

文章编号:1000-0615(2010)05-0696-08

DOI:10.3724/SP.J.1231.2010.06659

中华绒螯蟹核糖体 DNA 全序列分析

俞菊华, 李红霞, 戈贤平*, 李建林, 唐永凯

(中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 农业部水生动物遗传和养殖生物学重点实验室, 江苏 无锡 214081)

摘要:核糖体 DNA 通常被选作系统发育研究的分子标记,核糖体 DNA 中 IGS 部分序列的变异在一定程度上影响着生物的生长。报道了中华绒螯蟹核糖体 DNA 全序列的分离和序列特征。中华绒螯蟹核糖体 DNA 全长 11 660 bp,包括 18S(1 873 bp),ITS1(317 bp),5.8S(163 bp),ITS2(614 bp),28S(4 461 bp)和 IGS(4 240 bp);不同部分 AT 含量在 40.1%~48.6%之间,低于果蝇(55.8%~80.0%),高于鲤(22.0%~43.7%)。平均 100 个核苷酸含简单重复序列(SSR)数由高到低依次为 ITS2(0.98%),IGS(0.49%),28S(0.38%),ITS1(0.32%),18S(0.21%),5.8S(0%)。个体内差异分析结果表明,中华绒螯蟹个体内存在两类 ITS2 序列,其中一类在 405 nt 处有一 12 bp(CG CAGGACCACC)插入序列。中华绒螯蟹 rDNA 的 IGS 部分长 4 240 bp,AT 含量为 42.6%。IGS 部分包含一个有约 7 个连续 136~139 bp 单元组成的重复序列区,重复序列单元中存在 *Xho* I 内切酶位点,为河蟹特有的重复序列;重复序列区后有一个由 182 个碱基对形成的柄和 21 bp 的环组成的发夹结构。中华绒螯蟹核糖体 DNA 序列的揭示将为继续研究不同地理种群间的差异标记和挖掘与生长率相关的核糖体 DNA 分子特性提供理论基础。

关键词:中华绒螯蟹;核糖体 DNA;个体内差异;IGS 结构

中图分类号:Q 523⁺.8;S 917

文献标识码:A

核糖体作为蛋白质合成的“加工厂”,在生命活动中起着重要作用。在真核细胞中接近一半的 RNA 转录子是核糖体 RNA(ribosome RNA, rRNA)。同时核糖体的生物合成也是营养物质和生物能量的沉积,干细胞的 20% 是核糖体。因此,核糖体的生物合成是细胞最主要代谢过程之一^[1-2]。核糖体由两个亚单位组成,分别包含 1 个或者 3 个大 RNA 分子,即核糖体 RNA(rRNA),和一系列小蛋白分子组成。核糖体 RNA 由核糖体 DNA 编码,它们在真核细胞中以簇的形式存在于不同的染色体上,核糖体 DNA 簇是很多核糖体 DNA 前体以头尾相连的形式组成重复区,一个核糖体 DNA 前体单元可编码 3 个成熟 rRNA(包括 18S,5.8S,28S),3 个成熟 RNA 之间分别由内转录区 1 和 2(internal transcribed spacers, ITS-1 和 ITS-2)分割开,核糖

体 DNA 前体单元之间由不转录的 DNA 序列以及在 18S 和 28S 两头的外转录区(external transcribed spacers,5'-ETS and 3'-ETS)分割,通常把这些序列称为基因内间隔区(intergenic spacer, IGS),在非转录 DNA 序列内包含了核糖体 DNA 转录的启动子以及增强子,增强子通常为一些重复序列^[3-4]。有较多研究证明,rDNA 基因的转录效率与生物生长密切相关,而 rDNA 基因的转录效率又受许多因素的影响,如 rDNA 的拷贝数、IGS 长度,后者主要是增强子部分差异、启动子区域序列以及 IGS 甲基化程度等^[2,5-7]。另一方面,由于 rDNA 多拷贝以及不同区域进化速度不同,因此 rDNA 通常被作为研究系统进化的分子标记^[8-9],选择 rDNA 的不同区域可以研究不同分类地位生物之间的关系,如选择保守性较高的成熟 rRNA 区如 18S,5.8S 和

收稿日期:2009-10-20 修回日期:2010-01-19

资助项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007JBFB10);农业行业专项优质蟹种规模化繁育与养殖示范(nyhyzx07-045);农业部水生动物遗传育种和养殖生物学重点开放实验室开放课题(BM2007-04)

