

文章编号: 1000-0615(2000)05-0412-05

# 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 序列的比较

高天翔<sup>1</sup>, 张秀梅<sup>1</sup>, 渡边精一<sup>2</sup>,

(1. 青岛海洋大学海洋渔业系, 山东 青岛 266003; 2. 东京水产大学水生生物系, 东京 108-8477)

**摘要:** 参考果蝇和蚤状的线粒体 DNA 12S rRNA 序列进行了中华绒螯蟹与日本绒螯蟹的线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段的引物设计、PCR 扩增及序列测定。两种的碱基序列长度相同, 为 457 bp, 其 A、T、G、C 含量相似, 分别为 159bp (34.79%)、177bp (38.73%)、51bp (11.16%)、70bp (15.32%) 和 159bp (34.79%)、178bp (38.95%)、50bp (10.94%)、70bp (15.32%)。中华绒螯蟹与日本绒螯蟹间有 5 处碱基序列差异, 在 98bp、151bp、317bp 和 417bp 碱基处为碱基转移, 在 294bp 碱基处为碱基颠换。

**关键词:** 中华绒螯蟹; 日本绒螯蟹; 线粒体 DNA; 12S rRNA; 序列

中图分类号: S917 文献标识码: A

## Sequence comparison of mitochondrial DNA 12S rRNA region between *Eriocheir sinensis* and *Eriocheir japonica*

GAO Tianxiang<sup>1</sup>, ZHANG Xiurmei<sup>1</sup>, WATANABE Seichi<sup>2</sup>

(1. Department of Fisheries, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China;

2. Department of Aquatic Biosciences, Tokyo University of Fisheries, Tokyo 108-8477, Japan)

**Abstract:** The primers of *Eriocheir sinensis* and *Eriocheir japonica* were designed by using the sequences of mitochondrial DNA 12S rRNA region of *Drosophila yakuba* and *Daphnia pulex*. 457 base pairs of encoded 12S rRNA region of mitochondrial DNA were amplified and sequenced. The length of sequence of two species was the same, the A, T, G, C contents were similar, which were 159bp (34.79%), 177bp (38.73%), 51bp (11.16%), 70bp (15.32%) and 159bp (34.79%), 178bp (38.95%), 50bp (10.94%), 70bp (15.32%) respectively. Between *E. sinensis* and *E. japonica*, there were 5 different sites, that were transition sites at 98bp, 151bp, 317bp, 417bp, and transversion site at 294bp.

**Key words:** *Eriocheir sinensis*; *Eriocheir japonica*; mitochondrial DNA; 12S rRNA; sequence

动物线粒体 DNA (mtDNA) 已成为研究动物起源进化及群体遗传分析理想的研究对象。碱基序列分析虽然花费大, 技术要求高, 但测定 mtDNA 全序列或部分基因片段序列可以了解碱基的置换、插入、缺失等实际情况, 比较不同物种或个体碱基序列的差异, 从而探讨进化关系, 因此比其它分析方法具有很大的优点, 目前已被应用到水产领域研究中<sup>[1,2]</sup>。有关鱼类 mtDNA 序列的研究报道较

收稿日期: 1999-12-24

资助项目: 日本学术振兴未来学术研究事业资助项目 (97L00902)

作者简介: 高天翔 (1962-), 男, 辽宁辽阳人, 博士, 副教授, 主要从事渔业生物研究。E-mail: gaozhang@ouq.d.edu.cn

多,但关于节肢动物的研究报道很少。现只测出果蝇、卤虫的 mtDNA 分子全序列;蚤状 和其它一些甲壳类的部分序列<sup>[3,4]</sup>。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和日本绒螯蟹(*Eriocheir japonica*)同属方蟹科、绒螯蟹属。中华绒螯蟹分布于朝鲜西岸、欧洲北部沿海以及我国沿海;日本绒螯蟹分布于日本、朝鲜和我国的台湾、广东、福建沿海。它们生活、生态习性相似,肉味鲜美,营养丰富,经济价值高,是重要的经济品种<sup>[5,6]</sup>。近年,由于过度捕捞、环境污染和兴修水利等使其资源衰退。日本的许多省市开展了日本绒螯蟹的移殖和育苗放流及放流后的跟踪调查,中国则进行着中华绒螯蟹大规模的养殖。

