

文章编号:1000-0615(2002)04-0289-06

鲤属鱼类 mtDNA 控制区(D-环区)序列的变异性分析

郑冰蓉¹, 张亚平², 肖 蓿¹, 蓝家湖³, 咎瑞光¹

(1. 云南大学生命科学学院, 云南 昆明 650091;

2. 中科院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室, 云南 昆明 650223

3. 广西都安县畜牧水产局, 广西 都安 530700)

摘要:采用 PCR-测序技术对我国鲤属 7 个种、亚种和 2 个品种共 62 个个体(其中鲤的样品包括采自长江、黄河、松花江三个水系的共 4 个种群),进行了 mtDNA 控制区(D-环区)始自 3' 端共 459bp 碱基的序列测定,发现其 D-环区 3' 端至中央保守区之间不似其他鱼类和哺乳类是一个单一的高变区,而是在其内部还插有一段长约 110bp 的保守区,这很可能是鲤属鱼类 mtDNA D-环区自身的一个特点。

关键词:鲤属鱼类;线粒体 DNA;D-环区;PCR-测序

中图分类号:S917; Q343.1 文献标识码:A

The sequence variation feature of mtDNA D-loop region of *Cyprinus*

ZHENG Bing-rong¹, ZHANG Ya-ping², XIAO Heng¹, LAN Jia-hu³, ZAN Rui-guang¹

(1. Department of Biology, Yunnan University, Kunming 650091, China;

2. Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Kunming 650223, China

3. Animal Husbandry and Fishery Bureau of Duan County, Duan 530700, China)

Abstract: In the present paper, 459bp of mtDNA D-loop region sequencing was investigated in 9 species, subspecies and breeds of *Cyprinus* (as to the species of *C. carpio haematopterus*, there were four populations involved). The results indicated that the sequence variation of the D-loop region of *Cyprinus* was quite different from other fishes, it shows that there is one conserved domain inserted in the two hypervariable domains in the region from 3' to the initiation of the central conserved region instead of only one hypervariable domain.

Key words: *Cyprinus*; mtDNA; D-loop region; PCR-sequencing

鲤属(*Cyprinus*)隶属鲤科(Cyprinidae)中的鲤亚科(Cyprininae),是鲤亚科中最繁盛的一个属。在共计 17 个种和亚种中,除西鲤(*C. carpio carpio*)的分布遍及欧、亚两洲外,其余的 16 种只见于我国,其中 11 个种只见于云南,为云南特有。对鲤属鱼类的研究,以往主要集中在形态分类上^[1-6],同时也开展了一些细胞遗传与进化的研究^[7-10]。自 1984 年 Alejandro 等^[11]首次报道了鲤(*C. carpio*)mtDNA 11 种限制性内切酶的物理图谱,并对部分基因进行定位以来,鲤属鱼类分子水平的研究相继开展,特别是在线粒体 DNA(mtDNA)上^[12]。1994 年,Chang 等^[13]对鲤的 mtDNA 进行了全序列测定,揭示了鲤 mtDNA 的基因组结构,但该研究只局限于 *C. carpio* 一个种,未能全面反映该属鱼类 mtDNA 分子结构的全貌,尤