通讯作者:戈贤平,Tel:0500-85554193,E-mail:gexp@ffrc.cn;dnase@163.com

28S 可以研究科、目以上生物之间的亲缘关系^[10-13],而使用保守性较低的 ITS 和 IGS 区可以研究属间、种间甚至种群间的关系^[14-16]。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),属于方蟹科(Grapsoidae),是我国主要水产养殖动物之一,在我国存在着不同的地理种群,不同地理种群之间生长速度存在着较大的差异。因此,有必要寻找一种分子标记区分不同地理种群,探讨不同地理种群之间生长差异的分子基础。有关不同地理种群之间的分子标记,国内有较多学者研究,如孙红英等^[17]使用线粒体 DNA 中 16S rDNA 序列探讨了绒螯蟹类的系统发生关系。本文分离了中华绒螯蟹核糖体 DNA 全序列,揭示了 ITS-1 和 ITS-2 个体内差异,分析了 IGS 结构,为今后进一步研究这些基因寻找有用的分子标记奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物及 DNA 抽提

试验用中华绒螯蟹为长江水系苗种,在太湖围网中养殖的成蟹。DNA 抽提试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,按照说明书抽提蟹肌肉的基因组 DNA。

1.2 引物和 PCR

本实验所用引物信息包括在核糖体 DNA 上

的位置、扩增片段长度等见表 1,图 1。其中引物 F1, R1, R2, R3, R4, R5 是根据核糖体 DNA 不同区域保守序列设计,其它引物则根据本实验得到的相应序列设计。实验步骤如下,首先使用 F1 - R1 扩增 18S 部分片段,根据得到序列设计引物 F2,与保守引物 R2 扩增 18S 3'端到 5.8S;再设计 F3 与保守引物 R3 扩增 18S ~ 28S 片段,包含完整的 ITS 和 5.8S;再设计 F4 与 28S 中保守引物 R4 扩增 28S 部分序列;再设计 F5 与保守引物 R5 扩增 28S 其它部分序列;最后根据 28S 3'端设计 F6,18S 5'端设计 R6,扩增 IGS 部分序列。F3 - R3 引物对使用含 GC Buffer I 的 LA *Taq* 酶(Takara)(扩增效果优于普通 *Taq* 酶)进行 PCR 扩增,F5 - R5 和 F6 - R6 引物对使用普通 Buffer 的 LA *Taq* 酶(Takara)。其他引物对 PCR 扩增均使用普通 *Taq* 酶(Promega)。PCR 扩增仪为 Eppendorf mastercycler gradient。PCR 反应总体积 50 μ L,其中含模板基因组 DNA 100 ~ 150 ng,引物 10 pmol,其它成分按 *Taq* 酶说明书添加。PCR 反应条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 2 min,30 个循环 94 $^{\circ}$ C 30 s,55 ~ 58 $^{\circ}$ C 30 s(根据不同引物调整),72 $^{\circ}$ C 1 ~ 4 min(根据扩增片段长度调整)。

表 1 用于分离中华绒螯蟹 rDNA 的引物

Tab.1 Primers used in isolation of rDNA of the Chinese mitten crab

引物 primer	序列 sequence	位置(nt) site	产物长度(bp) product length
F1	CATATGCTTGTCTCAAAGATTAAG	18S: 25 ~ 48	1 318
R1	CCAGACAAATCGCTCCACCAAC	18S: 1342 ~ 1321	
F2	ATTGACGGAAGGGCACCACC	18S: 1176 ~ 1195	1 045
R2	CGAGCCGAGTGATCCACCGT	5.8S: S 30 ~ 11	
F3	TCGTAACAAGGTTTCCCTAGGTGA	18S: 1831 ~ 1854	1 459
R3	TATTTAGCCTTAGATGGAGTTTACCACC	28S: 300 ~ 273	
F4	TCGGGTTGCTTGAGAATGCAGCCCTAAG	28S: 243 ~ 270	992
R4	CAGGCATAGTTCACCATCTTTCCG	28S: 1264 ~ 1242	
F5	GGCAAGTACCATGAGCAGACATG	28S: 1211 ~ 1233	3 079
R5	CGACGGTCTAAACCCAGCTCAC	28S: 4289 ~ 4268	
F6	GGTGTAGCATAAGTGGGAGGTCGTCGCATCAG	28S: 3687 ~ 3718	5 151
R6	CAGCGACAAGTTATTCAGATTCAACACGGTGGG	18S: 278 ~ 246	

