



DOI:10.13364/j.issn.1672-6510.20170129

线粒体 *CO III* 基因分析三种常见鲷鱼的亲缘关系

刘 军, 曹佳宝, 刘彩玲, 刘云国, 王敏强
(烟台大学生命科学学院, 烟台 264005)

摘要: 金鲷(*Trachinotus ovatus*)、银鲷(*Pampus argenteus*)和中间低鳍鲷(*Peprilus medius*)是重要经济鱼种,其中后两种鱼外形较为相似,分类一直存在分歧.本研究随机采集烟台、青岛地区银鲷、中间低鳍鲷和金鲷的生鲜海鱼样本,提取3种鱼的全基因组DNA,设计通用引物对目标基因进行PCR扩增和测序,后对其线粒体*CO III*全序列及*ATP6*部分序列进行基因多态性分析,探讨3种鱼的亲缘关系;依据测序结果,设计各鱼种的特异引物,用特异引物和通用引物进行复合PCR扩增方法对各鱼种进行种源性鉴定.通过比对分析测序结果,获得了中间低鳍鲷*CO III*基因全序列及*ATP6*基因部分序列且收录在NCBI核苷酸数据库中,登录号分别为KT210112和KT210113.证明NCBI GenBank中发布的刺鲷(*Psenopsis anomala*)序列(KP334103.1)实为中间低鳍鲷.遗传距离分析发现银鲷与金鲷的距离最大,与中间低鳍鲷次之,中间低鳍鲷与金鲷的遗传距离最小.采用复合PCR方法,实现了在同一复合PCR体系中有效区分3种鱼的方法,具有更加便捷、准确的优势.

关键词: *CO III* 基因; 系统进化分析; 复合PCR; 种属鉴定

中图分类号: Q31 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2018)06-0020-07

Relationship Analysis and Species Identification of Three Common Pomfrets Using Mitochondrial *CO III* Gene

LIU Jun, CAO Jiabao, LIU Cailing, LIU Yunguo, WANG Minqiang
(School of Life Science, Yantai University, Yantai 264005, China)

Abstract: *Trachinotus ovatus*, *Pampus argenteus* and *Peprilus medius* are important economic fish. As *Pampus argenteus* and *Peprilus medius* are more similar in shape, there existed much controversy over the classification between the two species. In this study, *Trachinotus ovatus*, *Peprilus medius* and *Pampus argenteus* were randomly collected from the markets of Yantai and Qingdao, and the whole genomic DNAs of the three kinds of fish were extracted. Universal primer pairs were designed for the amplification of the target genes with PCR, followed by sequencing programs. Then, the genetic polymorphism of mitochondrial *CO III* sequences and *ATP6* partial sequences were analyzed, and the genetic relationship of the three fish species was discussed. Based on the sequencing results, species-specific primers were designed, and the specific and universal primers were used to identify the species with the method of complex PCR. The full *CO III* gene sequences and part of *ATP6* sequences of *Peprilus medius* were obtained and published in NCBI, with the accession numbers KT210112 and KT210113 respectively. It has also been determined that the sequence of *Psenopsis anomala* (KP334103.1), published in NCBI, is in fact *Peprilus medius*. Genetic distance analysis reveals that *Pampus argenteus* and *Trachinotus ovatus* have comparatively distant relationship, while the genetic distance between *Peprilus medius* and *Trachinotus ovatus* is considerably small. With multiplex PCR, three fish species can be distinguished in one multiplex PCR system. This system provides more convenient and accurate solutions.

Key words: *CO III* gene; phylogenetic analysis; multiplex PCR; species identification

收稿日期: 2017-05-12; 修回日期: 2017-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31560719)

作者简介: 刘 军(1991—), 男, 山东东营人, 硕士研究生; 通信作者: 王敏强, 教授, wangmqy@163.com

鲷形目包括许多重要的经济鱼类,中国重要的海产食用鱼多属此目。银鲷、中间低鳍鲷、金鲷均属于鲷形目,其中银鲷和中间低鳍鲷属于鲷亚目鲷科,金鲷属于鲷亚目鲷科。鲷科鱼类因外部形态存在较大的相似性,分类一直存在分歧^[1]。