收稿日期:2001-09-10

资助项目:中科院昆明动物研究所细胞与分子进化开放实验室资助

作者简介:郑冰蓉(1969-),女,广东潮阳人,博士,主要从事细胞遗传与分子生物学研究。Tel: 0871-5034636, E-mail: brzheng@

km169.net

其是 mtDNA 一些区段的精细结构。例如,鲤属鱼类 mtDNA 上主要的非编码区——控制区(control region)或称 D-环区的结构特点就没能得以深入揭示。而一般认为,D-环区是线粒体基因组上进化最快的部分^[14],因此用 D-环区来进行近缘种间的系统进化关系研究和快速物种形成的探讨,已成为分子进化研究的一个重要方面。mtDNA 分子的长度差异也被证明基本是源自于 D-loop 区不同长度的重复序列的发生^[15,16]。因此,对鲤属鱼类 mtDNA D-环区进化特点的了解,有助于进一步进行该属鱼类系统进化关系和物种形成方式的探讨。故本研究即拟采用 PCR-测序技术对我国鲤属 7 个种、亚种和 2 个品种共 62 个个体(其中鲤 *C. c. carpio* 的样品包括长江、黄河、松花江三个水系的共 4 个种群),进行 mtDNA 控制区(D-环区)始自 3' 端共 459bp 碱基序列的测定,以揭示鲤属鱼类 mtDNA D-loop 区的结构特点,为鲤属鱼类的分子进化研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

鱼类样本的来源和数目见表 1。

表 1 mtDNA D-环区序列分析用的材料来源和数量

Tab.1 Species collection sites and number of samples analyzed for mtDNA D-loop region sequencing

物种名 species	采集地 collection sites	数量 number	简称 abbreviation
华南鲤 <i>Cyprinus carpio rubrofasciatus</i>	云南元江渔场 Yuanjiang Fish Farm, Yunnan	15	C. R
鲤 <i>C. carpio haematopterus</i>	武汉 Wuhan	7	C. H(WH)
	吉林长春新立城水库 Xin Li Cheng Reservoir, Changchun	3	C. H(JL)
	湖南 Hunan	3	C. H(HN)
	山东 Shandong	3	C. H(SD)
杞麓鲤 <i>C. carpio chilia</i>	云南大理洱海 Erhai Lake, Dali, Yunnan	5	C. C
春鲤 <i>C. longipectoralis</i>	云南大理洱海 Erhai Lake, Dali, Yunnan	5	C. L
洱海鲤 <i>C. barbatus</i>	云南大理洱海 Erhai Lake, Dali Yunnan	4	C. B
大头鲤 <i>C. pellegrini</i>	云南江川星云湖 Xingyun Lake, Jiangchuan, Yunnan	6	C. P
建鲤(品种) <i>C. carpio</i> var. <i>Jian</i> (breed)	大理州水产站(无锡引进) Dali Aquatic Center(introduced from Wuxi)	3	C. CJ
镜鲤(品种) <i>C. carpio</i> var. <i>speculari</i> (breed)	昆明农贸市场 County Fair, Kunming, Yunnan	4	C. CS
三角鲤 <i>C. multitaeniata</i>	广西南宁 Nanning, Guangxi	4	C. M

1.2 总 DNA 的提取

按常规方法从 -20℃ 冻存或 75% 酒精保存的鱼卵或肝脏、肌肉组织中提取总 DNA^[17]。

1.3 PCR 扩增、产物纯化及序列测定

使用引物 DLP480(5'-TGC ATA TAA AAG AAT GC(TC) CGG CAT G-3')和 DLT(5'-TCA CCC CTG GCT CCC AAA GCC AG-3')进行 D-loop 区约 500bp 碱基的正反链双向扩增。PCR 反应总体积为

50 μ L, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 50s, 56 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 40 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 后延伸 5min。

PCR 产物用 1.5% ~ 2.0% 的琼脂糖凝胶检测(图 1), 对扩增好的 PCR 产物经小量胶回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司)进行回收纯化。检测后, 用 2.5 ~ 5.0 μ L 回收产物以 PCR 引物作测序引物, 进行正反链双向序列测定。测序反应使用 Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division (PE/ABD) 的 BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Kit (Foster City, CA, USA), 操作过程依公司推荐的方法进行。反应产物经 Sephadex G-50 柱(Sigma 公司)纯化、真空干燥和变性后, 使用 377 全自动 DNA 测序仪(美国 PE 公司)进行序列分析。