1.3 PCR 产物的克隆及测序

PCR 反应液经 1% 琼脂糖电泳分离,切割目的条带,使用胶回收试剂盒(上海申能博彩生物有限公司)回收,后与 pMD18-T 或 pMD20-T 载体(Takara)16 $^{\circ}$ C 连接 2 h 以上,后转入 DH5 α 敏

感态细胞,于 LB *Amp*⁺ 平板上培养过夜,挑选白色菌落 LB *Amp*⁺ 液体培养基中扩大培养,使用质粒抽提试剂盒(上海申能博彩生物有限公司)抽提质粒,使用 *Eco*R I + *Hind* III 双酶切验证阳性克隆,每个平板至少送 3 个阳性克隆到上海博尚

生物有限公司测序,其中较长片段由生物公司采取中间交叉设计引物方法予以测序,最后根据峰图确定序列。

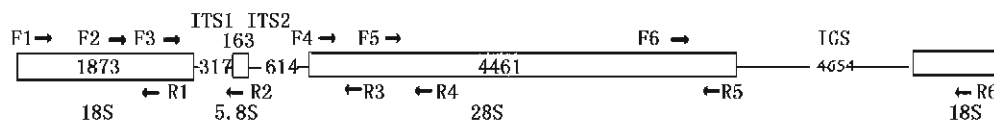


图1 中华绒螯蟹 rDNA 结构图

图示实验用引物所在位置,数字代表 rDNA 不同区域的核苷酸数。

Fig. 1 Sketch map of rDNA in the Chinese mitten crab

Primer sites were displayed on the map. The numbers represented numbers of nucleotides in different regions.

1.4 序列分析

序列用 DNASTar 软件包中的 EditSeq 进行拼接并计算 AT 含量。将拼接好的序列用 NCBI 上的 Blast 软件,根据不同部分序列同源性确定边界。使用 SSRHunter 3.1 软件查找简单重复序列,手工比对得出 IGS 序列中的较长重复单元及自互补结构或发夹结构。

2 结果与讨论

2.1 中华绒螯蟹的完整 rDNA 序列

拼接分段 PCR 结果,获中华绒螯蟹 rDNA 全长 11 660 bp。使用 Blast 软件和其它动物 rDNA 的序列比较,确定各部分边界,中华绒螯蟹 rDNA 基因从 5'端至 3'端依次为 18S rRNA, ITS-1, 5.8S rRNA, ITS-2 和 28S rRNA。其中,18S rDNA 全长 1 837 bp, AT 含量为 48.6%,与其他甲壳动物有着高度的相似性,如与 *H. tridens shenei* (GenBank accession number: Z70525) 相似性高达 99%,与中华豆蟹 (*Pinnotheres pisum*) (GenBank accession number: Z25817) 相似性为 97%,与美洲螯龙虾 (*Homarus americanus*) (GenBank accession number: AF235971) 及 *Geocharax gracilis* (GenBank accession number: AF235968) 相似性也分别达到 95% 和 94%。中华绒螯蟹的 5.8S 全长 163 bp, AT 含量为 43.6%,与其他十足目动物序列同源性与传统分类地位一致,如与同属爬行亚目的克氏原螯虾 (*Procambarus clarkia*) (GenBank accession number: GQ369797) 的相似性为 90.58%,与游泳亚目长臂虾科沼虾属的日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) (GenBank accession number: GQ369795) 和罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergii*) (GenBank accession number: GQ369796)、白虾属的秀丽白虾

(*Palaemonidae Exopalaemon cf. modestus*) (GenBank accession number: GQ369793) 和脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda* Honhis) (GenBank accession number: GQ369794) 的相似性分别为 82.82% 和 81.6%,与螯肢动物亚门的美洲螯 (*Limulus polyphemus*) (GenBank accession number: AF212167) 的相似性稍低为 71.34%。中华绒螯蟹 28S 全长 4 461 bp, AT 含量为 40.3%,由于没有类似全长 28S 序列,没有进行比较。ITS1 和 ITS2 长度分别为 317 bp、614 bp, AT 含量分别为 40.1% 和 42.8%。ITS 长度与虎甲^[18] (*Cindefa dorsalis*)、按蚊^[19] (*Anopheles nuneztovari*) 相似,但明显短于克原氏螯虾 (ITS-1, ITS-2 长度分别为 760 bp、1 300 bp)^[20]。IGS 区 (包括两个分别位于 28S 的 5'端和 18S 的 3'端的 ETS) 长 4 240 bp。中华绒螯蟹 rDNA 不同区域的 AT 含量 (40.1% ~ 48.6%) 显著低于果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (55.8% ~ 80.0%),高于鲤 (*Cyprinus carpio*) (22.0% ~ 43.7%)^[21] (表 2)。已有研究表明, DNA 中 GC 含量越高,分子结构越稳定^[22]。因此,我们认为,中华绒螯蟹 rDNA 比果蝇稳定,但比鲤低,稳定性是否与动物进化程度有关还需要分析更多动物的序列。

