

13种河豚鱼COI基因部分DNA序列分析及在物种鉴定中的应用

陈文炳¹, 缪婷玉¹, 翁国柱², 陈融斌³, 邵碧英¹, 彭娟¹, 江树勋¹

(1.福建出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 福建 福州 350001;

2.莆田出入境检验检疫局, 福建 莆田 351100; 3.集美大学水产学院, 福建 厦门 361021)

摘要:应用COI基因聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增通用引物,对福建省和海南省搜集的3属13种河豚鱼样品与9个未知种名的河豚鱼样品的COI基因靶序列片段进行PCR扩增和测序,13个已知物种样品的DNA序列提交基因库(GenBank),取得相应的登录号。各物种COI基因靶序列长度均为681 bp。应用DNAMAN V6软件对样品的DNA序列进行同源性比对分析,建立样品间系统关系同源树。基于COI基因序列,供试13个样品被划分为4个类群组。群间的同源率为84%,群内同源率为90%~100%。根据序列同源性分析结果,9个未知种名的样品被归类到2个类群组中,判定这9个样品为东方鲀属或腹刺鲀属,其中1个样品(HNW2)为月腹刺鲀,4个样品(HNW3、HNW4、FJW2、FJW5)为棕斑腹刺鲀,1个样品(HNW1)为暗鳍腹刺鲀;3个样品(FJW1、FJW3、FJW4)为横纹东方鲀。探讨基于DNA条形码技术的COI基因靶序列片段在河豚鱼种属鉴别中应用的可能性。

关键词:河豚鱼; COI基因; DNA条形码; 物种鉴定

Analysis of Partial DNA Sequence of COI Gene and Its Application for Species Identification of Thirteen Species of Puffer Fish

CHEN Wenbing¹, MIAO Tingyu¹, WENG Guozhu², CHEN Rongbin³, SHAO Biying¹, PENG Juan¹, JIANG Shuxun¹

(1. Inspection and Quarantine Technology Center, Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350001, China;

2. Putian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Putian 351100, China;

3. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Partial fragments of the cytochrome oxidase subunit I (COI) genes from 13 species in 3 genera of puffer fish and 9 samples from unknown species collected in Fujian province and Hainan province were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using universal primers and the PCR products were sequenced. The DNA sequences of 13 known species were submitted to the GenBank with accession numbers. The target gene sequence was 681 bp in length for all species. Sequence alignment was carried out using DNAMAN V6 software, and a phylogenetic tree among species was established. Thirteen known species were divided into 4 groups, with 84% homology between the groups and 90%–100% within the groups. Nine samples of unknown puffer fish species were classed into 2 groups: the *Takifugu* and *Gastrophysus* genera; HNW2 was identified as *Gastrophysus lunaris*, HNW3, HNW4, FJW2, and FJW5 as *G. spadiceus*, HNW1 as *G. gloveri* and FJW1, FJW3 and FJW4 as *T. oblongus*.

Keywords: puffer fish; COI gene; DNA barcode; species identification

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201824022

中图分类号: S917.4; Q78

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2018)24-0145-04

引文格式:

陈文炳, 缪婷玉, 翁国柱, 等. 13种河豚鱼COI基因部分DNA序列分析及在物种鉴定中的应用[J]. 食品科学, 2018, 39(24): 145-148. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201824022. <http://www.spkx.net.cn>

CHEN Wenbing, MIAO Tingyu, WENG Guozhu, et al. Analysis of partial DNA sequence of COI gene and its application for species identification of thirteen species of puffer fish[J]. Food Science, 2018, 39(24): 145-148. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201824022. <http://www.spkx.net.cn>

收稿日期: 2018-05-07

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技计划项目(2013IK149)

