

文章编号: 1000-0615(2005)05-0711-04

• 研究简报 •

日本绒螯蟹 ND 2 基因全序列测定与分析

柳广东¹, 高天翔¹, 刘进贤¹, 渡边精一²

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 东京水产大学水生生物系, 日本 东京 108-8477)

关键词: 日本绒螯蟹; ND2 基因; 全序列

中图分类号: S917 文献标识码: A

The complete sequence of the mitochondrial ND2 gene of *Eriocheir japonica*

LIU Guang-dong¹, GAO Tian-xiang¹, LIU Jin-xian¹, Watanabe Seiichi²

(1. The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

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

Abstract: Degenerate primers were designed according to the conserved sequences of NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2) gene in mitochondrial tRNA^{Met} and tRNA^{Trp} gene respectively, and the complete sequence of the ND2 gene of *Eriocheir japonica* was determined. The results indicated that the length of ND2 gene of *Eriocheir japonica* was 1009 bp. The A, T, G, C contents of the gene were 28.54% (288 bp), 44.20% (446 bp), 8.23% (83 bp), and 19.03% (192 bp) respectively; and the sequence was AT rich and biased. The start and stop codons were ATC and A respectively. The homology analysis of nucleotide sequence showed that the similarities in ND2 gene between *Eriocheir japonica* and other crustacean were comparatively low, which suggested that ND2 gene could be effective molecular marker for further study on phylogeny of *Eriocheir* species.

Key words: *Eriocheir japonica*; ND2 gene; complete sequence

动物线粒体 DNA (mtDNA) 具有比核 DNA 的进化速率快等特点, 而被广泛地应用于生物的起源、演化和种群遗传学研究^[1]。完整的线粒体基因组包括 37 个基因: 13 个编码疏水性蛋白质亚基基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因。各基因排列紧密, 不含内含子, 且有些基因区域出现重叠。Zardoya 和 Meyer 考察了脊椎动物 mtDNA 上 13 个蛋白编码基因, 认为 ND4、ND5、ND2、Cytb 和 COI 基因包含良好的系统发育信息^[2]。从 Anderson 等测定了人的线粒体基因组全序列开始^[3], 目前已有多种动物的线粒体 DNA 全序列或部分基因序列被测定^[4-12]。

日本绒螯蟹 (*Eriocheir japonica*) 属十足目 (Decapoda)、短尾派 (Portuninae)、方蟹科 (Grapsidae)、绒螯蟹属 (*Eriocheir*), 广泛分布于日本各地和中国、韩国、俄罗斯的部分地区, 其生活、生态习性与近缘种中华绒螯蟹基本相

似, 是日本渔业重要的经济蟹类之一。近年来, 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、放流及放流后的追踪调查^[13-14]。

迄今 Genbank 中已有 10 种甲壳动物 NADH 脱氢酶亚基 2 (ND2) 基因全序列, 国内外学者对绒螯蟹类的线粒体 DNA 序列也进行了初步的研究^[15-19], 但尚未见有关其 ND2 基因序列研究报道。本文根据其他节肢动物线粒体保守序列, 在 tRNA^{Met} 和 tRNA^{Trp} 基因区设计了 1 对简并引物, 通过克隆测序方法, 测定了日本绒螯蟹 ND2 基因全序列。通过与已知甲壳动物 ND2 基因同源序列的比较分析, 研究日本绒螯蟹 ND2 基因核苷酸组成及其编码的氨基酸组成等特征, 为进一步探讨短尾类的系统发生和绒螯蟹属的分子系统发育研究提供分子标记。

收稿日期: 2004-07-06

资助项目: 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放课题 (200411)

作者简介: 柳广东 (1974-), 男, 山东乳山人, 博士研究生, 主要从事种群遗传学研究。Tel: 0532-82032063, E-mail: liugd007@163.com

通讯作者: 高天翔, Tel: 0532-82032063, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

