由于 5S rDNA 基因高度保守、碱基数量

少以及所携带的信息量较少等缺点, 不能更真实且完整的反映鲽形目鱼类不同种之间的进化关系, 但可以为鲽形目鱼类种间鉴定提供必要的参考信息, 在以后的研究中需选取相对 5S rDNA 基因变异程度更大信息量更多的非转录间隔区(NTS)和内转录间隔区(ITS)等对鲽形目鱼类不同种的进化关系作进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 刘志文, 韩旭, 赵明辉, 等. 核糖体 DNA 在植物系统发育中的应用与研究进展[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(9): 3561-3562.
- [2] 马卉, 朱苏文, 程备久. 栽培玉米亚种 5S rDNA NTS 序列分析及 FISH 定位方法比较[J]. 激光生物学报, 2010, 13(9): 403-412.
- [3] 权洁霞, 戴继勋. 荧光原位杂交技术(FISH)在鱼类遗传学研究中的应用及前景[J]. 动物学研究, 1999, 20(3): 225-229.
- [4] Pendas A M, Moran P, Freije J P, *et al.* Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA Cytogenet [J]. Call Genet, 1994, 67: 31-36.
- [5] Phillips R B, Reed K M. Localization of repetitive DNAs to zebrafish(*Danio rerio*)chromosomes by fluorescence in situ hybridization(FISH) [J].Chromosome Research, 2000, 8: 27-35.
- [6] Iturra P, Lam N, Vergara N, *et al.* Characterization of sex chromosomes in rainbow trout and coho salmon using fluorescence in situ hybridization (FISH) [J]. Genetica, 2000, 111: 125-131.
- [7] Phillips R B, DeKoning B J, Morasch M R. Identification of the sex chromosome pair in chum salmon (*Oncorhynchus keta*)and pink salmon(*Oncorhynchus gorbuscha*) [J].Cytogenet Genome Res, 2007, 116: 298-304.
- [8] Martins C, Pedro M. Chromosomal localization of 5S rDNA genes in *Leporinus* fish(Anostomidae, Characiformes) [J].Chromosome Research, 2006, 7: 363-367.
- [9] Fujiwara A, Fujiwara M, Nishida-Umehara C, *et al.* Characterization of Japanese flounder karyotype by chromosome bandings and fluorescence in situ hybridization with DNAMarkers [J].Genetica, 2007, 131: 267-274.
- [10] Cross I, Merlo A, Machado M, *et al.* Cytogenetic characterization of the sole *Solea senegalensis* (Teleostei: Pleuronectiformes: Soleidae): Ag-NOR, (GATA)<sub>n</sub>, (TTAGGG)<sub>n</sub> and ribosomal genes by one-color and two-color FISH [J]. Genetica, 2006, 128: 253-259.
- [11] 隋娟. 褐牙鲆、夏鲆杂交及回交子代的早期发育及细胞遗传学研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2011.
- [12] 王磊, 陈松林, 谢明树, 等. 牙鲆三倍体批量化诱导及其生长和性腺发育观察[J]. 水产学报, 2011, 35(8): 1258-1265.
- [13] 沙珍霞, 陈松林, 田永胜. 圆斑星鲽染色体核型分析[J]. 中国水产科学, 2007, 14(3): 478-481.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The Chstal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [15] 张绍萍, 张晓军, 相建海. 热休克蛋白 70(HSP70)基因在中国对虾染色体上的定位[J]. 中国水产科学, 2004, 11(6): 497-500.
- [16] 朱华平. 染色体荧光原位杂交技术(FISH)在银鲫倍性分析中的应用[D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 2006.
- [17] 郇聘, 张晓军, 李富花, 等. 等栉孔扇贝热休克蛋白 70(HSP70)基因的 BAC-FISH 定位[J]. 海洋科学, 2009, 33(7): 10-15.
- [18] Wang Y, Xu Z, Pierce J C, *et al.* Characterization of eastern oyster (*Crassostrea virginica* Gmelin) chromosomes by fluorescence in situ hybridization with bacteriophage P1 clone[J]. Marine Biotechnology, 2005, 7(3): 207-214.
- [19] Zhang L, Bao Z, Wang S, *et al.* FISH mapping and identification of Zhikong scallop (*Chlamys farreri*) chromosomes[J]. Marine Biotechnology, 2008, 10(2): 151-157.
- [20] 喻达辉, 李有宁, 吴开畅. 中国、日本和澳大利亚珍珠贝的 ITS2 序列特征分析[J]. 南方水产, 2005, 1(2): 1-6.
- [21] 张波, 孟学平. 蚶科三种贝类 ITS2 核苷酸序列分析[J]. 石河子大学学报, 2008, 26(2): 224-227.

## Chromosome mapping of 5S rDNA in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*) and molecular systematics analysis of five flatfishes

XIE Ming-shu<sup>1,2</sup>, SUN Bing<sup>1,2</sup>, ZHANG Bo<sup>1</sup>, SHAO Chang-wei<sup>2</sup>, WANG Qi-long<sup>2</sup>,  
WANG Lei<sup>2</sup>, CHEN Song-lin<sup>2\*</sup>

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** Using fluorescence in situ hybridization (FISH), 5S rDNA gene was mapped on chromosomes of half-smooth tongue-sole (*Cynoglossus semilaevis*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) for the first time. The results showed that 5S rDNA has two hybridization signal loci in a pair of homologous chromosomes of male and female half-smooth tongue-sole, respectively; 5S rDNA has two and three hybridization signal loci in a pair of homologous chromosomes of diploid and triploid olive flounder, respectively, referring to the clear and specific hybridization signals. FISH mapping of 5S rDNA genes on the chromosomes of diploid half-smooth tongue-sole and triploid olive flounder provides a feasible method for ploidy and chromosome identification of half-smooth tongue-sole and olive flounder. In addition, the coding region sequences of 5S rDNA gene of turbot (*Scophthalmus maximus*) and half-smooth tongue-sole were amplified using same primers designed for olive flounder 5S rDNA gene, and the phylogenetic analysis of the 5S rDNA genes in four species of flatfishes, including plaice (*Pleuronectes platessa*), senegalese sole (*Solea senegalensis*), largemouth bass (*Micropterus salmoides*) and arctic lamprey (*Lampetra japonica*) showed that the 5S rDNA gene of five species of flatfishes shared high homology (98.3%) and gathered into a branch. The GC content was significantly higher than the AT content in conservative sequence of 5S rDNA coding region of these five species of flatfishes.

**Key words:** *Paralichthys olivaceus*; *Cynoglossus semilaevis*; 5S rDNA; FISH; pleuronectiformes; phylogeny

**Corresponding author:** CHEN Song-lin. E-mail: chensl@ysfri.ac.cn