第一作者简介: 陈文炳(1962—), 男, 研究员, 博士, 研究方向为农产品、食品分子生物学检测技术。

E-mail: 621213wbc@163.com

聚合酶链式反应（polymerase chain reaction, PCR）扩增技术在食品动物成分鉴别中已得到广泛应用^[1-4]，早期DNA条形码是指通过PCR扩增与测序获得的长度适当的线粒体细胞色素C氧化酶亚基I（mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I, *CO I*）基因的DNA片段^[5]，其间碱基序列在物种间遗传变异较大，而在种内遗传变异小，相对稳定。近年来，被作为DNA条形码的不仅限于*CO I*基因，包括基于16S rRNA和线粒体细胞色素b（cytochrome b, *Cyt b*）基因的DNA条形码，都已被广泛应用于鱼类物种鉴别^[6-18]。在河豚鱼物种分化分子生物学研究领域，陈超等^[19]应用随机扩增多态性DNA（random amplification of polymorphic DNA, RAPD）标记技术对4种东方鲀属河豚鱼进行系统关系的研究分析。邵爱华等^[20-24]以暗纹东方鲀（*Takifugu fasciatus*）为研究材料，对16S rRNA基因、*Cyt b*基因及*CO I*、*CO II*、*CO III* 3种亚基等进行了一系列的序列分析研究。本课题组前期建立并优化了河豚鱼物种成分的PCR检测方法^[25]，以及对河豚鱼的*Cyt b*与16S rRNA的靶基因序列进行同源性分析^[26-27]，探讨物种间的亲缘关系，并对基于芯片生物分析系统^[28]与限制性内切酶确证河豚鱼物种成分PCR检测结果等进行了一系列探讨^[29]。

本实验利用13个已知物种名称的河豚鱼*CO I*基因靶序列进行序列同源性比对分析，建立样品间的系统关系树，并将9个未知种名的河豚鱼样品与13个已知物种名称的*CO I*基因靶序列进行同源性比对分析，为基于*CO I*基因的DNA条形码技术在河豚鱼物种鉴定中的应用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

表1 22个河豚鱼供试样品

Table 1 Twenty two samples of puffer fishes tested in this study

序号	中文学名	拉丁学名	来源
1	黑鳃兔头鲀	<i>Lagocephalus inermis</i>	福建莆田
2	兔头鲀	<i>L. lagocephalus</i>	福建莆田
3	暗纹东方鲀	<i>Takifugu fasciatus</i>	福建莆田
4	黄鳍东方鲀	<i>T. xanthopterus</i>	福建莆田
5	棕斑腹刺鲀	<i>Gastrophysus spadiceus</i>	福建莆田
6	红鳍东方鲀	<i>T. rubripes</i>	福建莆田
7	暗鳍腹刺鲀	<i>G. gloveri</i>	福建莆田
8	月腹刺鲀	<i>G. lunaris</i>	福建厦门
9	横纹东方鲀	<i>T. oblongus</i>	福建莆田
10	双斑东方鲀	<i>T. bimaculatus</i>	福建莆田
11	菊黄东方鲀	<i>T. flavidus</i>	福建莆田
12	铅点东方鲀	<i>T. alboplumbeus</i>	福建厦门
13	虫纹东方鲀	<i>T. vermicularis</i>	福建厦门
14	5个河豚鱼干样品 (FJW1-W5)	未知	福建福州沿海
15	4个河豚鱼新鲜个体 (HNW1-W4)	未知	海南海口市

已知物种名称的河豚鱼样品11个来自福建莆田、厦门等水产养殖场，2个来自福建省集美大学水产学院近海捕捞；5个未知物种河豚鱼干样品来自福建福州沿海，4个未知物种新鲜个体来自海南省（表1）。

十六烷基三甲基溴化铵（hexadecyltrimethylammonium bromide, CTAB）上海博亚生物技术有限公司；2×*Taq* PCR Master Mix、蛋白酶K、DNA Marker I 天根生化科技（北京）有限公司；琼脂糖 英国Oxoid公司；*CO I*基因PCR扩增通用引物根据文献^[30]进行序列修改，正向*CO I A*：5'-GGCGTATGCGTCTGGGTAGTC-3'，反向*CO I F*：5'-CCTGCAGGAGGAGGAGATCC-3'，由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

1.2 仪器与设备

Ultrospec 1100 pro核酸蛋白分析仪 瑞典Amersham公司；T-Gradient梯度PCR仪 德国Biometra公司；Power Pac 1000电泳仪 美国Bio-Rad公司；GL212 PRO凝胶成像仪 美国Carestream公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA提取与PCR扩增