图 1 PCR 扩增产物检测电泳图

Fig.1 Electrophoretic pattern of the PCR products

注: 左起第 1 泳道为 Marker, 第 2, 3 泳道为华南鲤, 第 4 泳道为杞麓鲤, 第 5 泳道为春鲤, 第 6, 7 泳道为洱海鲤, 第 8, 9, 10 泳道为鲤, 第 11, 12 泳道为大头鲤, 第 13 泳道为建鲤, 第 14 泳道为镜鲤, 第 15, 16 泳道为三角鲤。

Notes: From left to right, No. 1 for Marker, No. 2, 3 for *C. carpio rubrofuscus*, No. 4 for *C. carpio chilia*, No. 5 for *C. longipectoralis*, No. 6, 7 for *C. barbatus*, No. 8, 9, 10 for *C. carpio haematopterus*, No. 11, 12 for *C. pellegrini*, No. 13 for *C. carpio* var. *jian*, No. 14 for *C. carpio* var. *speculari*, No. 15, 16 for *C. multitaeniata*

1.4 数据分析

序列通过 DNA Star 软件包的 EditSeq、SeqMan 和 Megalign 软件进行排序, 并人工校正。每一碱基均经过正、反向测序验证。碱基组成和转换、颠换值利用 MEGA2.0 (Kumar 等, 2000) 程序进行统计。

2 结果

本研究测定了鲤属鱼类的鲤(*C. carpio haematopterus*)(分别采自武汉、湖南、山东和吉林, 共 4 个种群, 分属长江、黄河和松花江三个水系)、华南鲤(*C. carpio rubrofuscus*)、杞麓鲤(*C. carpio chilia*)、春鲤(*C. longipectoralis*)、洱海鲤(*C. barbatus*)、大头鲤(*C. pellegrini*)和三角鲤(*C. multitaeniata*)等 7 个种(亚种)及散鳞镜鲤(*C. carpio speculari*)和建鲤(*C. carpio* var. *jian*)两个养殖品种共 62 个个体的 D-loop 区始自 3' 端的 459bp 的碱基序列。另从基因库(GenBank)中检索出已报道的台湾的鲤(*C. carpio*)的一致序列。对上述序列进行了排序和单倍型分析。

在 MegaLign 中进行序列复合, 459bp 长的序列共显示有 69 个变异位点(图 2), 其中 61 个为碱基替换, 替换比例为 13.3%, 且核苷酸替换多为转换, 转换/颠换比例为 5.8。其余 8 个为插入/缺失, 碱基替换与插入/缺失的比例为 7.6:1。在人的 D-loop 研究中发现, 碱基替换是插入/缺失的 5 倍以上^[18], 而在丽鱼科的近缘种间碱基替换则远远高于插入/缺失^[19]。我们的结果也与之基本一致。此次研究的鲤属鱼类的 D-loop 区始自 3' 端的 459bp 序列中没有任何长度的重复序列。

在 62 个鲤鱼个体中共检出 35 种单倍型: 洱海的三种鲤鱼共 14 个个体存在 6 种单倍型; 大头鲤 6 个个体存在 5 种单倍型; 三角鲤 4 个个体存在 3 种单倍型; 从基因库中检索到的台湾的鲤(*C. carpio*)单独