有关绒螯蟹属种间及中华绒螯蟹和日本绒螯蟹种群亲缘关系的同工酶水平、分子水平(随机扩增多态 DNA(RAPD))、形态学研究已有报道<sup>[7,17]</sup>,但尚未见其 mtDNA 序列比较研究的报道。rRNA 基因进化慢,常用于种或科以上水平的研究监测。本文以中华绒螯蟹和日本绒螯蟹为研究材料,进行了其 mtDNA 12S rRNA 基因片段的引物设计、PCR 扩增及其序列测定,并比较了两种间的序列差异,为进一步进行绒螯蟹属种间遗传关系研究提供了分子依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

所用实验材料为出口到日本的上海地区中华绒螯蟹和采自日本北海道石狩川的日本绒螯蟹,置-20℃冰箱保存备用。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 基因组 DNA 的提取

取 0.1g 附肢肌肉,提取其基因组 DNA(使用 Pharmacia Biotech 公司的 GenomicPrep Cells and Tissue DNA Isolation Kit)。酒精沉淀后没有用 Kit 附带的 DNA Hydration 溶液,而是溶解于 50μL 灭菌蒸馏水。测定 DNA 浓度后 4℃存放。

#### 1.2.2 mtDNA 12S rRNA 基因片段的引物设计

利用 GENETYX-ATSQ 同源性分析软件对果蝇与蚤状 mtDNA 序列进行同源性检索排序,设计 mtDNA 12S rRNA 基因片段的引物为 12S rRNA-F: CTAGTRCACTTTCCAGTACA (21bp) 和 12S rRNA-R: CYAGGATTAGATACCCTRTT (20bp)。

#### 1.2.3 mtDNA 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

以提取的基因组 DNA 为模板 DNA,使用 Takara PCR Thermal Cycler MP(TP3 000) 仪进行 PCR 扩增。PCR 反应总量为 25 μL,其中:浓度 20~50 pmol·μL<sup>-1</sup>引物 1 μL。dNTPS(Takara) 2μL, 10× Ex Taq Buffer(Takara) 2.5 μL, Ex Taq polymerase(Takara) 1.25U, 1μg 模板 DNA 1 μL,其它为灭菌蒸馏水。PCR 扩增程序:94℃变性 45s, 45℃退火 45s, 72℃延伸 45s。35 个循环。最后 72℃延伸 420s。PCR 扩增产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色,紫外透射仪观察并照相记录。

#### 1.2.4 连接反应

将扩增产物从琼脂糖凝胶中切出提纯。提纯 DNA 与载体的连接反应在 16℃下过夜进行。连接反应总量为 8μL,其中:pGEM-T Easy Vector(Promega) 0.5μL, DNA Ligation Kit Ver. 2 (Takara) 中 I 液 4μL,提纯 DNA 3.5μL。

#### 1.2.5 转化反应

参照中山广树和西方敬人方法进行转化反应<sup>[18]</sup>。对转化反应后的质粒 DNA 进行提纯(使用 Pharmacia 公司的 FlexiPrep Kit),并用限制性内切酶 EcoR I 酶切提纯后 DNA,检验重组质粒 DNA 是否存在。

### 1.2.6 序列测定与比较分析

采用 Amersham 公司的 Thermo sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP 测序试剂盒对重组质粒 DNA 进行 DNA 标记反应。将标记产物加入到 Pharmacia 公司的 ALF express DNA 序列仪中进行两种绒螯蟹 mtDNA 12S rRNA 基因片段的序列测定。利用 GENETYX-ATSQ 同源性分析软件将测得的序列进行同源性比较分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增

利用果蝇与蚤状 mtDNA 序列设计的引物进行了中华绒螯蟹与日本绒螯蟹 mtDNA 12S rRNA 基因片段的 PCR 扩增,得到了清晰的基因片段,而且空白对照实验未出现扩增产物(图 1)。说明利用动物 mtDNA 的同源性,参考其他节肢动物已知序列可以设计甲壳类动物的相应片段引物,并且以此方法设计的引物应该具有普遍性,为其他甲壳类动物的遗传学研究提供了分子依据。