DNA提取方法与PCR扩增参照文献^[25]。取鲜肉或干样50 mg加入CTAB裂解液后在超声波环境中65℃温育处理30 min，进行DNA提取、PCR产物电泳，并拍照保存。

1.3.2 DNA碱基序列测定、比对、同源性分析

PCR扩增产物委托生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序，DNA序列用DNAMAN V6分析软件进行整理分析，以.seq格式输出，并对各个样品的DNA序列进行比对与同源性分析，比对结果以MASED Document/DNAMAN1格式输出。

2 结果与分析

2.1 *CO I*基因序列分析与比对

表2 河豚鱼的*CO I*基因PCR产物碱基序列的基本信息

Table 2 Information about partial sequences of the *CO I* gene from puffer fish

序号	样品名称	个数（占全序列百分比）				碱基总数/bp	GenBank登录号
		A	C	G	T		
1	黑鳃兔头鲀（ <i>L. inermis</i> ）	183 (26.9%)	146 (21.4%)	199 (29.2%)	153 (22.5%)	681	KT833769
2	兔头鲀（ <i>L. lagocephalus</i> ）	184 (27.0%)	146 (21.4%)	199 (29.2%)	152 (22.3%)	681	KT833770
3	暗纹东方鲀（ <i>T. fasciatus</i> ）	195 (28.6%)	125 (18.4%)	189 (27.8%)	172 (25.3%)	681	KT833771
4	黄鳍东方鲀（ <i>T. xanthopterus</i> ）	195 (28.6%)	125 (18.4%)	189 (27.8%)	172 (25.3%)	681	KT833772
5	棕斑腹刺鲀（ <i>G. spadiceus</i> ）	189 (27.8%)	144 (21.1%)	199 (29.2%)	149 (21.9%)	681	KT833773
6	红鳍东方鲀（ <i>T. rubripes</i> ）	191 (28.0%)	124 (18.2%)	192 (28.2%)	174 (25.6%)	681	KT833774
7	暗鳍腹刺鲀（ <i>G. gloveri</i> ）	192 (28.2%)	142 (20.9%)	196 (28.8%)	151 (22.2%)	681	KT833775
8	月腹刺鲀（ <i>G. lunaris</i> ）	177 (26.0%)	135 (19.8%)	204 (30.0%)	165 (24.2%)	681	KT833776
9	横纹东方鲀（ <i>T. oblongus</i> ）	193 (28.3%)	127 (18.6%)	193 (28.3%)	168 (24.7%)	681	KT833777
10	双斑东方鲀（ <i>T. bimaculatus</i> ）	197 (28.9%)	129 (18.9%)	187 (27.5%)	168 (24.7%)	681	KT833778
11	菊黄东方鲀（ <i>T. flavidus</i> ）	195 (28.6%)	128 (18.8%)	190 (27.9%)	168 (24.7%)	681	KT833779
12	铅点东方鲀（ <i>T. alboplumbeus</i> ）	190 (27.9%)	132 (19.4%)	192 (28.2%)	167 (24.5%)	681	KT833780
13	虫纹东方鲀（ <i>T. vermicularis</i> ）	182 (26.7%)	147 (21.6%)	199 (29.2%)	153 (22.5%)	681	KT833781

对*CO I*基因PCR扩增引物进行扩增,获得的PCR产物进行测序,片段大小为681 bp,碱基序列基本信息与基因库(GenBank)登录号见表2。碱基序列同源性分析结果表明,13个已知种名的河豚鱼样品碱基序列差别主要表现在单个碱基的置换。

2.2 序列同源性分析

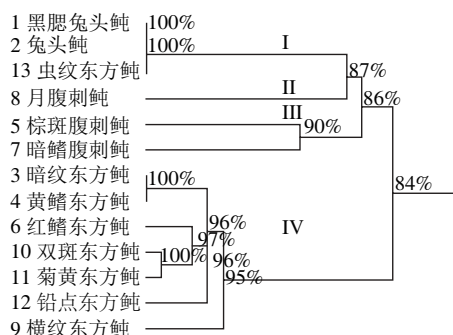


图1 13个已知种名河豚鱼的*CO I*部分基因PCR产物碱基序列同源树

Fig. 1 Phylogenetic tree based on *CO I* sequence homology among 13 known species