享有 1 个单倍型;其余的 20 种单倍型为华南鲤亚种、鲤亚种和建鲤、镜鲤两品种的共 38 个个体共享。

鲤属鱼类各单倍型 D-环区的碱基组成,以碱基 A 的含量最高,平均为 36.2%;碱基 G 的含量最低,平均为 14.0%。

[11	1111111111	1111111222	2222222222	2222233333	3333444444	4]
[3566822	3344555667	7777999002	2444444457	7889901223	3338013555	5]
[3785805689	6723269120	1245145674	9234678921	3135658692	3892908013	4]
CB2. SEQ	AAGTTCACAG	AGTTCATCT	AGCCTCCTCA	ATTCGTCACG	TCGGCAAATA	ATAGGGTTGT	T
CB3. SEQ
CC1. SEQ
CC2. SEQ
CC5. SEQ
CL1. SEQ
CL2. SEQ
CL4. SEQ
CP1. SEQ
CP2. SEQ
CP3. SEQ
CP4. SEQ
CP6. SEQ
CM1. SEQ
CM3. SEQ
CM4. SEQ
CR1. SEQ
CR11. SEQ
CR12. SEQ
CR14. SEQ
CR15. SEQ
CR17. SEQ
CR2. SEQ
CR3. SEQ
CR8. SEQ
CH(HN1). SEQ
CH(HN2). SEQ
CH(WH1). SEQ
CH(WH11). SEQ
CH(WH2). SEQ
CH(WH3). SEQ
CH(WH7). SEQ
CH(WH9). SEQ
CH(SD1). SEQ
CH(SD2). SEQ
CH(JL2). SEQ
CH(JL3). SEQ
CCJ2. SEQ
CCS1. SEQ
CCS2. SEQ
CCS3. SEQ
CCS4. SEQ
CC(TW). SEQ

图 2 鲤属鱼类 mtDNA D-loop 区序列差异比较

Fig.2 mtDNA D-loop region sequence variation comparison in *Cyprinus*

注:CB—洱海鲤,采自洱海;CC—杞麓鲤,采自洱海;CL—春鲤,采自洱海;CP—大头鲤,采自星云湖;CM—三角鲤,采自广西;CR—华南鲤,采自元江;CH(HN)—鲤,采自湖南;CH(WH)—鲤,采自武汉;CH(SD)—鲤,采自山东;CH(JL)—鲤,采自吉林;CCJ—建鲤,无锡引进;CCS—镜鲤,购于昆明农贸市场;CC(TW)—鲤,从基因库检索到的台湾鲤鱼的序列。

Notes: CB—*C. barbatus*, from Erhai Lake; CC—*C. e. chilia*, from Erhai Lake; CL—*C. longipectoralis*, from Erhai Lake; CP—*C. pellegrini*, from Xingyun Lake; CM—*C. multitaeniata*, from Guangxi; CR—*C. e. rubrofusus*, from Yuanjiang river; CH(HN)—*C. c. haematopterus*, from Hunan; CH(WH)—*C. c. haematopterus*, from Wuhan; CH(SD)—*C. c. haematopterus*, from Shandong; CH(JL)—*C. c. haematopterus*, from Jilin; CCJ—*C. c. var. Jian*, introduced from Wuxi; CCS—*C. c. speculari*, from County fair in Kunming; CC(TW)—*C. carpio*, Taiwan carp, from GeneBank.

3 讨论

一般认为,D-环区是线粒体基因组上进化最快的部分,它的变异速率约为 mtDNA 完整分子或 mtDNA 分子其他区域的 5~10 倍^[14]。D-环区又可分为三个部分,两端是两个高变区(hypervariable domain),进化速度快;位于两个高变区之间的部分由于包含了数个保守序列区(conserved sequence block, CSB)而被称为中间保守域(central conserved region),在遗传上为相对保守区,进化速度慢。但已有一些研究,尤其是鱼类上的研究,对 D-loop 区上“高变区进化最快”这一普遍观察到的现象提出了挑战,发现在某些鱼类,高变区与 mtDNA 上的蛋白编码区或与完整的 mtDNA 分子的进化速率相似^[20, 21]。