2.2 中华绒螯蟹 rDNA 中 SSR 位点

简单重复序列 (SSR) 是由 1 ~ 6 bp 为重复单位串联组成的高度重复序列。本文应用了 SSRHunter 软件搜索中华绒螯蟹 rDNA 中的 SSR 位点。结果显示,在整个 rDNA 序列中,重复次数为 3 ~ 7 的简单重复序列共有 51 处。18S、ITS-1、ITS-2、28S、IGS 区域分别包括 4、1、6、17、23 个 SSR 位点。每 100 个核苷酸中含有 SSR 位点的比值最高的为 ITS-2 (0.98%), 依次为 IGS (0.49%)、28S (0.38%)、ITS-1 (0.32%)、18S

(0.21%), 5.8S(0)(表3)。一般认为 SSR 区由于 DNA 复制过程中的滑动容易出现变异,因此可以推测 ITS2 序列可能存在较多的变异。

表 2 中华绒螯蟹、鲤及果蝇 rDNA 序列长度、碱基组成的比较

Tab.2 Comparisons of lengths and base compositions of rDNA genes in *E. sinensis*, *C. carpio* and *D. melanogaster*

	中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>		鲤 <i>C. carpio</i>		果蝇 <i>D. melanogaster</i>	
	长度 length	% A + T	长度 length	% A + T	长度 length	% A + T
18S	1 873	48.6	1834	43.7	1 995	57.4
ITS1	317	40.1	368	34.0	726	73.0
5.8S	163	43.6	160	40.0	181	55.8
ITS2	614	42.8	381	22.0	385	80.0
28S	4 461	40.3	2 270	35.6	3 945	60.9
IGS	4 240	42.6	5 059	34.9	4 794	71.4

注: GenBank 登录号码, 鲤 rDNA(AF133089); 果蝇(M21017); 中华绒螯蟹 rDNA 18S(GU362670); 中华绒螯蟹 rDNA 28S(GU362671)。
Notes: GenBank accessory number, *C. carpio* rDNA(AF133089); *D. melanogaster*(M21017); *E. sinensis* rDNA 18S(GU362670); *E. sinensis* rDNA 28S(GU362671)。

表 3 中华绒螯蟹 rDNA 序列不同区域中的 SSR 位点

Tab.3 Potential SSR loci in different regions of *E. sinensis* rDNA genes*

rDNA 区域 rDNA region	SSR 位点, 序列及重复数 SSR site, sequence and repeat number	SSR 比(%) ratio of SSR **
18S	1297 (GGT)3; 1419 (CIT)3; 1507 (CG)3; 1676 (AC)3	0.21
ITS1	215 (CA)3	0.32
ITS2	170 (GGA)4; 193 (TC)3; 405 (AAC)5; 431 (GTC)3; 440 (TG)3; 539 (TCT)3	0.98
28S	126 (TC)3; 211 (GA)3; 231 (CT)3; 358 (AG)4; 752 (TG)3; 1094 (GC)3; 1153 (CG)3; 1714 (GT)3; 1953 (GA)4; 2110 (GA)3; 2453 (CTG)4; 2742 (GC)3; 3035 (GC)3; 3248 (CT)4; 3281 (AGC)3; 3499 (CT)3; 3851 (GC)3	0.38
IGS	62 (GA)3; 388 (CGA)5; 550 (GGG)3; 627 (GTT)3; 1663 (TG)3; 2787 (CA)4; 2921 (CA)4; 2957 (CA)3; 3218 (CG)3; 3312 (CGG)3; 3371 (GC)3; 3447 (TC)3; 3458 (GC)3; 3607 (CT)3; 3709 (CT)5; 3721 (CT)3; 3775 (CGC)3; 3893 (GCT)7; 3959 (CAG)3; 4016 (CG)3; 4028 (GAG)3; 4072 (CAT)3; 4184 (GC)3	0.49

注: * 基于 GenBank 序列的分析结果(正在获取基因登录号)。** SSR 比 = SSR 数目/序列长度。

Notes: * The analysis result is based on the sequence deposited in GenBank (being submitted). ** Ratio of SSR = number of SSR/sequence length.