13个已知种名的河豚鱼样品间同源率为84%~100%(图1),可归为4组,第I组含兔头鲀属的黑腮兔头鲀与兔头鲀2个种及虫纹东方鲀,同源率为100%;第II组月腹刺鲀,与第I组同源率87%,第III组含腹刺鲀属的棕斑腹刺鲀、暗鳍腹刺鲀2个种,同源率为90%,与I组、II组间同源率86%,第IV组含东方鲀属的7个种,同源率在95%~100%之间。*CO I*部分基因PCR产物碱基序列同源性分析结果,除虫纹东方鲀归到兔头鲀属外,其他物种划分与形态学物种分类较为吻合,但是,物种间同源率达到100%,不利于作为物种鉴别的指标,因此有必要通过其他基因作为辅助组合,加以判断。

2.3 未知种名河豚鱼样品的种属

*CO I*基因部分片段的PCR产物序列同源性聚类分析结果显示(图2),包括9个未知种名的样品,22个供试样品可分为4个组,其中9个未知种名的样品被归类到3个类群组中,分别属于东方鲀属和腹刺鲀属2个属。无未知种名样品归到I组;HNW2归到II组,与月腹刺鲀同源率100%;HNW3、HNW4、FJW2、FJW5、HNW1共5个样品归到第III组(腹刺鲀属),其中HNW3、HNW4、FJW2、FJW5与棕斑腹刺鲀同源率为100%,HNW1与暗鳍腹刺鲀同源率100%;FJW1、FJW3、FJW4 3个样品归到第IV组,与横纹东方鲀同源率均为100%。

根据上述分析结果判定,9个未知种名的样品中,1个样品(HNW2)为月腹刺鲀,4个样品(HNW3、HNW4、FJW2、FJW5)为棕斑腹刺鲀,1个样品

(HNW1)为暗鳍腹刺鲀,3个样品(FJW1、FJW3、FJW4)为横纹东方鲀。该结果与笔者基于同样河豚鱼13个样品的*Cyt b*基因部分序列(使用的XBssb引物^[31]:正向:5'-GGCGTGAAAAACCATCGTTG-3',反向:5'-CCCCGACATTCGGTTTACAAGAC-3')聚类分析结果(未发表)高度吻合(图3),图3中除FJW2样品与棕斑腹刺鲀同源率为96%以外,其他8个样品归类结果与本研究聚类分析结果(图2)完全一致。

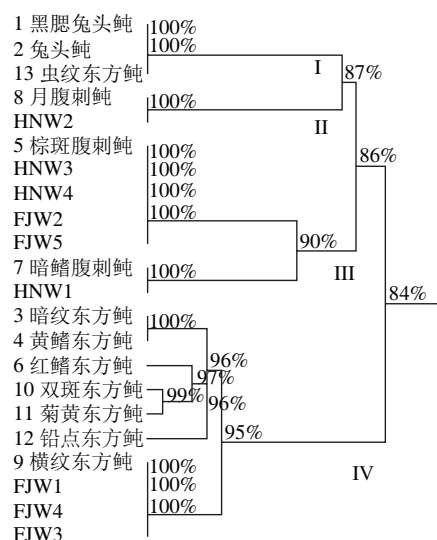


图2 已知种名与未知种名河豚鱼的*CO I*部分基因PCR产物碱基序列同源树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on *CO I* sequence homology between known and unknown species

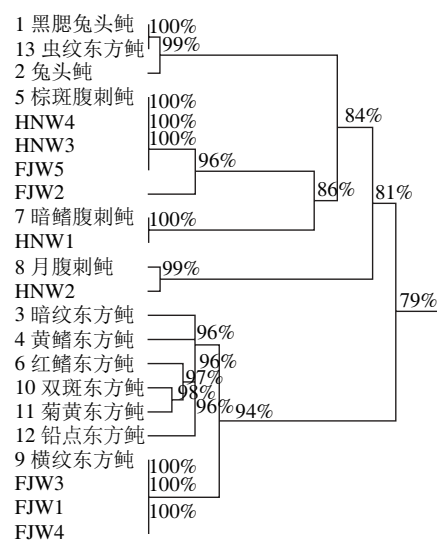


图3 13个已知种名与9个未知种名的河豚鱼样品*Cyt b*(XBssb引物)部分基因PCR产物序列同源树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on *Cyt b* sequence (using XBssb primers) homology between known and unknown species

