

中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 及相关种类的 m tDNA 控制区 串联重复序列及其进化意义*

张四明¹⁾ 吴清江²⁾ 张亚平

(中国科学院昆明动物研究所细胞和分子开放实验室, 昆明 650223; ¹⁾中国水产科学研究院长江水产研究所, 荆州 434000;
²⁾中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要 采用 PCR 技术和 DNA 测序技术, 发现了我国一级珍稀保护动物中华鲟 (*Acipenser sinensis*) 线粒体 DNA (m tDNA) 的控制区 (D-loop) 存在数目不等的串联重复序列, 该重复序列造成了中华鲟广泛的异质性现象. 从分子水平进行了不同类型重复序列变化规律的研究, 同时还初探了重复序列在我国其它几种鲟鱼类的存在情况, 发现在白鲟 (*Psephurus gladius*)、达氏鲟 (*A. dabryanus*) 和史氏鲟 (*A. schrenckii*) 均存在类似的重复序列结构. 序列比较分析表明, 不同鲟鱼类重复序列在鲟鱼类进化过程中扮演着一定的角色, 很有可能碱基差异大小与它们的亲缘关系的远近呈正相关.

关键词 中华鲟, 鲟鱼类, m tDNA 控制区, 串联重复序列, 进化
中图分类号 Q 959.46⁺3, Q 349⁺.5

Tandem Repeats of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and Related Species and Its Significance in Evolution

ZHANG Si-ming¹⁾, WU Qing-jiang²⁾, ZHANG Ya-ping

(Laboratory of Cellular and Molecular Evolution, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223;

¹⁾Yangtze River Institute of Fisheries, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Jingzhou 434000;

²⁾Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract By using PCR and DNA sequencing the tandem repeats were confirmed in mitochondrial control region of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*), an endangered fish under first rank protection in China. The tandem repeats caused an extensive m tDNA heteroplasmy which had different m tDNA molecular sizes in single individual. Regulations of different types of repeats were studied. In addition, the repeats were also found in other Chinese species such as Chinese paddlefish (*Psephurus gladius*), Yangtze sturgeon (*A. dabryanus*) and Amur sturgeon (*A. schrenckii*). The sequence divergences among the repeats have positive relationships among relationships of species.

Key words Chinese sturgeon, *Acipenseriformes*, Mitochondrial control region, Tandem repeat, Evolution

真核生物庞大的核基因组含有大量大小不等拷贝数不一的重复序列. 但是, 近年的研究表明, 在分子大小仅为 17 kb 左右的动物核外基因组线粒体 DNA (m tDNA) 也发现有重复序列存在. 由于 m tDNA 基因组是一个高度经济有效的基因组, 绝大多数区域为编码区, 仅有控制区 (又称 D-loop) 为非编码区, 该区域受进化压力较小, 遗传变异较大^[1], 串联重复序列也恰好发生在该区域. 目前, 国

* 国家自然科学基金 (39600112) 和中科院昆明动物研究所细胞和分子开放实验室资助

张四明, 男, 1963 年 2 月生, 理学博士, 研究员

E-mail: zhangsm@yfi.ac.cn 或 zhangsm333@yahoo.com

国内联系人: 汪登强, Tel: (0716) 8212277-3005

Fax: (0716) 8228212, E-mail: wdq@yfi.ac.cn

收稿日期: 1999-09-24, 修回日期: 2000-02-25

外已经在多种动物类群的 mDNA 中发现有重复序列存在^[2-8]。最近, 我们发现分布在长江水系的国家一级保护珍稀水生动物中华鲟 (*A. cipenser sinensis*)、达氏鲟 (*A. dabryanus*) 和白鲟 (*Psephurus gladius*) 以及分布在黑龙江水域的史氏鲟 (*A. schrenckii*) 的 mDNA 有类似的重复序列存在, 并由此造成了个体内的 mDNA 长度异质性和个体间的长度多态现象。

1 材料与方法

1.1 材料

中华鲟、达氏鲟、白鲟和史氏鲟分别来源于湖北宜昌、重庆市万县、四川宜宾和黑龙江水域。组织样本于低温条件下或用 95% 酒精保存运回实验室。

1.2 总 DNA 的提纯、PCR 反应体系及 PCR 引物序列

DNA 的提纯和 PCR 反应体系按张四明等方法进行^[9]。PCR 引物序列如下: 正链引物 L 12925 (5'-TCAAA GCT TACACCA GTCTTGTAACC-3')^[10], 正链引物 DL (5'-CAA GAACACAA GA TTAA TGA G-3') (本文作者设计), 副链引物 H 740 (5'-GA TCAA GGTA TGTCGA TGA CA -3')^[12]。引物位置如图 1 所示。

