

凡纳滨对虾线粒体 DNA CO I 基因片段序列

郑连明, 林元烧*, 曹文清, 方旅平, 周美玉, 王桂忠

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

摘要: 以相应引物对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) 线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I 亚基基因 (mtDNA CO I) 进行 PCR 扩增, 经过基因重组、转化、克隆、筛选、DNA 测序, 得到 709 bp 的碱基片段。碱基组成 A、C、G、T 含量分别为 198 bp (27.93%)、136 bp (19.18%)、129 bp (18.19%)、246 bp (34.70%)。与果蝇(*Drosophila yakuba*)的 mtDNA CO I 全序列对比, 经分析发现: 本实验获得的凡纳滨对虾 mtCO I 基因片段序列和 GenBank 上的同种序列 (AY264901) 都只是基因序列的一部分, 二者之间有 41 bp 的重叠并可拼接, 拼接后的总长为 1 515 bp。证明本实验条件下获得的 mtCO I 基因片段确实来自凡纳滨对虾线粒体 DNA, 且本实验所用引物具有通用性。

关键词: 凡纳滨对虾; 线粒体 DNA CO I 基因; 序列

中图分类号: P 735; Q 7

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2005) 06-0815-06

凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*), 又名南美白对虾, 是迄今所知养殖产量最高的 3 种对虾之一。随着凡纳滨对虾养殖规模的发展和环境恶化, 虾病日益猖獗, 对其野生资源的压力越来越大, 造成了种质退化和遗传多样性的丧失。因此凡纳滨对虾的种质资源保护和种群遗传结构的研究逐渐深入, 其中利用了多种生物技术, 如染色体^[1]、同工酶^[2]、RAPD^[3,4]、微卫星标记^[5]、延伸因子 I- α 内含子基因序列 (intron sequences from the elongation factor- α gene) 分析^[6] 等。近年来, 动物线粒体 DNA (mtDNA) 已成为研究动物系统进化和群体遗传学分析的理想研究对象。通过测定、分析 mtDNA 全序列或部分基因片段来探讨物种进化关系已被广泛应用到水产研究领域, 其中有关 12S rRNA、16S rRNA、CO I 等基因片段的研究较多^[7-11]。在 GenBank 数据库中登录的甲壳类线粒体核酸序列中 CO I 相关序列占 34.3%^[12], 对我国常见的养殖虾蟹类 mtCO I 基因片段序列都有报道, 相关研究主要集中在利用单个基因或单个基因的片段作为研究对象进行序列比较。本研究报道了凡纳滨对虾的线粒体 DNA CO I 基因片段序列, 并与其它相关报道进行比较分析, 为今后凡纳滨对虾的种质资源保护和分子水平的系统学与种群遗传学研究提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验材料为凡纳滨对虾 P5-P8 幼体, 于 2003 年 9 月取自厦门鳌冠育苗场 (亲体于当年来自美国夏威夷海域)。将活体携带至实验室后立即使用无水乙醇固定。

1.2 实验方法

(1) 基因组 DNA 提取与检测

取出无水乙醇固定的样品, 经梯度乙醇溶液稀释浸泡去除样品中的乙醇后, 灭菌纯水浸泡于 4℃ 过夜; DNA 提取采用先饱和酚再用 V (苯酚) □ V (氯仿) □ V (异丙醇) = 25 □ 24 □ 1 提纯, 冰无水乙醇沉淀法。TE 溶解后, -20℃ 保存备用。0.8% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 全自动凝胶成像系统 (Genius, SYNGENE, England) 拍照。

(2) PCR 扩增

引物序列如下:

LCO-1490 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3'

HCO-2198 5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'

PCR 扩增在 T3 Thermoblock 型 PCR 仪 (BIOMETRA 公司) 上进行。PCR 反应体系总体积 25 μ L, 其中 PCR 缓冲液 2.5 μ L、Mg²⁺ 1.6 μ L、dNTP 0.5 μ L、LCO-1490 0.25 μ L、HCO-2198 0.25 μ L、 γ Taq 聚合酶 0.15 μ L、DNA 模板 2.0 μ L 和灭菌双蒸水 17.75 μ L。PCR 反应程序设计为: 94℃ 预变性 3

收稿日期: 2004-10-11

基金项目: 国家自然科学基金 (30471322) 资助

作者简介: 郑连明 (1978-), 男, 博士研究生。

* 通讯作者: yslin@xmu.edu.cn

min, 94 °C 变性 1 min, 47 °C 退火 1 min 15 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 循环 40 次, 最后 72 °C 10 min.