3 结论与讨论

本实验获得的3属13种河豚鱼样品的*CO I*基因部分片段DNA碱基序列共13条,提交GenBank,取得相应的登录号(表2)。探讨了*CO I*基因部分序列的DNA条形码技术在河豚鱼种属鉴别中应用的可能性。根据DNA条形码序列聚类分析,判定了9个未知种名的河豚鱼样品所属的物种,其中,HNW2为月腹刺鲀,HNW3、HNW4、FJW2、FJW5均为棕斑腹刺鲀,HNW1为暗鳍腹刺鲀,FJW1、FJW3、FJW4为横纹东方鲀。该结果在XBssb引物^[23]对同样河豚鱼样品的*Cyt b*基因部分序列进行PCR扩增获得的序列聚类分析结果(图3)中得到验证。另外,本实验对已知种属的样品分类与未知样品的种属判定结果也比笔者之前基于另一个*Cyt b*基因片段部分DNA序列^[26]及16S rRNA基因部分DNA序列的分类结果^[27]更接近形态学分类、更合理。可见本实验选择的*CO I*基因的DNA片段序列是比较理想的河豚鱼物种归类的鉴定指标,可以用于河豚鱼种属鉴定。13号样品虫纹东方鲀在16S rRNA^[27]、*Cyt b*基因(图3)及本研究*CO I*基因的DNA片段序列的同源性聚类分析结果,都是与兔头鲀属归为一组,且同源率达99%~100%,可能形态学分类上存在误差,此问题有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 陈文炳,邵碧英,廖宪彪,等.加工食品中若干动物成分的PCR检测技术应用研究[J].食品科学,2005,26(8):338-342.
- [2] 吴亚君,王斌,刘鸣畅,等.阿胶中马和驴成分的实时荧光PCR检测[J].食品科学,2014,35(8):85-88. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201408016.
- [3] LIN W F, HWANG D F. A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito[J]. Food Control, 2008, 19: 879-885.
- [4] 张舒亚,金丽琴,蒋剑琼,等.食品中鱼源性成分PCR的检测方法[J].食品与发酵工业,2010,36(1):142-145.
- [5] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALI S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of Royal Society of London, 2003, 270: 313-321. DOI:10.1098/rspb.2002.2218.
- [6] 李新光,王璐,赵峰,等.DNA条形码技术在鱼肉及其制品鉴别中的应用[J].食品科学,2013,34(18):337-342. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201318069.
- [7] 毕潇潇,高天翔,肖永双,等.4种鲱鱼线粒体16S rRNA、*CO I*和*Cyt b*基因片段序列的比较研究[J].南方水产,2009,5(3):46-52.
- [8] 彭居俐,王绪祯,王丁,等.基于线粒体*CO I*基因序列的DNA条形码在鲤科鲈属鱼类物种鉴定中的应用[J].水生生物学报,2009,33(2):271-276.
- [9] 张馨月,刘岩,张秀梅,等.基于*CO I*基因的西南大西洋部分经济鱼类DNA条形码鉴定[J].水生生物学报,2014,38(6):1161-1167. DOI:10.7541/2014.168.
- [10] 辛俭,张玉荣,徐冬冬,等.基于线粒体16S rDNA和*CO I*基因探讨中国近海黄姑鱼类的分子系统进化关系[J].海洋与湖沼,2014,45(2):307-313. DOI:10.11693/hyhz20130600085.
- [11] CLARK L F. The current status of DNA barcoding technology for species identification in fish value chains[J]. Food Policy, 2015, 54: 85-94. DOI:10.1016/j.foodpol.2015.05.005.
- [12] STEIN F M, WONG J C Y, SHENG V, et al. First genetic evidence of illegal trade in endangered European eel (*Anguilla anguilla*) from Europe to Asia[J]. Conservation Genetics Resources, 2016, 8(4): 1-5. DOI:10.1007/s12686-016-0576-1.