在海洋食品物种鉴别的 DNA 技术中通过测序鉴别鱼类种属是最直接、最准确的方法^[2]。线粒体 DNA 在近缘种间和种内群体间的遗传分化研究方面更具优势^[3]。其中以线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (*COI*) 作为 DNA 条形码 (DNA barcoding) 已广泛应用于鱼类及鱼肉加工产品的种属鉴定^[4], 邢炳鹏等^[5]通过对厦门海域 23 种鱼类样品的研究,证明了 *COI* 基因序列作为鱼类分类鉴定的 DNA 条形码的可行性; 张顺等^[6]利用 *COI* 条形码技术有效、快捷地鉴定出了红树林海域的鱼类,辅助分析雷州半岛红树林区鱼类的物种多样性; Asma 等^[7]通过研究巴基斯坦地区的 3 种人工饲养鱼证明 *COI* 基因序列可以作为分子水平鉴定相关物种的基因条形码; Saggi 等^[8]通过对鱼类线粒体 *COI* 基因片段的研究生成不同鱼种的 DNA 条形码,为所有鱼类创建 DNA 条形码的参考库; 柳淑芳等^[9]通过对山东近海鱼类的 *COI* 基因 DNA 条形码的分析,为山东近海鱼类物种鉴定提供了技术支持; 产久林等^[10]通过对 *COI* 和 16S rRNA 基因的研究,找到了鉴定高原裂腹鱼物种的方法; 张馨月等^[11]通过对 *COI* 基因的研究填补了我国西南大西洋海域部分经济鱼类 DNA 条形码的空白。有关 *COIII* 基因的相关研究报道较少^[12], 李杨等^[13]通过对瓢鸡线粒体 DNA *COIII* 基因变异的研究,发现其对瓢鸡的生长和屠体性状有较大影响; 康文欣^[14]根据鸭特异性 *COIII* 基因序列,设计普通 PCR 特异引物及荧光定量 PCR 引物及探针,分别建立肉制品和动物源性饲料中鸭源性成分检测的普通 PCR 和实时荧光 PCR 两种检测方法; Baklouti-Gargouri 等^[15]通过对 *COIII* 基因的序列分析,发现一种新型 m.9588G>A 突变极大地影响了精液质量。赵上娟等^[16]对 11 个西藏牦牛类群 111 个个体的 *COIII* 全序列进行测定,用多种生物信息学软件分析牦牛类群的遗传多样性和它们间的亲缘关系及分类,为西藏牦牛遗传资源的合理保护和利用提供理论依据。然而迄今为止,以 *COIII* 基因作为 DNA 条形码鉴别鱼种的报道较少,已有于卫霞等^[17]通过对 *COIII* 基因的研究成功鉴定了烟台地区海鲜市场常见的部分经济鱼类,且中间低鳍鲷的 *COIII* 基因全序列至今尚未填补完全。对鲷属鱼类、尤其是银鲷的分类一直受到分类学家的关

注^[18-19]。孙鹏等^[20]、马春艳等^[21]和赵峰等^[22]皆对鲷属鱼类的银鲷、翎鲷和中国鲷的遗传进化进行了探讨,但鲜见有中间低鳍鲷的相关报道。

复合 PCR 是物种鉴别的重要方法,将物种的特异性引物与通用引物结合,可以完成多个物种的鉴定,尤其适用于混合物种的定性检测^[23]。DNA 条形码是通过对一个标准目的基因的 DNA 序列进行分析,从而对相关物种进行鉴定。线粒体 *COI* 基因靠近 5' 端的一段序列能够对鱼种进行有效的鉴定,并且在多数鱼种类群中,*COI* 基因都存在显著的序列变异,以区分不同物种 DNA 序列,从而进行鉴定。线粒体 *COIII* 基因种间差异大,种内相对保守,遂不适合用作高阶元(如科一级)的分类标记,更适用于用作种内不同群体间遗传分化的分子标记。本实验通过对 3 种鱼各样本的 *COIII* 基因及其旁侧基因序列的扩增、测序,比对分析测序结果并结合所采样本的形态学鉴定,证明 NCBI GenBank 中发布的刺鲷序列 (KP334103.1) 实为中间低鳍鲷,并获得了中间低鳍鲷 *COIII* 基因全序列及 *ATP6* 基因部分序列,且收录在 NCBI 核苷酸数据库中,登陆号分别为 KT210112 和 KT210113。同时采用复合 PCR 方法,实现了在同一复合 PCR 体系中有有效区分 3 种鱼的鉴别方法,该体系具有快速、准确、在常规分子实验室条件下即可开展的优势,证明线粒体 *COIII* 基因作为基因条形码的潜在可能性,可在实际鉴定中作为线粒体 *COI* 基因的补充。

1 材料与方法

1.1 材料

用于该研究的 3 种海鱼样品均是依据鱼类形态学鉴定手册进行形态学鉴定后,随机采集于烟台和青岛,每种鱼采集尾数、采集地点和形态学鉴定名称见表 1。

表 1 样本采集地点及尾数

Tab. 1 Locations and numbers of sample collection

形态学鉴定名称	俗名	采集地点	尾数
卵形鲷鲷 (<i>Trachinotus ovatus</i>)	金鲷	烟台红利市场	3
银鲷 (<i>Pampus argenteus</i>)	银鲷	烟大海鱼市场 青岛李村早市	2 2
中间低鳍鲷 (<i>Peprilus medius</i>)	鲷鱼	烟台红利市场	3

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

采用传统酚-氯仿法提取生鲜海鱼样本背部肌肉

组织 DNA^[24].