1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 全自动凝胶成像系统拍照.

(3) 基因克隆结果检测

(a) PCR 产物的回收: 采用柱离心式小量胶回收试剂盒(编号: W5212, 华舜公司)回收. 再用 1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 凝胶成像系统观察、拍照, 以确定是否回收成功.

(b) 连接: Promega 公司连接试剂盒(编号: A1380)进行连接, 总体积 10 μL, 如下: × 2 连接缓冲液 5 μL, pGEM-T Easy Vector 1 μL, 连接酶 1 μL、PCR 回收产物 3 μL. 连接环境 4 °C, 过夜.

(c) 转化: 大肠杆菌感受态由 Promega 公司的试剂盒(编号: A1380)提供. 固体培养基(LB 培养基, 含氨苄西林钠 0.1 g/mL)培养, 37 °C 恒温振荡(190 r/min)培养 16 h, 利用 Apr 抗性进行初步筛选阳性克隆.

(d) 挑取单菌落, 进行液体培养基(LB 培养液)培养, 37 °C 恒温振荡(190 r/min)培养 16 h.

(e) 提取质粒 DNA, 采用碱裂解法.

(f) 插入片段通过 EcoR I 单酶切鉴定, 酶切出的片段大小在 700~ 800 bp 之间的即为阳性克隆. 确定的阳性克隆交由上海博亚生物技术有限公司测序.

2 结果

2.1 基因组 DNA 的提取结果

本实验提取了 7 个个体的基因组 DNA(图 1), 1~ 7 泳道在 23 130 bp 附近处均有较清晰条带, 表明基因组 DNA 提取较为成功, 可进行 PCR 扩增.

2.2 PCR 扩增产物

经 PCR 扩增得到 7 个个体清晰的 CO I 基因片段扩增产物(图 2), 1~ 7 泳道在 700~ 800 bp 之间有清晰条带, 靶序列片段得到大量扩增, DNA 片段浓度升高.

2.3 质粒提取、酶切鉴定结果

经过 EcoR I 单酶切得到 5 个个体清晰的产物片段(图 3), 各个体在 700~ 800 bp 处均有清晰条带, 确定为阳性克隆产物.

2.4 mtCO I 基因片段序列及其各碱基含量

测定出凡纳滨对虾的 mtDNA CO I 基因片段的碱基序列为 709 bp. 利用 BioEdit 软件进行分析得出碱基序列 A、C、G、T 含量分别为 198 bp(27.93%)、136 bp(19.18%)、129 bp(18.19%)、246 bp

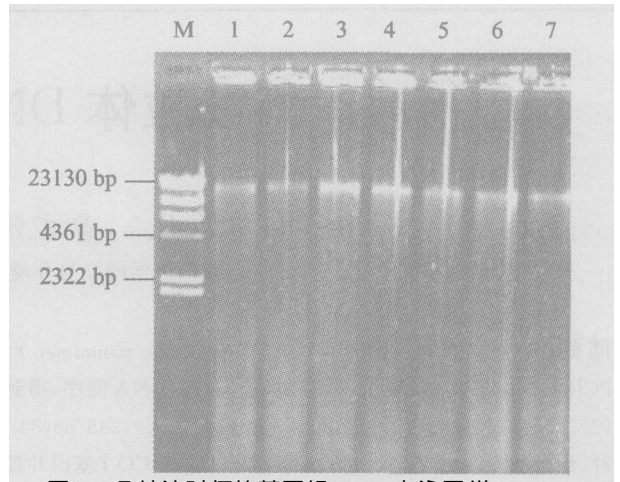


图 1 凡纳滨对虾的基因组 DNA 电泳图谱
DNA 标记: λHind I ; 1~ 7 泳道分别为 1~ 7 号个体

Fig. 1 The genome DNA of *L. vannamei*

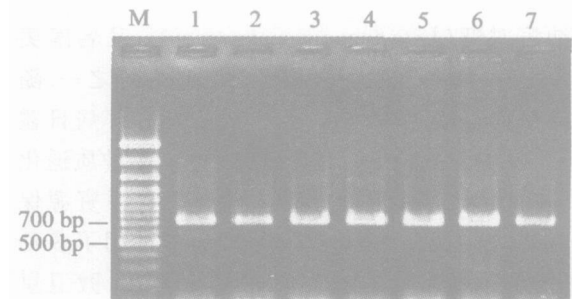


图 2 凡纳滨对虾 CO I 片段的 PCR 扩增产物
DNA 标记: 100 bp; 1~ 7 泳道分别为: 1~ 7 号个体

Fig. 2 The PCR products of CO I gene fragment of *L. vannamei*

(34.70%).