- [13] 邢炳鹏,林汝榕,王彦国,等.基于*CO I*基因的厦门海域鱼类DNA条形码鉴定[J].应用海洋学报,2016,35(1):144-150. DOI:10.3969/J.ISSN.2095-4972.2016.01.018.
- [14] 李渊,张丽艳,张然,等.基于DNA条形码技术对苍南海域仔稚鱼的物种鉴定[J].中国海洋大学学报,2017,47(12):72-79. DOI:10.16441/j.cnki.hdx.20160343.
- [15] 陈文炳,缪婷玉,彭娟,等.基于16S rRNA基因DNA条形码鉴定美洲鳗、欧洲鳗、日本鳗[J].食品科学,2017,38(4):283-289. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201802026.
- [16] 陈文炳,邵碧英,缪婷玉,等.多基因DNA条形码鉴定6个鳗鱼物种[J].食品科学,2018,39(2):163-169. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201704046.
- [17] 蒋芝华,丁棒棒,王熠,等.石首鱼科海洋鱼类DNA条形码的构建[J].核农学报,2018,32(4):673-680. DOI:10.11869/j.issn.1008551.2018.04.0673.
- [18] 潘艳仪,邱德义,陈健,等.基于微型DNA条形码的多种动物源性成分的鉴定[J].食品科学,2018,39(10):326-332. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201810049.
- [19] 陈超,石拓,孙曙光,等.应用RAPD标记对东方豚属进行种类鉴别及其聚类分析[J].海洋水产研究,2001,22(3):32-36.
- [20] 邵爱华,朱江,陈葵,等.暗纹东方豚粒体细胞色素b及其侧翼tRNA基因的克隆与序列分析[J].中国水产科学,2005,12(6):675-681.
- [21] 邵爱华,朱江,陈葵,等.暗纹东方豚线粒体*CO II*及两侧tRNA基因的克隆和序列分析[J].动物学杂志,2005,40(6):1-8.
- [22] 邵爱华,朱江,陈葵,等.暗纹东方豚线粒体*CO I*及其侧翼tRNA基因的克隆与序列分析[J].遗传,2006,28(8):963-971.
- [23] 邵爱华,朱江,史全良,等.暗纹东方豚线粒体*CO III*克隆及序列分析[J].水产科学,2006,25(8):391-396.
- [24] 邵爱华,杜建,陈葵,等.暗纹东方豚线粒体DNA 16S rRNA基因克隆、测序与在分子系统发育分析中的应用[J].江苏农业科学,2009(2):15-19.
- [25] 陈文炳,赵晨,邵碧英,等.PCR方法检测河豚鱼的引物筛选及反应体系的优化[J].食品科学,2010,31(20):376-381.
- [26] 陈文炳,林少华,邵碧英,等.河豚鱼*Cyt b*基因部分DNA序列分析与应用[J].食品科学,2012,33(20):227-232.
- [27] 陈文炳,翁国柱,陈融斌,等.河豚鱼16S rRNA基因部分DNA序列分析及应用探讨[J].食品科学,2015,36(21):140-144. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201521027.
- [28] 陈双雅,陈文炳,张津,等.应用PCR-RFLP和芯片生物分析系统鉴别河豚鱼品种[J].食品科学,2012,33(22):200-202.
- [29] 曲良苗,陈文炳,缪婷玉,等.限制性内切酶酶切确证河豚鱼成分PCR检测结果[J].食品科学,2014,35(8):169-173. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201408034.
- [30] PAHUMBI S R, KESSING B D. Population biology of the transarctic exchange: mtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins[J]. Evolution, 1991, 45(8):1790-1805.
- [31] YAMANOUE Y, MIYA M, MATSUURA K, et al. Explosive speciation of *Takifugu*: another use of *fugu* as a model system for evolutionary biology[J]. Molecular Biology and Evolution, 2009, 26(3):623-629.