1.2.2 通用引物的设计

从 NCBI 数据库中下载已公布的鲈形目 14 种 (包括银鲈、中间低鳍鲈、金鲈)、蝶形目 3 种、鲱形目和鲑形目及鳕形目各 1 种共 20 种序列, 利用 DNAMAN 软件进行序列比对分析^[25], 参照有关 DNA 条形码的研究^[26], 在序列两端的保守区域用 Primer 5 软件设计通用引物^[27], 并送上海生工生物工程技术服务有限公司合成. 设计两对通用引物 (上游引物 F1: 5'-CTGACCATGACACTAAGCTTCTT-3', 下游引物 R1: 5'-TATCTTTCCTTGGATTTTAACCA-3'; 上游引物 F2: 5'-AGCCTTTTAAGCTAAAGATTGG-3', 下游引物 R2 与 R1 相同), 通用引物与基因结构示意图如图 1 所示, 其中 F1 位于 *ATP8* 基因, F2 位于 *tRNA-Lys* 基因, R1、R2 位于 *tRNA-Lys* 基因, F1 与 R1 以及 F2 与 R2 所扩增的两段基因片段均包含实验所需的全部的 *COIII* 基因.

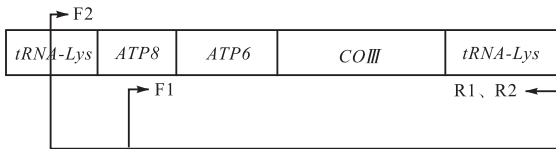


图 1 通用引物与基因结构示意图

Fig. 1 Universal primers and gene structure diagram

1.2.3 目的 DNA 片段 PCR 扩增的反应体系与条件

反应体系为 25 μL: DNA 模板 1 μL, 10×*Taq* Buffer 2.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2.0 μL, F1、R1 引物各 1 μL (10 μmol/L), *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.15 μL, 加 ddH₂O 至 25 μL. PCR 反应程序: 94 °C 8 min; 94 °C 40 s, 53 °C 30 s, 72 °C 110 s, 35 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存.

1.2.4 测序及序列比

对 PCR 产物检测后, 直接送上海生工生物工程技术服务有限公司测序, 共 10 个样本, 其中金鲈 3 个、银鲈 4 个、中间低鳍鲈 3 个, 全部采用双向测序. 测序结果用 DNAMAN 和 Primer 5 软件进行拼接以获得完整序列. 将所测得的 3 种鱼的 mtDNA *COIII* 序列分别输入到 NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) 网站数据库中, 对样品进行相似度分析.

1.2.5 数据分析、进化树构建与序列多态性分析

将测序结果输入 GenBank 进行 BLAST, 选取 NCBI 中相似度为 99% 的序列进行比对, 选取各物种 *COIII* 序列, 用 ClustalX 2.0 对 *COIII* 序列进行比对^[28], 用 MEGA 5.1 软件计算个体之间遗传距离并构建系

统进化树^[29], 再利用 DnaSP 5.10.01 软件分析其序列多态性^[30-31].

1.2.6 特异引物的设计

从 GenBank 上下载 3 种鱼的线粒体基因全序列再结合已测序的部分基因序列, 以测序结果为基础组装成从 F2 引物基因到 *tRNA-Lys* 基因的序列. 利用 DNAMAN 软件进行比对, 在变异较大的区域通过斯坦福大学在线引物设计网站进行特异引物设计 (<http://www.yeastgenome.cgi-bin/web-primer>), 根据通用引物 F2 作为共用上游引物, 设计 3 种鱼的下流特异引物 (SSR-YC: 5'-GTGATTTAGTACTTTTGGTGCTA-3'; SSR-DQC: 5'-GGTAAGAGTAATCAAGGTACGAC-3'; SSR-JC: 5'-GTAAATCGATTAATAATCAGCC-3') 如图 2 所示. 其中, 引物 F2 位于 *tRNA-Lys* 基因, SSR-YC 位于 *ATP8* 基因, SSR-DQC 位于 *ATP6* 基因, SSR-JC 位于 *COIII* 基因. 将设计的引物送上海生工生物工程技术服务有限公司进行合成.