2.3 ITS 的个体内部差异

使用 F3 - R3 引物对扩增 ITS 全序列, 比较来自同一个体的 4 个克隆序列, 结果, 5.8S(均为 163 bp) 和 ITS1(317 ~ 318 bp) 完全一致或者仅一个核苷酸位点存在差异。ITS2 序列差异较为明显, 4 个克隆长度分别为 1 049, 1 049, 1 047, 1 042, 比对结果显示其中 1 个克隆在比对位置 425 ~ 437 nt 之间有 12 bp 序列(CGCAGGACCA CC) 插入, 该位点两侧的两个简单重复序列 AAC、GTC 的重复数在有 12 bp 的类型中分别是 3, 1, 而没有插入的则为 5, 3。同种 3 个 ITS2 序列相似程度高达 99.7%, 两种 ITS2 之间相似性 97.6%(图 2)。这说明中华绒螯蟹的 ITS2 区域存在个体内部差异。此外, 通过下载 GenBank 中我国不同地理种群中华绒螯蟹长江种群 2 个、瓯

江种群 2 个、辽河种群 2 个、闽江种群 2 个和合浦种群 3 个个体的 ITS2 序列一起比对, 发现长江种群的两个个体, 瓯江种群的两个个体及合浦种群的一个个体的 ITS2 内部均存在 12 bp 的插入片段(图 3), 很显然这一插入在不同种群中均有可能出现, 从本实验结果推测, 如果每个个体测定不止一个克隆, 很有可能两种 ITS2 均会出现。随着对不同动物 ITS 研究的深入, ITS 序列存在个体内差异的现象在克原氏螯虾(*Procambarus clarkii*); 涡虫(*Dugesia mediterranea*); 按蚊(*Anopheles minimus*); 蝗虫(*Chorthippus parallelus*)^[20, 23-25]均有发现, 特别在重复片段部分。一般认为由于协同进化使得基因簇重复单元之间序列一致性很高, 也正因此通常认为核糖体 DNA 序列在个体内没有差异, 使用该基因进

行系统发育研究时不需要测定多个克隆;而出现个体内差异的原因有学者推测是因为协同进化速度慢于物种形成,从而基因组内保留有旁系同源基因^[20]。在河蟹个体内存在两种明显不同

ITS2,提醒今后使用 PCR 扩增 ITS2 用于系统发育方面的研究时有必要分析多条克隆序列,以消除个体内差异。

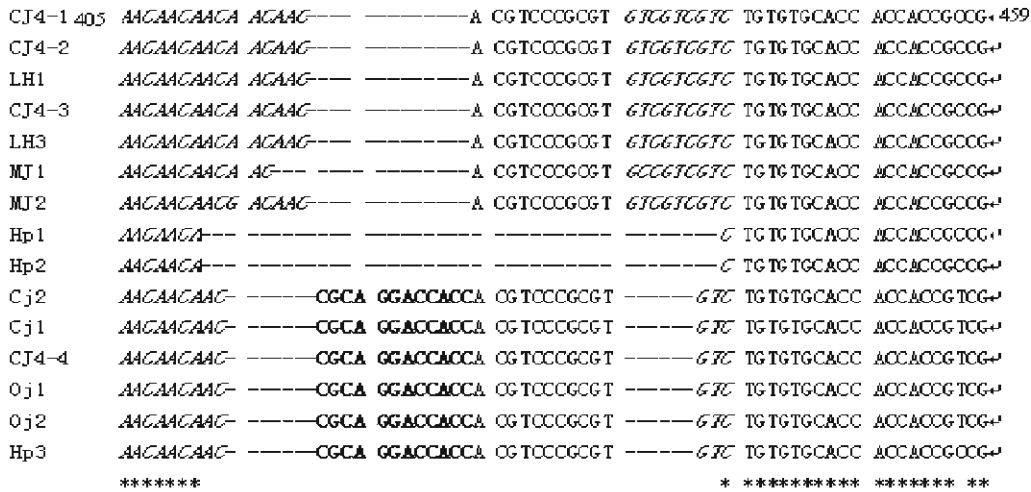


图2 ITS2 区域变异位点图

CJ4 -1, -2, -3, -4 代表同一个体的不同克隆序列。其他,分属于长江(CJ),瓯江(Oj),辽河(LH),闽江(MJ),合浦(Hp)地理种群个体的序列下载自 GenBank(No. :AF315670 - 79, AF315655 - 57)。

Fig. 2 Variants in ITS2 region

CJ4 -1, -2, -3, -4 represent different sequences of same individual. Other sequences were from GenBank (Accession No. : AF315670 - 79, AF315655 - 57). They are different individuals from Yangze river (CJ), Oujiang (OJ), Liaohe (LH), Mingjiang (MJ), Hepu (Hp).