1 材料和方法

1.1 材料

实验用野生日本绒螯蟹于1996年6月采自日本千叶县东京水产大学坂田实验场附近的坂田河, -20℃以下保存备用。

1.2 方法

基因组DNA的提取 取约100 mg的日本绒螯蟹附肢肌肉,使用试剂盒(Pharmacia Biotech)提取基因组DNA。将乙醇沉淀后DNA溶解于50 μL灭菌蒸馏水,4℃存放。

ND2基因片段扩增 参考果蝇(*Drosophila yakuba*)^[4]、卤虫(*Artemia franciscana*)^[5]和蚤状溞(*Daphnia pulex*)^[7]的线粒体rRNA^{Mt}和rRNA^{Tp}基因序列,设计了含ND2基因的上、下游引物分别为: F 5' - GCTAAATWAAGCTASTGGG - 3' 和 R 5' - AWTMMAGCTTTGAAGGCT - 3'。扩增片段对应于果蝇线粒体基因组全序列的202~1291 bp片段。在TP3000热循环仪(Takara)上进行PCR反应:94℃预变性3 min后进行40个热循环,每个循环包括94℃ 45 s,50℃ 2 min,72℃ 3 min;最后72℃延伸5 min。PCR反应总体积为25 μL,其中:上、下游引物(浓度20~50 μmol·L⁻¹)各1 μL,dNTPs(Takara)2 μL,10×Ex Taq(Takara)2.5 μL,Ex Taq酶(Takara)1.25 U,1 μg模板DNA 1 μL,最后补足灭菌双蒸水。所有反应均用阴性对照来检查是否有DNA污染。用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增片段大小,溴化乙锭染色,紫外透射仪下检测并照相记录。

连接反应 用2%琼脂糖凝胶纯化回收PCR扩增产物。连接反应在16℃下过夜进行。反应总体积为8 μL,其中:pGEM-T载体(Promega)0.5 μL,连接试剂盒(Takara)中I液4 μL,回收DNA 3.5 μL。

转化反应 参照文献[20]的方法进行转化反应,用试剂盒(Pharmacia)进行质粒DNA的回收提纯后,EcoRI酶切检验ND2基因片段的有无。

序列测定 利用Thermo sequence fluorescent labeled primer cycle sequencing试剂盒(Amersham)对回收质粒DNA进行DNA标记反应,在ALFexpress DNA序列仪上进行正反向测序。

数据分析 应用Dnastar软件(DNASTAR, Inc.)对所测得的ND2序列进行编辑比对。将该序列(包括其上、下游引物的核苷酸序列在内)与Genbank中其他甲壳类的同源序列进行比对,确定ND2基因的起始和终止密码子。使用无脊椎动物线粒体密码子,对ND2核苷酸序列进行翻译。利用Mega2.0软件将蛋白质编码基因核苷酸序列的密码子转化为氨基酸序列,计算其核苷酸组成及遗传距离^[21]。参照文献[22]提出的富G+C密码子(G+C-rich codons)与富A+T密码子(A+T-rich codons)的比值,基

于此比值推导的各物种ND2基因多肽链的氨基酸组成,估计密码子使用的偏倚情况。其中,富G+C密码子编码的氨基酸包括Pro、Ala、Arg和Gly,富A+T密码子编码的氨基酸包括Phe、Ile、Met、Tyr、Asn和Lys。文中引用的10种甲壳纲动物与一种昆虫的同源序列在Genbank中的检索号如下 *Portunus trituberculatus* (NC_005037)、*Cherax destructor* (NC_011243)、*Panulirus japonicus* (NC_004251)、*Pagurus longicarpus* (NC_003058)、*Penaeus monodon* (NC_002184)、*Artemia franciscana* (NC_001620)、*Daphnia pulex* (NC_000844)、*Triops cancriformis* (NC_004465)、*Tetraclita japonica* (NC_008974)、*Tigriopus japonicus* (NC_003979)、*Drosophila yakuba* (X03240)。