3 讨论

(1) 本实验所得凡纳滨对虾 mtDNA CO I 基因片段碱基序列中 AT 含量为 62.63%, 明显高于 GC 含量, 这与许多研究者在果蝇、虾类、蟹类等的 12S rRNA, 16S rRNA 和 CO I 等基因中观察到的结果相似^[10, 13]. AT 含量高是节肢动物线粒体 DNA 碱基组成中普遍存在的现象.

(2) 引物的选择对于能否成功扩增出目标基因片段非常重要. 本文所用引物(LCO-1490, HCO-2198)已被众多研究甲壳动物 mtCO I 基因片段的学者广泛采用. Bucklin 等^[14]用此引物扩增出了哲水蚤属多种桡足类的 mtCO I 基因片段; Jarman 等^[15]用该引物对 8 种磷虾属种类的 mtCO I 基因片段进行扩增; 孔晓瑜等^[10]也用该引物成功扩增出中华绒螯蟹和日本绒螯

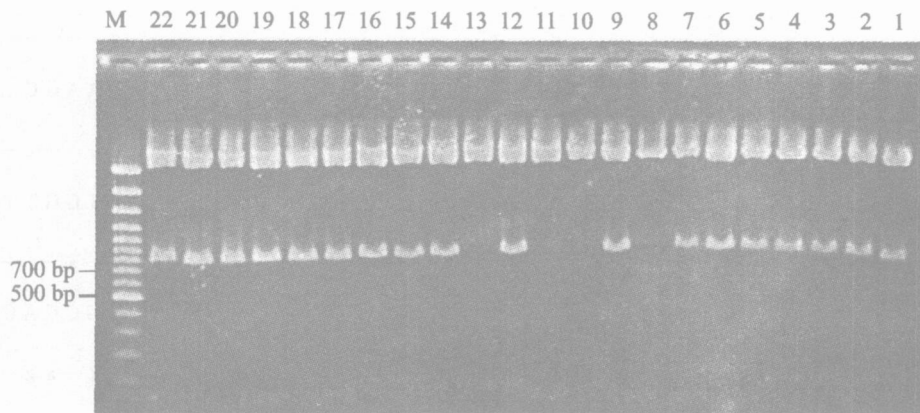


图 3 阳性克隆酶切(EcoR I)鉴定图

DNA 标记: 100 bp; 1~ 5 泳道: 1 号个体; 6~ 10 泳道: 2 号个体; 11~ 14 泳道: 3 号个体; 15~ 18 泳道: 4 号个体; 19~ 22 泳道: 5 号个体

Fig. 3 Recognition of positive clone by endonuclease (EcoR I)

蟹的 mtCO I 基因片段. 与 GenBank 中果蝇的 mtCO I 基因全段序列(NC_001322) 比对分析发现: (a) 本研究得到的序列和果蝇的等长同源序列的同源性为 80.85%; (b) 本研究得到的序列在果蝇的 mtCO I 基因全段序列上始末位点为第 17~ 725 碱基, GenBank 中报道的同种序列(AY264901) 位于第 684~ 1531 碱基之间, 二者有重叠共 41 个碱基(表 1). 二者是由于 PCR 扩增引物不同得到的凡纳滨对虾 mtCO I 基因序列的不同片段. 本实验获得的 mtCO I 序列与 GenBank 中登录的凡纳滨对虾 mtCO I 序列(AY264901) 拼接后可获得长 1 515 bp mtCO I 基因序列. 由上述可知, 本实验条件下获得的 mtCO I 基因片段应来自凡纳滨对虾线粒体 DNA, 同时, 也证明本实验所用引物具有通用性; 由此我们也可结合 GenBank 中的同种序列设计新的引物来获取更完整的 mtCO I 基因序列, 也为今后其它虾类线粒体 CO I 基因的研究提供确

实可行的实验方法.

(3) 凡纳滨对虾线粒体 DNA CO I 基因片段序列测定的意义

mtDNA 序列数据较其他分子遗传方法如同工酶、RFLP、RAPD 等更为准确、可靠, 但 mtDNA 不同区域变异率存在较大差异, 遗传变异分析能力也不同. 一般说来, 12S rRNA 和 16S rRNA 基因在进化上比较保守, 而 CO I 基因为变异性较大的区域, 可直接提供更为丰富的 DNA 多态信息.