### 2.2 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹 12S rRNA 基因片段的序列比较分析

测定出的中华绒螯蟹与日本绒螯蟹碱基序列长度相同,为 457bp(图 2)。其 A、T、G、C 含量相似,分别为 159bp(34.79%)、177bp(38.73%)、51bp(11.16%)、70bp(15.32%); 159bp(34.79%)、178bp(38.95%)、50bp(10.94%)、70bp(15.32%)。但两种间有 5 处碱基序列差异,在 98bp、151bp、317bp 和 417bp 碱基处出现碱基转移,在 294bp 碱基处出现碱基颠换。

中华绒螯蟹与日本绒螯蟹 mtDNA 12S rRNA 基因片段序列含量与本研究设计的引物所用的果蝇与蚤状的序列含量相似,均为 A、T 多, G、C 少(表 1)。今井秀行和沼知健<sup>[19]</sup>通过对 D-Loop 基因片段的 PCR 扩增分析也得到三疣梭子蟹 A、T 含量较高的结论。由此可见,AT 含量高是节肢动物共同的现象,中华绒螯蟹与日本绒螯蟹也具有此种结构特征,因此在今后进行限制性内切酶片段长度多态法(RFLP)分析时有必要选用富含 AT 的限制性内切酶。

### 2.3 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹间遗传变异

长期以来,绒螯蟹属种间的亲缘关系一直存在较大的争议。1988 年,有学者报道了绒螯蟹属的亚种分化,从中华绒螯蟹和日本绒螯蟹间不存在生殖隔离的现象推测日本绒螯蟹可能是中华绒螯蟹的一个亚种<sup>[7]</sup>;其后又报道说分布于雷州半岛以西的绒螯蟹是日本绒螯蟹合浦亚种<sup>[8]</sup>。Guo 等<sup>[9]</sup>认为雷州半岛以西和以东的绒螯蟹相同,应为独立的物种,即合浦绒螯蟹(*E. Hepuensis*)。Montú 等根据两种幼蟹发育过程的形态比较,认为中华绒螯蟹和日本绒螯蟹幼体的形态有差异是亲缘关系非常接近的两个种<sup>[10]</sup>。李晨虹和李思发对中国大陆沿海六水系统绒螯蟹群体进行了形态学研究,认为用判别

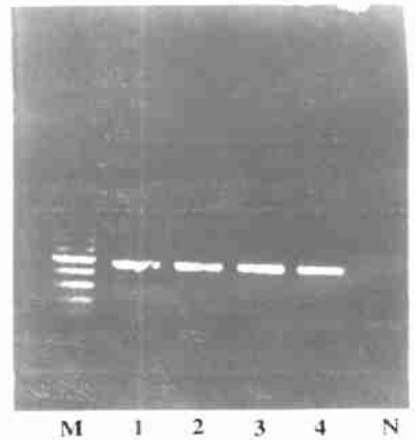


图 1 mtDNA 基因片段 PCR 扩增结果  
Fig. 1 PCR amplification result of mitochondrial DNA 12S rRNA region  
M: 1kb; 1: 中华绒螯蟹; 2~4: 日本绒螯蟹;  
N: 空白对照物

表 1 中华绒螯蟹、日本绒螯蟹、果蝇、蚤状的线粒体 DNA 基因片段序列组成

Tab. 1 Sequence composition of mitochondrial DNA 12S rRNA region of *E. sinensis*, *E. japonica*, *Drosophila yakuba*, and *Daphnia pulex*

种	腺嘌呤 A (%)	胸腺嘧啶 T (%)	鸟嘌呤 G (%)	胞嘧啶 C (%)	总计 (bp)
中华绒螯蟹	34.79	38.73	11.16	15.32	457
日本绒螯蟹	34.79	38.95	10.94	15.32	457
果蝇	36.59	37.69	10.20	15.52	451
蚤状	32.34	32.11	15.60	19.95	436