2 结果

2.1 日本绒螯蟹ND2基因全序列

测序后,去除引物序列的外源片段长度为1074 bp,rRNA^{Mt}和rRNA^{Tp}基因部分序列长度分别为40 bp和25 bp,而日本绒螯蟹线粒体ND2基因全序列长度为1009 bp,推导的多肽链由336个氨基酸组成(Genbank登录号:AY818195)。其核苷酸序列与氨基酸序列如图1所示。

2.2 日本绒螯蟹ND2基因序列特征及其与其它甲壳动物同源序列的比较

日本绒螯蟹ND2基因的核苷酸组成中,A+T含量为72.7%(A,28.5%;T,44.2%;G,8.2%;C,19.0%),其中,第3密码子的A+T含量为83.0%。由氨基酸组成估计的密码子使用模式,即富G+C/富A+T密码子的比值为0.33。

将日本绒螯蟹与Genbank中其他10种甲壳类ND2全序列特征进行比较,结果显示,日本绒螯蟹的ND2序列在已知的11种甲壳动物中较长,而*A. franciscana*最短(表1)。

日本绒螯蟹属软甲亚纲十足目,与十足目其它动物的遗传距离(D)较大(0.40~0.47),十足目科间的遗传距离的范围为0.36~0.48。日本绒螯蟹与腮足亚纲3种动物的遗传距离范围为0.48~0.57,与桡足亚纲的*T. japonicus*的遗传距离为0.65。与蔓足亚纲的*T. japonica*的遗传距离为0.49,而与果蝇*D. yakuba*的遗传距离却仅为0.43。

与果蝇线粒体基因的同源序列相比,11种甲壳动物ND2序列的A+T含量(57.2%~73.6%)和密码子第三位点的A+T含量(51.4%~83.0%)都较低(果蝇分别为81.5%和93.3%)。G+C含量与A+T含量相反,甲壳动物ND2序列的G+C含量(26.4%~42.8%)和密码子第三位点的G+C含量(17%~48.6%)都比果蝇高(果蝇分别为16.5%和6.7%)。

11种甲壳动物ND2序列的富G+C与富A+T密码子比值(0.33~0.75)较果蝇的同源序列比值高(0.24),该

比值在十足目的6种甲壳动物中比较稳定,日本绒螯蟹的比值在十足目的6种甲壳动物中最低(0.33),其它5种十足目甲壳动物的比值非常稳定(0.42~0.45)。腮足亚纲