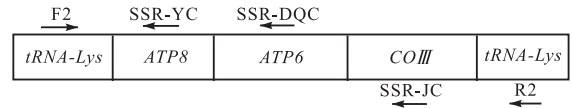


图 2 通用引物与特异引物混合设计示意图

Fig. 2 Schematic design of universal primers and specific primers mixed

1.2.7 单模板 DNA 的复合 PCR 扩增体系

采用 50 μL 的体系进行扩增, 其中模板 2.4 μL, 2×*Taq* PCR Master Mix 25.0 μL, 引物 4.0 μL (F2 2.0 μL, R2 0.7 μL, SSR-JC 0.3 μL, SSR-YC 0.3 μL, SSR-DQC 0.7 μL), ddH₂O 18.6 μL. PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s; 54 °C 50 s; 72 °C 110 s, 共 28 个循环; 72 °C 10 min.

1.2.8 金鲈、银鲈与中间低鳍鲈 3 种 DNA 混合的复合 PCR 扩增体系

采用 50 μL 体系, 其中模板 2.4 μL (平均分配), 2×*Taq* PCR Master Mix 25 μL, 引物 4.0 μL (F2 2.0 μL, SSR-JC 0.5 μL, SSR-YC 1.0 μL, SSR-DQC 0.5 μL), ddH₂O 18.6 μL. 另设对照组, 以超纯水作为模板. 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 56 °C 50 s, 72 °C 1 min, 28 个循环; 72 °C 10 min, 4 °C 保存.

2 结果与分析

2.1 通用引物扩增结果

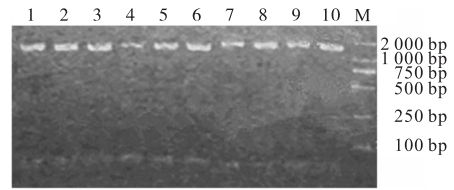
通用引物 F1-R1 扩增样品 1—6 号, 片段大小约

为 1 545 bp, 样品 7—10 号利用 F2-R2 进行扩增, 片段大小约为 1 744 bp, 琼脂糖凝胶电泳检测结果如图 3 所示. 结果显示条带清晰, F1-R1、F2-R2 两对通用引物的通用性较高.

2.2 测序结果分析

2.2.1 测序结果的相似性检索

将金鲷和中间低鳍鲷部分 ATP6 和全部 COIII 基因序列以及银鲷 ATP6 和 COIII 基因全序列, 输入 NCBI 数据库进行相似性检索, 检索结果见表 2.



1—3. 金鲷鱼; 4—6. 中间低鳍鲷; 7—10. 银鲷; M. DL2000 DNA marker

图 3 3种鱼线粒体基因扩增结果
Fig. 3 Mitochondria gene amplification results of the three fish species

表 2 3种鱼 NCBI相似度检索结果

Tab. 2 Similarity search results of the three fish species in NCBI

物种名	相似度/%	NCBI 序列号	标签是否符合
金鲷 (<i>Trachinotus ovatus</i>)	99%	KJ642220.1	是
		KF356397.1	
中间低鳍鲷 (<i>Peprilus medius</i>)	—	—	—
银鲷 (<i>Pampus argenteus</i>)	99%	KF873612.1	是
		KF373560.1	
		EU357803.1	

结果显示相似度(除中间低鳍鲷)均为 99%, 物种鉴定结果与形态学鉴定结果基本吻合, 同时也说明市售鱼种标签与实际基本相符. 其中间低鳍鲷经比对相似度达 99% 的物种为刺鲷 (*Psenopsis anomala*, KP334103.1), 而刺鲷 (KP334103.1) 与 NCBI 中登录的刺鲷 (NC_021460.1) 相似度为 74.37%, 刺鲷 (KP334103.1) 与刺鲷 (NC_021460.1) 相

似度为 74.22%. 又因该研究所用样本均经过形态学鉴定后采集, 样本经形态学鉴定为中间低鳍鲷无误, 所以本研究确定 NCBI 中登录的刺鲷 (KP334103.1) 可能为中间低鳍鲷.

2.2.2 遗传距离分析

从 GenBank 上下载刺鲷、银鲷、金鲷和中间低鳍鲷的序列, 与测序结果进行遗传距离的比较, 见表 3.

表 3 4种鱼序列之间的遗传距离

Tab. 3 Genetic distances between sequences of four fish species

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1														
2	0.000													
3	0.366	0.366												
4	0.036	0.363	0.001											
5	0.363	0.363	0.001	0.000										
6	0.363	0.363	0.001	0.000	0.000									
7	0.363	0.363	0.001	0.000	0.000	0.000								
8	0.344	0.344	0.300	0.297	0.297	0.297	0.297							
9	0.344	0.344	0.300	0.297	0.297	0.297	0.297	0.000						
10	0.344	0.344	0.300	0.297	0.297	0.297	0.297	0.000	0.000					
11	0.376	0.376	0.339	0.337	0.337	0.337	0.337	0.018	0.018	0.018				
12	0.363	0.363	0.414	0.411	0.411	0.411	0.411	0.270	0.270	0.270	0.309			
13	0.363	0.363	0.414	0.411	0.411	0.411	0.411	0.270	0.270	0.270	0.309	0.000		
14	0.363	0.363	0.414	0.411	0.411	0.411	0.411	0.270	0.270	0.270	0.309	0.000	0.000	
15	0.365	0.365	0.413	0.410	0.410	0.410	0.410	0.274	0.274	0.274	0.314	0.004	0.004	0.004