Lee 等^[22]通过对硬骨鱼类 6 个科 23 种鱼控制区序列的比较,标定了鱼类控制区中间保守域的位置。我们此次测定的序列范围是紧接脯氨酸-tRNA(tRNA-Pro)的 1~459bp。如果按 Lee 等的标定,我们测定的九种鲤属鱼类的 D-loop 区的中间保守域位置在 259~429 这一 170bp 的区段,那么我们测定的序列就刚好包含了完整的 3'端高变区、Lee 等的标定的中间保守域及少部分(30bp)的 5'端高变区。经对我们所测序列进行仔细分析后发现,紧接脯氨酸-tRNA(tRNA-Pro)的 1~10bp 为最高变区,在 10 个碱基范围内出现了高达三个位点的碱基替换及一个位点的插入/缺失,变异比例高达 40.0%; 11~120bp 为保守区,在 110bp 长的片段上仅有 5 个位点变异,变异率为 4.5%; 121~340bp 为高度可变区,220bp 的长度内发生了 45 个变异,变异率达 20.9%; 341~429bp 为另一保守区,有 4 个位点发生碱基替换,变异率亦为 4.5%; 430~459bp 为可变区,在 30 个碱基长的片段上存在 5 个变异位点,变异速率为 17.3%。

从以上我们对多种鲤属鱼类 D-环区 3'端一半的测序结果看,鲤属鱼类象其他鱼类一样,其 D-环区有保守区和高变区之分,也存在一个中间保守区。但是与其他鱼类明显不同的是:第一,中央保守区 5'端的界限虽与 Lee 等所标定的几乎一致,但 3'端的界限我们仅划在 340,而不是 259。相应地,中央保守区的长度仅 89bp,而不是 170bp;第二,从中央保守区到 D-环的 3'末端之间,不是简单地为一个高变区,而是有一个保守区和两个高变区相间存在。当然,我们也能够按 Lee 等所标各种鱼类的中央保守区那样,把我们所研究的鲤属鱼类之 D-环区划分为一个中央保守区和两边两个高变区,但是这样一来,中央保守区的碱基变异率将提高到 9.9%,高变区的变异将平均为 16.4%,两者的差异便不很突出。而在近 3'端变异率仅为 4.5%的保守区有约 110bp 长,这在其他鱼类上^[22]也是没有的。总之,鲤属鱼类 D-环区序列的上述变异,看来很可能是鲤属鱼类本身所具有的一个特点。

参考文献:

- [1] Regan C T. On a collection of fishes made by Mr. John Graham at Yunnan Fu[J]. Ann Mag Nat Hist, 1904, (7)13:190-194.
- [2] Chen X L, Huang H J. VIII *Cyprinus Linnaeus* [A]. The Cyprinidae fishes of China, Part II[M]. Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai, 1977. 395-438. [陈湘舜,黄宏金. 鲤亚科[A]. 中国鲤科鱼类志(下卷)[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1977. 395-438.]
- [3] Wang Y H. On the classification, distribution, origin and evolution of the fishes referred to the subfamily Cyprininae of China, with description of a new species[J]. Acta Hydrobiologica Sinica. 1979, 6(4): 419-435. [王幼槐. 中国鲤亚科鱼类的分类、分布、起源及演化[J]. 水生生物学集刊, 1979, 6(4): 419-433.]
- [4] Zhou W, Chu X L. Systematic study of the genus *Cyprinus* (Pisces: Cyprinidae) in Yunnan, China[J]. Zool Res, 1986, 7(3):279-310. [周伟,褚新洛. 云南鲤属鱼类的分类整理[J]. 动物学研究, 1986, 7(3):279-310.]
- [5] Chu X L, Chen Y R, Cui G H. Cyprininae [A]. The fishes of Yunnan, China, Part I Cyprinidae[M]. Beijing: Science Press, 1989. 322-354. [褚新洛,陈银瑞,崔桂华. 鲤亚科[A]. 云南鱼类志(鲤科)[M]. 北京:科学出版社, 1989. 322-354.]
- [6] Yang J X, Chen Y R. The biology and resource utilization of the fishes of Fuxian Lake[M]. Kunming: Yunnan Science and Technology Press, 1995. 91-99. [杨君兴,陈银瑞. 抚仙湖鱼类生物学和资源利用[M]. 昆明:云南科技出版社, 1995. 91-99.]
- [7] Wang R F, Shi L M, He W S. Studies on nucleolus organizer region in several species of carp (*Cyprinus*) by silver-staining[J]. Zool Res, 1985, 6(4): 391-398. [王蕊芳,施立明,贺维顺. 几种鲤鱼染色体核仁组织者的银染观察[J]. 动物学研究, 1985, 6(4):391-