的 *D. pulex* 和桡足亚纲的 *T. japonicus* 富 G+C 与富 A+T 密码子比值较高,分别为 0.64 和 0.75。该结果与核苷酸组成的结果一致。

```

1 ATC GGT TTT CCT ACC TCT TAT TTC TTT TTT CTA ATA ACA CTA ATC TCA GGA TCA ATT ATC 60
1 I A F P T S V F F F L H T L I S G S I I 20
61 TCT ATT TCT TCA ACT TCG AGA TTT GGA GCT TGA ATT GGA TTA GAA CTA AAT CTT ATA TCA 120
21 S I S S T S S F G A W I G L E L M L N S 40
121 TTT ATT CCT CTT ATT GCT TTT AAA ATA AAT CCA CTT TTT TCT GAA GCA GCT TTA AAA TAT 180
41 F I P L I A F K M N P L F S E A A L K Y 60
181 TTT CTT ATT CAC GCA TTA GGA TCT GTG CTA TTT ATT TCT TCA AGA TTC CTT TTA ATG TGT 240
61 F L I Q A L G S U L F I S S S F L L H S 80
241 TTT TAT TCT TTT AGA CTT TTA TCT ATT TTT TTA GCC CTC TTA TTA AAA CTA GGA GGA GCT 300
81 F Y S F S L A L S I F L A L L L K L G G A 100
301 CCT TTC CAC TTT TGA TTT CCT CAA GTT ATA GAA GGT TTA AAA TGA CCA CAA ATC TTC CTT 360
101 P F H F W F P Q U M E G L K W P Q I F L 120
361 CTA TCT ACA ATT CAA AAA CTC GCC CCA TTA ACC TTA ATT TCT TAT CTA ATA AAC CAA 420
121 L S T I Q K L A P L T L I S Y L M H N E 140
421 ATT TTA ATT AAA ATT ACA ATT TTT TCA GCT ATT TTA TCA GCT TTA ATC GGA AGG ATT GGT 480
141 I L I K I T I F S A I L S A L I G S I G 160
481 GGT TTA AAC TTA ACC TTA TTA CGA AAA ATC ATT GCC TTT TCT TCA ATT AAT CAC TTA TCT 540
161 G L M L T L R K I I A F S S I M H L S 180
541 TGA ATA TTA ATA GCA ATC TCA ATT AGA GAC TCC TCA TGG CTT TTT TAT TTT TTT ATT TAT 600
181 W N L M A I S I S D S S W L F V F I Y 200
601 TCC CTT ATT GTA CTT TCT ATT ACC AGA GTA TTT CAT AAA TTA CAA ACC TTT TCC CTT TCT 660
201 S L I U L S I T S U F H K L Q T F S L S 220
661 ATA CTA ATT CAA TCT GAT CAA AAT AGA ACA CTT CAT GCT ACT ATT ATT TCA CTT AAT TTT 720
221 M L I Q S D Q N S T L H A T I I S L N F 240
721 TTA TCC TTG AGT GGT CTT CCG CTT ATA ACC GGA TTT ATT CCT AAA TGA ATT GAT ATT CAA 780
241 L S L S G L P P M Y G F I P K W I U I Q 260
781 GTT ATA TTA AAT TTA AAT ATA TTT ATC CCC TTA CTT TTT CTT CTT GCT ACC CTA ATT 840
261 U M L N L M H F I P L L F L L U S A L I 280
841 ACT TTA TAT TTT TAT TTA CGA ATT ATC ATT ACC ATA ATC TTA ATA TTT AAC CTT ATT TTA 900
281 T L Y F Y L R I I I T M I L M F M P I L 300
901 AAT TTT AAT ATA AAA TAT AAA TCT CTA ACC GAT TCC CCA TCT TCT CTA TTT TTT AAA TCC 960
301 H F N M K Y K S L T D S P S S L F F K S 320
961 TGC TTC AAC TTT TTT GGT CTC CTA CCA GTA TAT TTC ACC CTT ATT T 1009
S F N F F G L L L P U V F T L I . 336
    
```

图1 日本绒螯蟹线粒体 ND2 基因全序列

Fig.1 The complete sequence of mitochondrial ND2 gene of *Eriocheir japonica*

表1 12种甲壳动物线粒体 ND2 基因核苷酸组成及推导的氨基酸组成比较

Tab.1 Composition comparison of nucleotide and amino acid sequence of mitochondrial ND2 gene among twelve crustacean species

	Ejap	Ptri	Cdes	Pjap	Plon	Pmon	Afra	Dpul	Tcan	Tjap	Tjas	Dyku
A%	28.5	24.7	23.8	25.0	29.7	28.4	26.7	22.5	35.3	28.5	20.4	35.8
T%	44.2	44.1	33.4	39.1	41.7	40.9	41.6	37.2	38.3	40.2	37.6	45.7
C%	19.0	21.4	28.4	22.2	18.0	19.4	17.1	21.0	16.7	19.8	12.7	10.3
G%	8.2	9.8	14.4	13.8	10.6	11.3	14.6	19.3	9.7	11.4	29.3	8.2
总核苷酸数 nucleotide number	1009	1006	1005	1002	1011	1002	891	990	1002	999	966	1026
A+ T%	72.7	68.8	57.2	64.1	71.4	69.3	68.3	59.7	73.6	68.7	58.0	81.5
遗传距离(D) genetic distance	0.00	0.40	0.47	0.46	0.44	0.41	0.57	0.55	0.48	0.65	0.46	0.43
密码子第三位 A+ T% A+ T% at third codon	83.0	77.9	51.4	66.4	84.5	78.4	71.7	59.2	79.6	73.6	56.5	93.3
C%	13.7	15.8	31.6	21.0	11.0	13.5	14.5	20.3	17.1	18.3	11.8	4.4
G%	3.3	6.3	17.0	12.6	4.5	8.1	13.8	21.5	3.3	8.1	31.7	2.3
氨基酸总数 Amino acid number	336	335	334	333	336	333	296	329	333	332	321	341
富 G+ C/富 A+ T 密码子比值 GC rich/AT rich codon value	0.33	0.42	0.42	0.45	0.45	0.43	0.35	0.64	0.28	0.32	0.75	0.24