分析可将北方蟹和南方蟹完全分开, 南流江水系蟹与珠江水系蟹应属日本绒螯蟹的不同种群<sup>[11]</sup>。

```

a CTAGATACAC TTTCCAGTAC ATCTACTATG TTACGACTTA TTTCACCTAT AAATGAAAGC
b CTAGATACAC TTTCCAGTAC ATCTACTATG TTACGACTTA TTTCACCTAT AAATGAAAGC
                                     *
a GACGGGCGAT ATGTACACAA TTTAGAACTT ATATCTTGTT AGCTTATTAA ACTAAAAATA
b GACGGGCGAT ATGTACACAA TTTAGAACTT ATATCTTATT AGCTTATTAA ACTAAAAATA
                                     *
a CAATCAAATC CATCTTTATA ATAATATTAT CTTATTAATC CGCAGTAAAG TAATTTACTG
b CAATCAAATC CATCTTTATA ATAATATTAT TTTATTAATC CGCAGTAAAG TAATTTACTG

a TAACCCATTT TACCTTGCTT ATTGGCTGCA CCATGATCTA ATTTTACTAA ACAACTAAAT
b TAACCCATTT TACCTTGCTT ATTGGCTGCA CCATGATCTA ATTTTACTAA ACAACTAAAT
                                     *
a TTAATAATTT TTCCTTTAAG AATTATCTGA TAATGATGGT ATACAAACTG TTAGAATTAC
b TTAATAATTT TTCCTTTAAG AATTATCTGA TAATGATGGT ATACAAACTG TTATAATTAC
                                     *
a TAAAGCAAGT AAGATTTTTT GTGGTTTATC GATTCTAAAA CAGGTTCTC TGAATAGATT
b TAAAGCAAGT AAGATTTCTT GTGGTTTATC GATTCTAAAA CAGGTTCTC TGAATAGATT
                                     *
a AAATTGCCGC CAAATTTTTT AAATTTAAG TATTTATCTT TTACTAATTC AGTTTTATAT
b AAATTGCCGC CAAATTTTTT AAATTTAAG TATTTATCTT TTACTAATTC AGTTTTGTAT

a TAAATTTATT TTAGAATAAC AGGGTATCTA ATCCTAG
b TAAATTTATT TTAGAATAAC AGGGTATCTA ATCCTAG

```

图 2 中华绒螯蟹及日本绒螯蟹的线粒体 DNA 12S rRNA 基因片段序列(457bp)

Fig. 2 Nucleotide sequence (457bp) of mitochondrial DNA 12S rRNA region of *E. sinensis* and *E. japonica*.

a: 中华绒螯蟹; b: 日本绒螯蟹; \*: 有差异碱基处

近年, 绒螯蟹类亲缘关系研究开始广泛地应用同工酶分析。Li 等<sup>[12]</sup>利用同工酶技术结合形态学手段, 发现中国珠江流域和长江流域的绒螯蟹三群体间无显著差异, 认为它们属相同的种, 应一并称为日本绒螯蟹。Gao 和 Watanabe<sup>[13]</sup>对日本北海道到冲绳的 22 个日本绒螯蟹种群 1 072 个个体与上海地区中华绒螯蟹种群 69 个个体的同工酶比较研究, 发现尽管两种间没有基因置换, 但日本绒螯蟹种群具有许多中华绒螯蟹所没有的基因; 并通过统计检验, 得出两种间在 AAT、GPI、IDHP 三种同工酶上的基因频率有显著的差异; 另外, 虽然两种间遗传距离很小, 但比日本绒螯蟹 22 个种群间的遗传距离大得多。赵金良和李思发<sup>[14]</sup>通过对中国大陆沿海六水系绒螯蟹群体间的群体生化遗传研究, 认为辽河、黄河、长江和瓯江水系的绒螯蟹属中华绒螯蟹, 珠江和南流江的绒螯蟹属日本绒螯蟹。

90 年代末期, RAPD 研究开始被引入绒螯蟹亲缘关系研究中。项超美等<sup>[15]</sup>用 RAPD 方法分析了包括长江流域中华绒螯蟹和合浦绒螯蟹在内的四种十足甲壳动物, 发现两种间存在一些群体特异性扩增带。谢浩等<sup>[16]</sup>用 Opo-05 引物扩增湖北武汉的中华绒螯蟹、广东澳头的日本绒螯蟹及广西北海的合浦绒螯蟹, 发现中华绒螯蟹在 1kb 左右有扩增带, 而日本绒螯蟹及合浦绒螯蟹则仅见于少数个体。最近, 李思发和邹曙明<sup>[17]</sup>对中国大陆沿海六水系绒螯蟹群体进行了 RAPD 分析, 认为珠江和南流江的绒螯蟹同辽河、黄河、长江和瓯江水系的绒螯蟹之间存在明显的歧化。