注: 1. 刺鲷 2(NC_021460.1); 2. 刺鲷 3(KC777290.1); 3. 银鲷 (KF873612.1); 4. 银鲷 1; 5. 银鲷 4; 6. 银鲷 3; 7. 银鲷 2; 8. 刺鲷 1 (KP334103.1); 9. 中间低鳍鲷 1; 10. 中间低鳍鲷 2; 11. 中间低鳍鲷 3; 12. 金鲷 (KJ642220.1); 13. 金鲷 1; 14. 金鲷 2; 15. 金鲷 3.

由表 3 可知: 3—7 号银鲷种内的遗传距离为 0.000 ~ 0.001, 9—11 号中间低鳍鲷种内遗传距离为 0.000 ~ 0.018, 12—15 号金鲷种内之间的距离为

0.000 ~ 0.004; 在种间差异上, 1—2 号刺鲷分别与银鲷遗传距离为 0.363 ~ 0.366, 与中间低鳍鲷为 0.344 ~ 0.367, 与金鲷为 0.363 ~ 0.365; 3—7 号银鲷

分别与中间低鳍鲳的种间遗传距离为 0.297 ~ 0.339, 与金鲳为 0.410 ~ 0.414; 中间低鳍鲳与金鲳种间遗传距离为 0.270 ~ 0.274. 通过以上数据分析得出, 3 种鱼种间变异大、亲缘关系较远, 而种内变异很小, 需提及, 8 号刺鲳(KP334103.1)与中间低鳍鲳遗传距离为 0.000 ~ 0.018, 与中间低鳍鲳种内遗传距离一致, 遂比较肯定的为中间低鳍鲳.

2.2.3 序列多态性分析

根据所测序列, 运用 DnaSP5 分析 3 种鱼 *COIII*

基因单倍多样性和核苷酸多样性, 结果见表 4. 核苷酸序列比对结果表明, 3 种鱼 10 个样本共定义了 4 个单倍型, 包括金鲳单倍型 2 个、银鲳单倍型 1 个、中间低鳍鲳 1 个. 金鲳的碱基突变数最大, 共有 3 处变异位点, 单倍型多样性以及核苷酸多样性属金鲳最高(0.667 和 0.002 55), 而中间低鳍鲳、银鲳这两项均为零, 说明种内变异较小, 物种的遗传多态性不明显.

表 4 3 种鱼 *COIII* 基因单倍多样性和核苷酸多样性

Tab. 4 Haplotype and nucleotide diversities of *COIII* genes in three fish species

物种名	样本数	多态性位点 S	单倍型数	单倍型多样 Hd	核苷酸多样性 Pi
金鲳(<i>Trachinotus ovatus</i>)	3	3	2	0.667	0.002 55
银鲳(<i>Pampus argenteus</i>)	4	0	1	0.000	0.000 00
中间低鳍鲳(<i>Peprilus medius</i>)	3	0	1	0.000	0.000 00

2.2.4 *COIII* 进化树构建

采用 ML 法, 用 3 种海鱼所得到的单 *COIII* 目的片段并在 GeneBank 分别下载与此 3 种鱼相似度为 99% 的序列(*Trachinotus ovatus*: KJ642220.1; *Pampus argenteus*: KF873612.1) 以及外族刺鲳序列(*Psenopsis anomala-1*: KP334103.1, *Psenopsis anomala-2*: NC_021460.1, *Psenopsis anomala-3*: KC777290.1), 进行分子系统进化树的构建如图 4 所示.