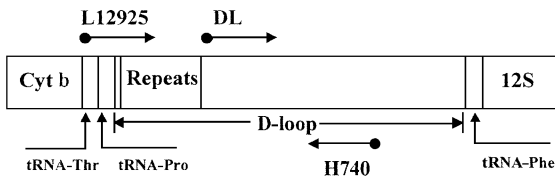


Fig 1 Schematic diagram of location of the PCR primers in m mitochondrial control region

1.3 DNA 序列测定

纯化后的 PCR 产物在 AB 1377 型全自动 DNA 序列仪上进行序列分析。

2 结果和讨论

2.1 中华鲟重复序列存在及由此引起个体内导质性的证明

本研究所用引物 L 12925 是位于 mDNA 细胞色素 *b* 基因和控制区之间的 tRNA 基因的通用引物, 该引物被证明在包括鱼类在内的许多动物类群均有效^[10]。引物 H 740 是位于控制区的引物, 该引物在中华鲟大样本群体遗传分析(没发表资料)和高首鲟 (*A. transmontanus*) 群体遗传研究^[2]中均有效, 同

时也适合达氏鲟、史氏鲟和白鲟。Fig 2a 是由这对 PCR 引物(L 15925 和 H 740)在中华鲟 mDNA 上扩增出的 DNA 带型, 一尾中华鲟个体出现多条 DNA 带。如果用另一对引物 DL 和 H 740 配合扩增不包括重复序列区的控制区序列时, 扩增的 DNA 带仅为一条 DNA 带 (Fig 2b)。由此, 确切地证明了中华鲟在 mDNA 控制区存在重复序列, 重复序列位于 D-loop 左边的位置。不同数目的重复序列单元造成了同一个体存在多种不同 mDNA 分子大小的异性现象。在电泳带上表现为一个个体出现多条 DNA 带 (见 Fig 2a)。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 M

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

Fig 2 Electrophoretic patterns generated by PCR in m mitochondrial control region in different individuals (a) PCR products generated by primer L 15925 and H 740 (b) PCR products generated by primer DL and H 740 Each lane shows the PCR products from one individual M is marker DNA

2.2 中华鲟及相关种类的重复序列的核苷酸序列

在用 PCR 技术充分地证明了中华鲟重复序列存在的基础上, 进一步对中华鲟不同类型的重复序列单元: 如不同个体重复序列单元间差异, 同一个体不同 mDNA 分子的重复序列单元间差异的核苷酸序列进行了分析。同时还初探了我国其它几种鲟鱼类有无类似的结构存在, 以及他们的差异如何, 测得的序列结果列如 Fig 3。

由 Fig 3 可以看出中华鲟重复序列长为 82 bp。重复 DNA 序列分析可以初步得到如下规律:

1) 以中华鲟样本 07 和 09 号 (除 09-4 外) 的结果可以看出, 同一类型 mDNA 分子不同串联重复序列单元间保守, 无变异发生。

				31	37
a07-1	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AAATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat1)
a07-2	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AAATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat2)
a07-3	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AAATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat3)
a09-1	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AGATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat1)
a09-2	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AGATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat2)
a09-3	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AGATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat3)
a09-4	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCA	(repeat4)
a30(1) 1	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	TCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AGATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat1)
a30(1) 2	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	TCACCA	(repeat2)
a30(2) 1	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	TCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAGGTACATT	AGATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat1)
a30(2) 2	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	TCACCA	(repeat2)
b-1	ATGGTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCATACC	ATAATGTTCCG
	CAAGTACATT	AAATTGTTCA	AGTACATAAG	AC	(repeat1)
b-2	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	CCACCA	(repeat2)
c-1	ATGCTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCTAG	TCACIATACT	TTAATGTTGTCG
	GAGGTACATT	AAATTGTTCA	GGTACATAAG	AC	(repeat1)
d-1	ATACTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCAAG	TCACCATATC	TCAATGTTCA
	CAAGTACATT	AAATCGTTTA	GGTACATAAG	GC	(repeat1)
d-2	ATACTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCAAG	TCACCATATT	TCAATGTTCA
	CAGCCACATT	AAATCGTTTA	GGTACATAAG	GC	(repeat2)
d-3	ATACTATGTT	TAATCCACAT	TAATTTCAAG	TCACCA	(repeat3)

Fig 3 Nucleotide sequences of different types of repeats

a, b, c and d represent Chinese sturgeon, Yangtze sturgeon, Amur sturgeon and Chinese paddlefishes. The numbers behind letter are number of samples, The number in parentheses and the number behind the dash represent the different tandem repeats in same mtDNA molecular, which are in order from left to right

2) 中华鲟不同个体的串联重复序列有较小的变异, 如第 31 碱基样本 07 和 09 号为 C, 样本 30 号为 T.

3) 中华鲟同一个体不同类型 mtDNA 分子的串联重复序列间保守, 没有观测到变异发生.