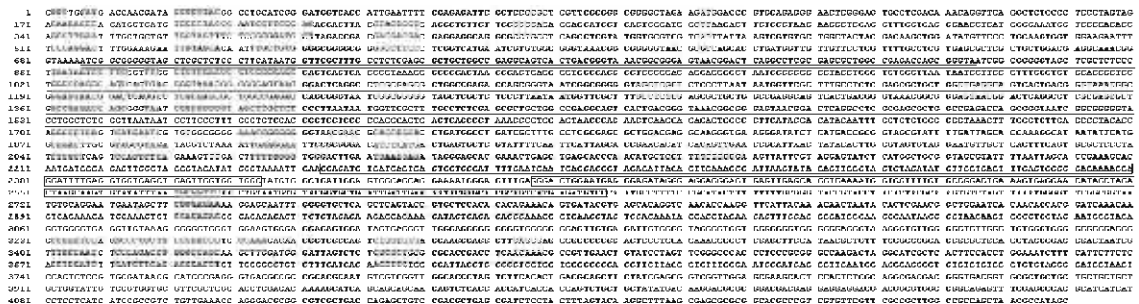


图3 中华绒螯蟹 rDNA 的 IGS 区域序列

下划线标示重复序列区域, 双下划线标示的为第一个 139 bp 的重复单元, 方框内为自互补区域。

Fig. 3 IGS region sequence of rDNA in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*

Repetitive region was underlined, the first 139 bp repetitive unit was double underlined. Self-complementary region was in frame.

2.4 IGS 的结构

中华绒螯蟹的 IGS 长 4 240 bp, 包括: 紧接 28S rDNA 的一段 685 bp 的非重复区, AT 含量为 42. 77%; 接着是含有 7 个连续 136 ~ 139 bp 单元组成的 AT 含量为 36. 10% 重复序列区 923 bp, 最后一个重复单元比前 6 个少 50 bp, 每个重复单元中存在一个 *Xho* I 内切酶位点 (CTCGAG); 接着

为 647 bp, AT 含量为 50. 54% 的非重复序列; 然后为 385 bp AT 含量 54. 03% 的片段, 该片段的前 182 bp 与最后 182 bp 互补, 形成 182 个碱基对组成的柄和 21 bp 的环的发夹结构; 发夹结构后为长 1 602 bp 的非重复区域, 根据 AT 含量可将该区分为 3 个部分, 前 490 bp, AT 含量 50. 61%, 中间 246 bp, AT 含量最低 30. 89%, 后 866 bp,

AT 含量为 40.18% (图 3)。

IGS 内的重复序列,也称核糖体的增强子,可以通过启动子核心序列促进核糖体基因转录,研究表明,重复序列的长度与生物生长性能有一定的关系^[6],此外,该重复单元也具有物种特异性,如非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)^[26]为 60 和 81 bp,果蝇^[27]为 240 bp 和 330 bp,小鼠(*Mus musculus*)^[28]为 140 bp,老鼠含有多个不同大小的重复单元^[29],棘阿米巴原虫(*Acanthamoeba*)^[30]为 140 bp。和中华绒螯蟹分类地位相近的梭子蟹重复序列区长 3 332 bp 且含有 4 个重复单元^[31],其中重复单元 1 和 3 构成回文结构,相比之下,中华绒螯蟹 IGS 中重复单元只有一种,重复单元组成的重复序列区也较短,形成回文结构的序列长度也只有 385 bp,和梭子蟹有着明显差异,说明两种蟹 rDNA 不同的进化模式。中华绒螯蟹在我国水产动物养殖中占有重要的地位,不同地理种群中华绒螯蟹在生长速度等方面有着较大的差异,IGS 是核糖体 DNA 中变异最大的部分,研究认为可揭示种群水平的遗传差异^[8-9],IGS 中重复区的长度与生物生长性能有着密切关联。因此,今后可利用本文提供的中华绒螯蟹 IGS 序列,研究我国不同地理种群中华绒螯蟹 IGS 序列间差异,利用 IGS 中重复单元作为探针,使用 Southern 杂交技术检测不同地理种群中华绒螯蟹、不同生长性能中华绒螯蟹重复序列区长度的差异,探讨使用该序列评价中华绒螯蟹种质优良的可行性。