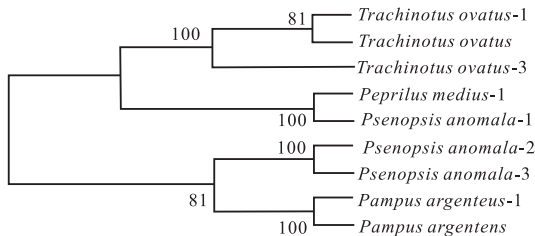


图 4 基于 *COIII* 单倍型的 3 种鲈形目鱼类的 ML 发生树
Fig. 4 ML phylogenetic tree of the three perciformes based on *COIII* haplotypes

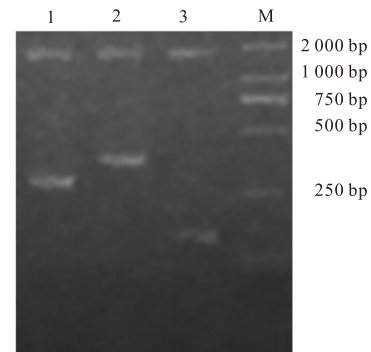
进化树表明金鲳与中间低鳍鲳亲缘关系较近, 与银鲳亲缘关系较远, 中间低鳍鲳与刺鲳 1 (KP334103.1) 聚于同一分支, 即刺鲳 1 (KP334103.1) 与中间低鳍鲳亲缘关系较近, 而外族刺鲳 (NC_021460.1, KC777290.1) 与中间低鳍鲳亲缘关系较远, 更进一步确定了刺鲳 1 实为中间低鳍鲳.

2.3 复合 PCR 扩增

2.3.1 单模板复合 PCR 扩增结果

3 种鱼特异引物和通用引物混合扩增结果如图 5 所示. 通用引物扩增的电泳条带约为 1 744 bp, 而特异引物因鱼种不同则扩增出片段长短也不同, 中间低

鳍鲳、金鲳和银鲳分别为 299、367、165 bp. 构建了鱼类通用引物加特异引物的复合扩增体系, 实现了快速鉴定物种的目的.



1. 中间低鳍鲳; 2. 金鲳; 3. 银鲳; M. DL2000 DNA marker

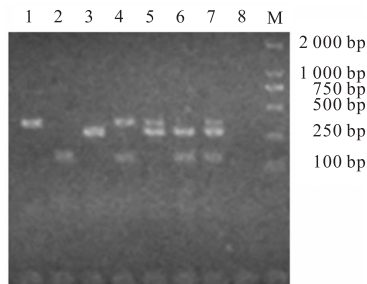
图 5 3 种鱼特异引物加通用引物扩增结果

Fig. 5 Comparison of amplification results of specific and universal primers of the three fish species

2.3.2 混合模板复合 PCR 扩增结果

混合模板复合 PCR 扩增结果如图 6 所示. 8 个 PCR 体系中均包含 3 种鱼的特异性引物, 不同体系中的模板不同(1—3 号体系为单个模板, 4—6 号为两两混合模板, 7 号为 3 种鱼混合模板, 8 号模板为阴性参照样水). 如 1 号体系只含有金鲳鱼模板, PCR 扩增后琼脂糖电泳检测只有金鲳鱼的特异扩增条带; 4 号体系含金鲳和银鲳两种鱼混合模板, 检测有两种鱼特异扩增条带; 7 号体系含有金鲳鱼、银鲳和中间低鳍鲳 3 种鱼混合模板, 检测产生 3 种鱼的特异扩增条带; 用水作模板的 8 号体系对比扩增产物无特异条带. 这说明该研究设计的特异引物特异性强, 混合模

板复合 PCR 选择的体系和条件可行。



1. 金鲳; 2. 银鲳; 3. 中间低鳍鲳; 4. 金鲳 + 银鲳; 5. 金鲳 + 中间低鳍鲳; 6. 银鲳 + 中间低鳍鲳; 7. 银鲳 + 中间低鳍鲳 + 金鲳; 8. 水; M. DL2000 DNA marker

图 6 混合模板的复合 PCR

Fig. 6 Result of multiplex PCR of the composite templates

3 讨论

线粒体 DNA 细胞色素 C 基因常被用作鱼类种属鉴定, 研究中多用 *COI* 基因作为 DNA 条形码^[32-35]. 线粒体 *COIII* 作为另一种蛋白质编码基因具有种间差异大、种内相对保守的特征, 在物种鉴定中具有一定优越性, 可作为线粒体 *COI* 基因的补充. 然而有关 *COIII* 基因作为 DNA 条形码鉴别鱼种的相关研究报道较少^[12]. 本研究通过研究金鲳、银鲳和中间低鳍鲳的线粒体 *COIII* 基因, 以 *COIII* 基因为 DNA 条形码并运用复合 PCR 的手段成功区分了实验所选的 3 种鲳鱼, 并结合本实验室于 2015 年运用 *COI* 基因作为 DNA 条形码鉴别了该 3 种鱼的研究结果^[36], 证明 *COIII* 基因在分子标记中可与 *COI* 基因等相对保守基因进行联合鉴定, 可作为 *COI* 基因的补充, 说明了线粒体 *COIII* 基因作为鱼种鉴定潜在条形码的可行性.