4) 中华鲟的最后一个串联重复实际上是一个不完全串联重复, 长约 36 bp, 在第 37 碱基时发生变化.

5) 由于很难采集到数目较多的达氏鲟、史氏鲟和白鲟样本进行研究(特别是一级保护动物白鲟和达氏鲟几乎从自然界中消失). 由串联重复序列推测达氏鲟、史氏鲟和白鲟可能存在个体间 mtDNA 长度变异甚至长度异质性现象.

6) 推测重复序列中的突变现象可能发生在重复序列形成之前. 如果突变发生在重复序列之后, 各个重复序列单元间由随机突变产生的序列将会不一样, DNA 测序的结果并非如此.

7) 根据国外已报道的有限资料^[2]以及本文的研

究结果可以推测鲟形目鱼类可能广泛地存在串联重复序列结构, 其原因还待进一步研究查明.

8) 中华鲟、达氏鲟、史氏鲟和白鲟均观察到类似的重重复序列结构, 其碱基的变化程度与亲缘关系成正比, 反映了其进化关系. 如中华鲟个体间的重复序列单元碱基突变为 1 个, 中华鲟与达氏鲟、史氏鲟和白鲟间的碱基差异分别为 2~3、7~8 和 12~14 个(见 Fig 3). 物种碱基差异的大小与物种亲缘关系成正比. 碱基差异越大, 物种亲缘关系越远. 因此重复序列差异所提示的几种鲟鱼类的亲缘关系与我们从其它基因(mtDNA ND4L 和 ND4) 序列^[9]和随机扩增多态性 DNA^[11]得到的亲缘关系结果相一致, 初步说明了重复序列在鲟鱼类的进化过程中扮演着一定的角色. 很有可能 DNA 碱基差异的大小与亲缘关系的远近呈正相关关系.

致谢 感谢中国科学院昆明动物研究所细胞和分子开放实验室的陈永久、丁波、聂龙、罗静、张云武、史宏伟等同志

在实验过程中给予的帮助。

参考文献(References)

- 1 Moritz C, Dowling T E, Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics *Ann Rev Ecol Syst*, 1987, **18**: 269~ 229
- 2 Brown J R, Beckenbach A T, Smith M J. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol Biol Evol*, 1993, **10** (2): 326~ 341
- 3 Casane D, Dennebouy N, Rochambeau H, Mounolou J C, Monnerot M. Nonneutral evolution of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of lagomorphs *Mol Biol Evol*, 1997, **14**(8): 779~ 789
- 4 Gach M H, Brown W M. Characteristics and distribution of large tandem duplication in brook stickleback (*Gulaea inconstans*). *Genetics*, 1997, **145**: 383~ 394
- 5 Hayasaka K, Ishida T, Horai S. Heteroplasmy and polymorphism in the major non-coding region of mitochondrial DNA in Japanese monkeys: association with tandemly repeated sequences *Mol Biol Evol*, 1991, **8**(4): 399~ 415
- 6 Hoeh M A, Blakley K H, Brown W M. Heteroplasmy suggested limited biparental inheritance of Mitochondrial DNA. *Science*, 1991, **251**: 1488~ 1490
- 7 Nesbo C L., Arab A R, Jakobsen K S. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percoid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*). *Genetics*, 1998, **148**: 1907~ 1919
- 8 Wilkinson G S, Chapman A. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA. *Genetics*, 1991, **128**: 607~ 617
- 9 张四明, 张亚平, 郑向忠, 陈永久, 邓怀, 汪登强, 危起伟, 张云武, 聂龙, 吴清江. 十二种鲟形目鱼类mtDNA ND4L-ND4基因的序列变异及分子系统学. 中国科学C辑(Zhang Siming, Zhang Ya'ping, Zheng Xiang-zhong, Chen Yong-jiu, Deng Huai, Wang Deng-qiang, Wei Qiwei, Zhang Yunwu, Nie Long, Wu Qing-jiang. Molecular phylogeny of twelve species of *Acipenseriformes* inferred from mtDNA ND4L and ND4 genes sequences analysis *Sciences in China (Series C)*), 1999, **29**(6): 608~ 614
- 10 Kocher T D, Thomas W K, Myers A, Edwards S V, Paabo S F, Villablanca F X, Wilson A C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplified and sequences with conserved primers *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 6196~ 6200
- 11 张四明, 邓怀, 汪登强, 吴清江. 7种鲟鱼类亲缘关系的随机扩增多态性DNA研究. 自然科学进展(Zhang Siming, Deng Huai, Wang Deng-qiang, Wu Qing-jiang. Systematic relationships among the seven species of sturgeons and paddlefishes based on random amplified polymorphic DNA analysis, *Prog Natur Sci*), 1999, **9**(9): 818~ 823