本研究首次报道了中华绒螯蟹和日本绒螯蟹 mtDNA 12S rRNA 序列, 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹 mtDNA 12S rRNA 基因片段的碱基序列的长度相同、含量相似, 表明两种间亲缘关系很近。但两种间差异程度、其他的 mtDNA 基因序列以及绒螯蟹类的亲缘关系等尚有待进一步研究。

### 参考文献:

- [ 1 ] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNAs[ M ]. Evolution of genes and proteins. New York: Sinauer Association Inc press, 1983, 62- 88.
- [ 2 ] 吕国庆, 李思发. 鱼类线粒体 DNA 动态研究和应用发展[ J ]. 中国水产科学, 1998, 5( 3 ): 94- 103.
- [ 3 ] Clary D O, Wolstenholme D R. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*, gene organization, and genetic code[ J ]. J Mol Evol, 1985, 22: 252- 271.
- [ 4 ] Van Raay T J, Crease T J. Partial mitochondrial DNA sequence of the crustacean *Daphnia pulex*[ J ]. Current Genetics, 1994, 25: 66- 72.
- [ 5 ] Dai A, Yang S. Crabs of the China Seas[ M ]. Beijing: China Ocean Press, 1991. 521- 524.
- [ 6 ] Sakai T. Crabs of Japan and the adjacent seas[ M ]. Tokyo: Kodansha, 1976. 650- 653.
- [ 7 ] 戴爱云. 绒螯蟹属支序分类学的初步分析( 甲壳总纲: 十足目)[ J ]. 动物分类学报, 1998, 13( 1 ): 22- 26.
- [ 8 ] 戴爱云. 绒螯蟹属亚种分化的研究( 十足目: 短尾派)[ A ]. 系统进化动物学重点研究实验室论文集( 第一集)[ C ]. 北京: 中国科学出版社, 1991. 61- 71.
- [ 9 ] Guo J Y, Ng N K, Dai A, et al. The taxonomy of three commercially important species of mitten crab of the genus *Eriocheir* De Hann, 1835. (Crustacea; Decapoda; Brachyura; Grapsidae)[ J ]. The Raffles Bulletin of Zoology, 1997, 45( 2 ): 445- 476.
- [ 10 ] Montú M, Anger K, Bakker C De. Larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* H. Milne - Edwards (Decapoda: Grapsidae) reared in the laboratory[ J ]. Helgoländer Meeresunters, 1996, 50, 223- 252.
- [ 11 ] 李晨虹, 李思发. 中国大陆六水系绒螯蟹( 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹) 群体亲缘关系: 形态判别分析[ J ]. 水产学报, 1999, 23( 4 ): 337- 342.
- [ 12 ] Li G, Shen Q, Xu Z. Morphometric and biochemical genetic variation of the mitten crab, *Eriocheir*, in southern China[ J ]. Aquac, 1993, 111: 103- 115.
- [ 13 ] Gao T, Watanabe S. Genetic variation among local population of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* De Hann[ J ]. Fisheries Science, 1998, 64: 198- 205.
- [ 14 ] 赵金良, 李思发. 中国沿海六水系绒螯蟹( 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹) 群体亲缘关系: 生化分析[ J ]. 水产学报, 1999, 23( 4 ): 331- 336.
- [ 15 ] 项超美, 陆任后, 谢 浩, 等. 四种十足目甲壳动物遗传变异的 RAPD 分析[ J ]. 水生生物学报, 1999, 22( 2 ): 251- 256.
- [ 16 ] 谢 浩, 陆任后, 项超美, 等. 利用 RAPD 技术对三种绒螯蟹亲缘关系的研究[ J ]. 水生生物学报, 1999, 23( 2 ): 120- 126.
- [ 17 ] 李思发, 邹曙明. 中国大陆沿海六水系绒螯蟹( 中华绒螯蟹和日本绒螯蟹) 群体亲缘关系: RAPD 指纹标记[ J ]. 水产学报, 1999, 23( 4 ): 325- 330.
- [ 18 ] 中山广树, 西方敬人. バイオ実験イラストレイテッド②遗传子解析の基礎[ M ]. 东京: 秀润社, 1995. 13- 31.
- [ 19 ] 今井秀行, 沼知健一. ガザミのミトコンドリア DNA の切断型分析法- II[ A ]. PCR 法による D ループ領域増幅のためのプライマー- 设计[ J ]. 东海大学海洋研究所研究报告, 1998, 19: 41- 46.