通过扩增鲳科和鲹科鱼类的 *COIII* 基因并测序, 结合本研究所选取的样本经形态学鉴定, 确定 NCBI 中登录的刺鲳 (KP334103.1) 实为中间低鳍鲳. 同时获得了中间低鳍鲳 *COIII* 基因全序列及 *ATP6* 基因部分序列, 且收录在 NCBI 核苷酸数据库中, 登录号分别为 KT210112 和 KT210113, 填补了中间低鳍鲳在 NCBI 中部分序列的空白.

通用引物 F1-R1 能有效地扩增出金鲳与中间低鳍鲳目的基因, 但银鲳未出现目的条带; 采用 F2-R2 引物成功扩增出银鲳的目的基因片段. 为探究其原因, 将测序后的银鲳序列与用作设计通用引物 F1-R1 的银鲳 (KJ569773.1) 比对后发现, 二者的相似度只有 84.2%; 特别是与上游引物比对, 引物 3' 端存在两个

碱基的差异且以碱基 T 结尾结合力弱. 这说明所采集的银鲳样本序列与 NCBI 数据库中登录的银鲳序列 (KJ569773.1) 差异较大.

就 3 种鱼的遗传距离而言, 种内遗传变异小, 种间遗传变异大, 与进化树分析基本保持一致. 根据种属划分依据, 隶属鲳科的中间低鳍鲳和银鲳的亲缘关系本应较近, 而该研究结果显示, 鲳科的中间低鳍鲳与鲹科的金鲳亲缘关系近, 与鲳科的银鲳远. 通过对 GeneBank 上已发布的中间低鳍鲳 (AB205449.1、AB205471)、金鲳 (KJ642220.1) 和银鲳 (KF873612.1) 的 *COI* 和 *cytb* 基因进行遗传距离的分析, 结果为鲳科的中间低鳍鲳和银鲳的亲缘关系近, 与金鲳远, 表明只选用一种基因作为分子标记易出现歧义. 对物种亲缘关系的判定需综合同一物种的多个基因比较, 并以生物的形态结构特征为主要分类依据进行判断.

单倍型多样性分析中, 中间低鳍鲳、银鲳的单倍型多样性均为零, 但事实上银鲳是中国最主要的海捕种类之一, 其单倍型多样性很高^[37]. 出现此种结果的原因可能有两点: 所采集的样本数量较少, 同种鱼各样本间变异小; 采集样本方法虽为随机采样, 但市售鱼种来源可能相同, 导致变异小. 针对此种情况, 在今后的相关实验中, 应该加大样本采集量, 扩大样本采集地域范围, 使所研究结果更具科学性.

本研究中所构建的通用引物和全部特异引物以及所有模板混合扩增的复合 PCR 体系可以有效区分所研究的 3 种鱼的种属关系, 此方法用时短, 灵敏度高, 常规分子生物学实验室条件下即可开展. 但并未在大的群体 (例如 50 尾以上) 中验证其稳定性和重复性, 该体系在该类鱼肉深加工产品的鉴定中是否能够发挥有效作用仍待进一步研究.

参考文献:

- [1] 李渊, 宋娜, Khan F S, 等. 银鲳形态特征与 DNA 条形码研究 [J]. 水产学报, 2013, 37(11): 1601-1608.
- [2] 凌胜男, 吴亚君, 韩建勋, 等. DNA 条形码技术在深加工动物制品源性成分鉴定中的应用研究进展 [J]. 肉类研究, 2017, 31(1): 48-54.
- [3] 陈四海, 区又君, 李加儿. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展 [J]. 生物技术通报, 2011(3): 13-20.
- [4] 王敏, 刘蕊, 黄海, 等. DNA 条形码技术在深圳鱼肉制品鉴定中的应用 [J]. 食品科学, 2015, 36(20): 247-251.
- [5] 邢炳鹏, 林汝榕, 王彦国, 等. 基于 *COI* 基因的厦门海域鱼类 DNA 条形码鉴定 [J]. 应用海洋学学报, 2016,