参考文献:

- [1] Gourse R L, Gaal T, Bartlett M S, *et al.* rRNA transcription and growth rate dependent regulation of ribosome synthesis in *Escherichia coli* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 1996, 50(1): 645-677.
- [2] Weider L J, Elser J J, Crease T J, *et al.* The functional significance of ribosomal (r) DNA variation: impacts on the evolutionary ecology of organisms [J]. *Ann Rev Ecol Evol Syst*, 2005, 36(12): 219-242.
- [3] Mougey E B, Pape L K, Sollner-Webb B. Virtually the entire *Xenopus laevis* rDNA multikilobase intergenic spacer serves to stimulate polymerase I transcription [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(43): 27138-27145.
- [4] Paule M R, White R J. Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(6): 1283-1298.
- [5] Gorokhova E, Dowling T E, Weider L J, *et al.* Functional and ecological significance of rDNA intergenic spacer variation in a clonal organism under divergent selection for production rate [J]. *Proc R Soc Lond B*, 2002, 269(1507): 2373-2379.
- [6] Weider L J, Glenn K L, Kyle M, *et al.* Associations among ribosomal (r) DNA intergenic spacer length variation, growth rate, and C:N:P stoichiometry in the genus *Daphnia* [J]. *Limnol Oceanogr*, 2004, 49(4): 1417-1423.
- [7] Sharma S, Balyan H S, Gupta P K. Adaptive methylation pattern of ribosomal DNA in wild barley from Israel [J]. *Barley Genetics Newsletter* 2005, 35: 27-35.
- [8] Hillis D M, Dixon M T. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference [J]. *Rev Biol*, 1991, 66(4): 411-453.
- [9] Mindell D P, Honeycutt R L. Ribosomal RNA in vertebrates: evolution and phylogenetic applications [J]. *Annu Rev Ecol Syst*, 1990, 21(11): 541-566.
- [10] Friedrich M, Tautz D. Ribosomal DNA phylogeny of the major extant arthropod classes and the evolution of myriapods [J]. *Nature*, 2002, 376(7): 165-167.
- [11] Aguinaldo A M, Turbeville J M, Linford L S, *et al.* Evidence for a clade of nematodes, arthropods and other moulting animals [J]. *Nature*, 1997, 387(6632): 489-493.
- [12] Whiting M F. Phylogenetic position of the Strepsiptera: review of molecular and morphological evidence [J]. *Int J Morphol Embryol* 1998, 27(1): 53-60.
- [13] Hwang U W, Kim W. General properties and phylogenetic utilities of nuclear ribosomal DNA and mitochondrial DNA commonly used in molecular systematic [J]. *The Korean Journal of Parasitology*, 1999, 37(4): 215-228.
- [14] Morgen J A T, Blair D. Relative merits of nuclear ribosomal internal transcribed spacers and mitochondrial COI and ND1 genes for distinguishing among *Echinostoma species* (Trematoda) [J]. *Parasitology*, 1998, 116(3): 289-297.
- [15] Navajas M, Lagnel J, Gutierrez J, *et al.* Species-wide homogeneity of nuclear ribosomal ITS2 sequences in the spider mite *Tetranychus urticae*