- 398.]
- [8] Yu X J, Zhou T, Li Y C, et al. Chromosomes of Chinese fresh-water fishes[M]. Beijing: Science Press, 1989. 157. [余先觉, 周 焮, 李渝成, 等. 中国淡水鱼类染色体研究[M].北京:科学出版社, 1989. 157.]
- [9] Zan R G, Song Z. Studies of the karyotypes of eight species of fishes in *Cyprinus* and *Anabarrilius*[J]. Zool Res, 1980, 1(2): 141 - 150. [管瑞光, 宋 焮. 八种鱼类(鲤属和白鱼属)的染色体组型研究[J]. 动物学研究, 1980, 1(2):141 - 150.]
- [10] Zan R G, Song Z, Liu W G. Studies on karyotypes and nuclear DNA contents of some cyprinoid fishes, with notes on fish polyploids in China[A]. Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes [C]. Tokyo: Ichthyological Society of Japan, 1986. 877 - 885.
- [11] Alejandro A, A Rudolf, L G Iokia, et al. Cloning, physical mapping and genome organization of mtDNA from *Cyprinus carpio* acolytes [J]. Mol Gen Genet, 1984, 196:43 - 52.
- [12] Zheng B R, Zan R G, Zhang Y P. Preliminary analysis of mtDNA genetic diversity in Jian carp (*Cyprinus carpio* var. *jian*) [J]. Reservoir Fisheries, 2000, 20(5):11 - 12. [郑冰蓉, 管瑞光, 张亚平. 建鲤线粒体 DNA 的遗传多态性初步分析[J]. 水利渔业, 2000, 20(5):11 - 12.]
- [13] Chang Y S, Huang F L, Lo T B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome [J]. J Mol Evol, 1994, 38(2):138 - 55.
- [14] Brown W M. The mitochondrial genome of animals[A]. Molecular Evolutionary Genetics[M]. New York: Plenum Press, 1985. 95 - 130.
- [15] Bermingham E, Lamb T, Avise J C. Size polymorphism and heteroplasmy in the mitochondrial DNA of lower vertebrates[J]. J Hered, 1986, 77:249 - 252.
- [16] Buroker N E, Brown J R, Gilbert T A, et al. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: An illegitimate elongation model[J]. Genetics, 1990, 124:157 - 163.
- [17] Wang W, Lan H, Su B, et al. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis in minority population in Yunnan[J]. Chinese Science Bulletin, 1994, 39(20): 1900 - 1993. [王 文, 兰 宏, 宿 兵, 等. 云南少数民族的随机扩增多态 DNA 分析[J]. 科学通报, 1994, 39(20): 1900 - 1993.]
- [18] Aquadro C F, Greenberg B D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals [J]. Genetics, 1983, 103:287 - 312.
- [19] Alex P, Kornfield I. Evolution of the mitochondrial DNA control region in the mbuna (*Cichlidae*) species flock of Lake Malawi, East Africa[J]. J Mol Evol, 1997, 45:70 - 83.
- [20] Bernatchez L, Danzmann R D. Congruence in control-region brook charr (*Salvelinus fontinalis*) [J]. Mol Biol Evol, 1993, 10:1002 - 1014.
- [21] Zhu D, Jamieson B G M, Hugall A, et al. Sequence evolution and phylogenetic signal in control-region and cytochrome b sequences of rainbow fishes (*Melanotaeniidae*) [J]. Mol Biol Evol, 1994, 11:672 - 683.
- [22] Lee W J, Conroy J, Howell W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions[J]. J Mol Evol, 1995, 41:54 - 66.