Ejap: *Eriocheir japonica*; Ptri: *Portunus trituberculatus*; Cdes: *Cherax destructor*; Pjap: *Panulirus japonicus*; Plon: *Pagurus longicarpus*; Pmon: *Penaeus monodon*; Afra: *Artemia franciscana*; Dpul: *Daphnia pulex*; Tcan: *Triops caneriformis*; Tjap: *Tetraclita japonica*; Tjas: *Tigriopus japonicus*; Dyku: *Drosophila yakuba*

3 讨论

不同甲壳动物 ND2 基因长度存在差异, 这种蛋白编码基因长度的变化, 在动物线粒体基因中比较常见^[23, 25]。对核苷酸序列的比对发现(图 1), 日本绒螯蟹 ND2 基因终止信号为 T-, 这在其他线粒体基因也比较常见^[23-25]。甲壳动物的 ND2 基因起始密码子差异较大, 6 种十足目的甲壳动物存在四种起始密码子^[6, 8-10, 26]。

11 种甲壳类 ND2 序列存在的广泛的长度差异, 主要是由于密码子三联体的插入及缺失引起。即使在 6 种十足目的动物中, 也存在一定的长度差异(1002~1011 bp)^[6, 8-10, 26]。与软甲亚纲的 6 种动物相比, 3 种腮足亚纲动物的 ND2 序列长度较短^[5, 7, 11], 这可能是由腮足亚纲的分类地位决定的。不同动物类群的 ND2 基因存在长度差异, 可能是不同类群特有的属性。

基于 ND2 基因全序列计算的十足目科间的遗传距离范围为 0.36~0.48, 然而蔓足亚纲的 *T. japonica* 与十足目 6 种甲壳动物间的遗传距离的范围为 0.47~0.52, 桡足亚纲的 *T. japonicus* 与十足目 6 种甲壳动物间的遗传距离的范围为 0.64~0.66。然而与甲壳纲的桡足亚纲相比, 昆虫纲的 *D. yakuba* 与十足目 6 种甲壳动物间的遗传距离更小, 其范围为 0.43~0.50。这与形态分类的结果存在明显的分歧。Meyer^[23] 的研究结果认为, 在线粒体蛋白编码基因中, 最为保守的是编码细胞色素氧化酶各个亚基的那些基因(COI, II, III)和细胞色素 b 基因(Cytb), 进化速率较快的是编码 NADH 脱氢酶的亚基的基因(ND1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6)和编码 ATP 合成酶亚基的基因(ATPase 6, 8), 本研究结果也表明 ND2 基因作为分子标记来研究高级分类阶元的系统发育关系(如目以上的分类阶元)是不合适的, 采用 ND2 基因作为分子标记来研究低等分类阶元(如属间或近缘种间)的系统发育关系可能会提供比较丰富的信息。

在序列分析过程中得到日本东京东大学西田睦教授帮助, 特此致谢。

参考文献:

- [1] Avise J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. Chapman & Hall, New York, 1994.
- [2] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. Mol Biol Evol, 1996, 13(7): 933-942.
- [3] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome[J]. Nature, 1981, 290: 457-465.
- [4] Clary D O, Wolstenholme E R. The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*, gene organization, and genetic code[J]. J Mol Evol, 1985, 22: 252-271.
- [5] Perez M L, Valverde J R, Batucacas B, et al. Speciation in the *Artemia* genus: mitochondrial DNA analysis of bisexual and parthenogenetic brine shrimps[J]. J Mol Evol, 1994, 38(2): 156-168.
- [6] Yamauchi M M, Miya M U, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the swimming crab, *Portunus trituberculatus* (Crustacea: Decapoda: Brachyura) [J]. Gene, 2003, 311: 129-135.
- [7] Crease T J. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Daphnia pulex* (Cladocera: Crustacea) [J]. Gene, 1999, 233(1-2): 89-99.
- [8] Miller A D, Nguyen T T, Burridge C P, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of the Australian freshwater crayfish, *Cherax destructor* (Crustacea: Decapoda: Parastacidae): a novel gene order revealed [J]. Gene, 2004, 331: 65-72.
- [9] Yamauchi M, Miya M, Nishida M. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese spiny lobster, *Panulirus japonicus* (Crustacea: Decapoda) [J]. Gene, 2002, 295(1): 89-96.
- [10] Hickerson M J, Cunningham C W. Dramatic mitochondrial gene rearrangements in the hermit crab *Pogurus longicarpus* (Crustacea, anomura) [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(4): 639-644.
- [11] Umetsu K, Iwabuchi N, Yuasa I, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of a tadpole shrimp (*Triops cancriformis*) and analysis of museum samples [J]. Electrophoresis, 2002, 23(24): 4080-4084.
- [12] Machida R J, Miya M, Nishida M, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of *Tigriopus japonicus* (Crustacea: Copepoda) [J]. Mar Biotechnol, 2002, 4: 406-417.
- [13] Sakai T. Crabs of Japan and the Adjacent Seas [M]. Kodansha, Tokyo, 1976. 401-403.
- [14] Gao T X, Watanabe S. Genetic variation among local populations of the Japanese mitten crab *Eriocheir japonica* De Haan [J]. Fisheries Science, 1998, 64(2): 198-205.
- [15] 孙红英, 周开亚, 杨小军. 从线粒体 16S rDNA 序列探讨绒螯蟹的系统发生关系 [J]. 动物学报, 2003, 49(5): 592-599.
- [16] 高天翔, 张秀梅, 渡边精一. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 DNA 12S rRNA 序列的比较 [J]. 水产学报, 2000, 5: 412-416.
- [17] 高天翔, 任一平, 张秀梅, 等. 日本绒螯蟹线粒体 DNA 的序列研究 II. 16S rRNA [J]. 青岛海洋大学学报, 2000, 3: 482-486.
- [18] 孔晓瑜, 喻子牛, 刘亚军, 等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 COI 基因片段的序列比较研究 [J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 6: 861-866.
- [19] Tang B P, Zhou K Y, Song D X, et al. Molecular systematics of the Asian mitten crab, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura) [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 29(2): 309-316.
- [20] Nakayama H, Nishikata T. Illustrations of protocols for molecular biology. ② Elements of genetic analysis [M]. Tokyo: Shujinsha Co., Ltd, 1995. 193.
- [21] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA 2: molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244-1245.
- [22] Crozier R H, Crozier Y C. The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization [J]. Genetics, 1993, 1: 97-117.
- [23] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [J]. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 1993, 2: 1-36.
- [24] Inoue J G, Miya M, Tsukamoto K, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese anchovy *Engraulis japonicus* [J]. Fisheries Science, 2001, 67, 828-835.
- [25] Brown W M. The mitochondrial genome of animals [M]. Plenum Press, New York, 1985, 95-130.
- [26] Wilson K, Neville V, Ballment E, et al. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods? [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(6): 863-874.