- contrasts with extensive mitochondrial *COI* polymorphism[J]. *Heredity*, 1998, 80(6): 742 - 752.
- [16] Perera O P, Cockburn A F, Mitchell S, *et al.* Species-specific repeat units in the intergenic spacer of the ribosomal RNA cistron of *Anopheles aquasalis* Curry [J]. *Am J Med Hyg*, 1998, 59(5): 673 - 678.
- [17] 孙红英, 周开亚, 杨小军. 从线粒体 16S rDNA 序列探讨绒螯蟹类的系统发生关系[J]. *动物学报*, 2003, 49(5): 592 - 599.
- [18] Vogler A P, DeSaller R. Evolution and phylogenetic information content of the ITS-1 region in the tiger beetle *Cicindela dorsalis* [J]. *Mol Biol Evol*, 1994, 11(3): 393 - 405.
- [19] Fritz G N, Conn J, Cockburn A F, *et al.* Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 from populations of *Anopheles nuneztovari* (Diptera: Culicidae) [J]. *Mol Biol Evol*, 1994, 11(3): 406 - 416.
- [20] Harris D J, Crandall K A. Intragenomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): implications for phylogenetic and microsatellite studies [J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(2): 284 - 291.
- [21] Vera M I, Molina A, Pinto R, *et al.* Genomic organization of the rDNA cistron of the teleost fish *Cyprinus carpio* [J]. *Biol Res*, 2003, 36(2): 241 - 251.
- [22] Yakovchuk P, Protozanova E, Frank-Kamenetskii M D. Base-stacking and base-pairing contributions into thermal stability of the DNA double helix [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2): 564 - 574.
- [23] Carranza S, Giribet G, Ribera C, *et al.* Evidence that two types of 18S rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schmidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida) [J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(6): 824 - 832.
- [24] Li C, Wilkerson R C. Intragenomic rDNA ITS2 variation in the Neotropical *Anopheles (Nyssorhynchus) albivittatus* complex (Diptera: Culicidae) [J]. *J Hered*, 2007, 98(1): 51 - 59.
- [25] Parkin E J, Butlin R K. Within and between individual sequence variation and among ITS1 copies in the meadow grasshopper *Chorthippus parallelus* indicates frequent intrachromosomal gene conversion [J]. *Mol Biol Evol*, 2004, 21(8): 1595 - 1601.
- [26] Reeder R H. Enhancers and ribosomal gene spacers [J]. *Cell*, 1984, 38(2): 349 - 351.
- [27] Grimaldi G, Dinocera P P. Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(15): 5502 - 5506.
- [28] Kuhn A, Deppert U, Grummt I. A 140-base-pair repetitive sequence element in the mouse rRNA gene spacer enhances transcription by RNA polymerase I in a cell-free system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87(19): 7527 - 7531.
- [29] Cassidy B G, Yang-Yen H F, Rothblum L I, *et al.* Transcriptional role for the nontranscribed spacer of rat ribosomal DNA [J]. *Mol Cell Biol*, 1986, 6(8): 2766 - 2773.
- [30] Paule M R, Bateman E, Hoffman L, *et al.* Initiation and regulation mechanisms of ribosomal RNA transcription in the eukaryote *Acanthamoeba castellanii* [J]. *Mol Cell Biochem*, 1991, 104(1 - 2): 119 - 126.
- [31] Ryu S H, Do Y, Hwang W, *et al.* Ribosomal DNA intergenic spacer of the swimming crab, *Charybdis japonica* [J]. *J Mol Evol*, 1999, 49(6): 806 - 809.

Characteristics analysis of complete ribosomal DNA sequence in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)

YU Ju-hua, LI Hong-xia, GE Xian-ping*, LI Jian-lin, TANG Yong-kai

(Key Laboratory for Genetic Breeding of Aquatic Animals and Aquaculture Biology Certificated by the Ministry of Agriculture, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Ribosomal DNA is usually selected as molecular marker for phylogenetic study and the sequence variances especially in IGS region can affect the growth rate of organisms to certain extent. A complete rDNA of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) was isolated in this study. The rDNA is 11 660 bp in size and consists of 18S(1 873 bp), ITS-1(317 bp), 5.8S(163 bp), ITS-2(614 bp), 28S(4 461 bp) and IGS(4 240bp). The (AT) contents of different regions range from 40.1% to 48.6%, which are lower than those in *Drosophila melanogaster* (55.8% – 80.0%) and higher than *Cyprinus carpio* (22.0% – 43.7%). The SSR loci per 100 nucleotides in the sequence of descending are ITS-2 (0.98%), IGS (0.49%), 28S (0.38%), ITS-1 (0.32%), 18S (0.21%), 5.8S (0%). The results of ITS2 intra-variances analysis showed that two types of ITS-2 existed in Chinese mitten crab, with a 12 bp (CGCAGGACCACC) insertion at 405 nt. The IGS region is 4 240 bp in size and there are 136 – 139 bp species-specific repeats that contain an *Xho* I restriction site. And a stem-loop structure (182 pairs stem and 21 nucleotides loop) is located following the specific repeats. The sequence of rDNA in the Chinese mitten crab will provide the foundation of studying the variances among different geographical populations and exploring the molecular marker associated with the fast growth rate of the Chinese mitten crab.

Key words: *Eriocheir sinensis*; ribosomal DNA; intra-individual variances; IGS structure

Corresponding author: GE Xian-ping. E-mail: gexp@ffrc.cn; dnase@163.com