- 35(1): 144-150.
- [6] 张顺, 廖健, 柏琴, 等. *COI* 条形码辅助分析雷州半岛红树林区鱼类的物种多样性[J]. 海洋与湖沼, 2016, 47(3): 663-672.
- [7] Karim A, Iqbal A, Akhtar R, et al. Barcoding of fresh water fishes from Pakistan[J]. Mitochondrial DNA. Part A. DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(4): 2685-2688.
- [8] Saggu S, Rehman H, Trivedi S, et al. Safety Assessment and Authentication of Seafood Through DNA Barcoding [M]. Berlin: Springer International Publishing, 2016.
- [9] 柳淑芳, 李献儒, 杜腾飞, 等. 山东近海习见鱼类 DNA 条形码及其电子芯片分析[J]. 中国水产科学, 2016, 23(4): 777-790.
- [10] 产久林, 姜华鹏, 刘一萌, 等. *COI* 和 16S rRNA 基因在高原裂腹鱼物种鉴定中的应用[J]. 水生态学杂志, 2015, 36(4): 98-104.
- [11] 张馨月, 刘岩, 张秀梅, 等. 基于 *COI* 基因的西南大西洋部分经济鱼类 DNA 条形码鉴定[J]. 水生生物学学报, 2014, 38(6): 1161-1167.
- [12] 程希婷. 石珊瑚的 DNA 条形码研究及其系统发育分析[D]. 海口: 海南大学, 2012.
- [13] 李杨, 杨向东, 王静, 等. 线粒体 DNA *COX3* 基因多态性与瓢鸡生长和屠体性状的相关性分析[J]. 中国家禽, 2015, 37(8): 12-15.
- [14] 康文欣. 肉制品和饲料中鸭源性成分 PCR 鉴别方法标准化研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2014.
- [15] Baklouti-Gargouri S, Ghorbel M, Ben Mahmoud A, et al. Identification of a novel m.9588G>A missense mutation in the mitochondrial *COIII* gene in asthenozoospermic tunisian infertile men[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2014, 31(5): 595-600.
- [16] 赵上娟, 陈智华, 姬秋梅, 等. 西藏牦牛 mtDNA *COIII* 全序列测定及系统进化关系[J]. 中国农业科学, 2011, 44(23): 4902-4910.
- [17] 于卫霞, 刘晓玲, 王敏强, 等. 基于线粒体 DNA 多态性鉴定烟台海鲜市场鱼种[J]. 烟台大学学报: 自然科学与工版本, 2015, 28(2): 97-102.
- [18] 李渊. 鲳属鱼类形态学和遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
- [19] 孙丹丹. 鲳属鱼类的线粒体基因组演化及银鲳的遗传多样性分析[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015.
- [20] 孙鹏, 彭士明, 尹飞, 等. 利用 *COI* 和 *Cytb* 序列探讨东海区 3 种鲳属鱼类的种群遗传结构[J]. 海洋渔业, 2011, 33(4): 398-404.
- [21] 马春艳, 赵峰, 孟彦羽, 等. 基于线粒体细胞色素 b 基因片段序列变异探讨了 3 种鲳属鱼类系统进化[J]. 渔业科学进展, 2009, 30(5): 20-26.
- [22] 赵峰, 马春艳, 庄平, 等. 东海常见鲳属鱼类的形态差异及系统进化关系探讨[J]. 海洋渔业, 2011, 33(2): 138-143.
- [23] Ahmed S A, Pin L L, Raabe C A, et al. A Combined Rapid DNA Extraction and Multiplex PCR for the Detection of Porcine DNA in Raw and Processed Food[M]. Berlin: Springer International Publishing, 2016.
- [24] 王戊腾, 胡鹏, 安得霞. 提取动物组织 DNA 的方法比较[J]. 甘肃畜牧兽医, 2016, 46(23): 87-90.
- [25] Liu H, Wang H F, Cheng Z P, et al. Phenotypic and genotypic characterization of four factor VIII deficiency patients from central China[J]. Blood Coagulation & Fibrinolysis, 2015, 26(4): 408-413.
- [26] Wang H Y, Dong C A, Lin H C. DNA barcoding of fisheries catch to reveal composition and distribution of cutlassfishes along the Taiwan coast[J]. Fisheries Research, 2017, 187: 103-109.
- [27] Gao J, Cheng A C, Wang M S. Bioinformatics analysis of the complete nucleotide sequence of the duck enteritis virus (DEV) US2 gene[J]. Advanced Materials Research, 2012, 1611(424): 484-487.
- [28] Yang Z M, Chen W W. Molecular phylogeny analysis of full-length *vacA* and *caga* genes from *Helicobacter pylori* [J]. Hereditas, 2012, 34(7): 863-871.
- [29] 李玲. 基于线粒体基因组构建生物系统进化树[D]. 呼和浩特: 内蒙古工业大学, 2014.
- [30] Popa G O, Khalaf M, Dudu A, et al. Genetic diversity of brown trout populations using mitochondrial markers in relatively similar geographical and ecological conditions: A carpathian case study[J]. Transylvanian Review of Systematical and Ecological Research, 2014, 15(2): 368-369.
- [31] Yik F M, Rashdi S A A, Yusof R, et al. Natural selection and haplotype grouping of plasmodium knowlesi gamma protein region II (Pk γ R11): Comparison with the duffy binding protein (PkDBP α R11) [J]. PloS One, 2016, 11(5): e0155627.
- [32] 万超, 蒋丹, 吕泉, 等. 太平洋无须鲷鱼及其制品的 PCR 鉴定[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(1): 71-75.