本文测定的凡纳滨对虾线粒体 DNA CO I 基因片段序列丰富了 GenBank 报道的同种同源序列, 提供了更多可供研究的基因片段, 为进行凡纳滨对虾种质资源保护和遗传多样性研究提供了新的依据. 今后, 再结合包括 12S rRNA、16S rRNA 等其它线粒体 DNA 基因片段序列的研究, 可以更准确地探讨凡纳滨对虾及其与其它对虾种间的系统进化关系.

表 1 凡纳滨对虾与果蝇线粒体 DNA CO I 基因序列比对结果

Tab. 1 The comparison of mtCO I sequences of *L. vannamei* and *D. yakuba*

L. vaGGTCAACAATCATAAAGATATTGGAAACATTATA	34
L. va-GB	
D. ya	t c g c g a c a a t g g t t a - t t - t - - - - - t - - - - -	50
L. va	CTTTATCTTCGGGGCTTGAGCTGGAATAGTAGGTACCGCTCTTAGACTTA	84
L. va-GB	
D. ya	t - c - t - t - a - - - - - c - - - - - a - a t - t - a - - - a - t	100
L. va	TTATCCGAGCTGAATTAGGTCAACCTGGGAGCCTCATTGGGGATGATCAA	134
L. va-GB	
D. ya	- a - t - - - a - - - - - t - a - a g c a t - a - - - a - - - - -	150
L. va	ATTTATAACGTAGTTGTCAACAGCTCACGCTTTTGTAAATAATTTTTTTAT	184
L. va-GB	
D. ya	- - - - t - a - - - t - t - a - t - - - a - t - - - - -	200
L. va	AGTTATACCAATTATAATTGGAGGATTTGGTAATTGACTAGTACCTTTAA	234

L. va-GB	
D. ya	--- a --- t --- g --- g --- a --- t --- g ---	250
L. va	TGTTAGGTGCTCCAGATATAGCCTTCCCTCGAATGAATAATATAAGCTTC	284
L. va-GB	
D. ya	- a --- a --- t --- c --- a --- a --- a --- a --- t	300
L. va	TGATTATTACCTCCTTCTCTCACATTGCTTTTATCAAGAGGAATGGTTGA	334
L. va-GB	
D. ya	----- c ----- g --- t t --- a t --- a --- g t --- a --- a ---	350
L. va	AAGAGGTGTCGGAACCGGATGAACGGTATACCCTCCTTTATCTGCCAGTA	384
L. va-GB	
D. ya	-- a c --- a c t --- t --- a --- t --- t --- t --- t --- t --- a g ---	400
L. va	TTGCTCACGCTGGAGCTTCAAGTAGATCTTGGAAATTTCTCTCTTCACTTA	434
L. va-GB	
D. ya	- c --- t --- g --- t --- t --- t --- a --- c t --- t --- t --- t ---	450
L. va	GCTGGGGTATCTTCTATTCTGGGAGCAGTAAACTTTATAACAACCTGTAAT	484
L. va-GB	
D. ya	----- a a --- t --- a --- t --- a --- t --- t --- t --- t --- g ---	500
L. va	CAATATACGATCTACAGGAATAACTATAGACCGTATACCTCTATTTGTAT	534
L. va-GB	
D. ya	t --- a --- t --- t --- a t --- a --- t --- t --- t ---	550
L. va	GAGCAGTATTTATCACTGCTTTATTACTACTTTTATCATTACCAGTCTTA	584
L. va-GB	
D. ya	-- t --- g --- t --- t --- t --- t --- t --- a c --- t --- t --- c --- t	600
L. va	GCAGGAGCTATTACTATACTTTTAACAGACCGTAATCTTAACACATCATT	634
L. va-GB	
D. ya	-- c --- t --- a --- a --- t --- a --- t --- t --- t ---	650
L. va	CTTCGACCCAGCAGGAGGAGGAGACCCAGTTTTATATCAACATTTATTC	684
L. va-GB	16
D. ya	t --- t --- t --- t --- t --- t --- t --- a --- g --- c --- t ---	700
L. va	GATTTTTTGGTCCACCCTGAAGTTTA	709
L. va-GB	66
D. ya	----- a t a t t t t a a t t t t a c c g g g a t t t g g a	750
L. va	709
L. va-GB	----- c --- t --- t --- a --- g --- a ---	116
D. ya	a t a a t t t c t c a t a t t a t t a g a c a a g a a t c t g g t a a a a g g a a a c t t t c g g	800
L. va	709
L. va-GB	a a --- a c --- c --- g --- t --- g --- c --- c --- c --- g	166
D. ya	t t c t t t a g g a a t a a t c t a t g c t a t a c t t g c t a t t g g a t t a t t a g g a t t t a	850
L. va	709
L. va-GB	- a --- a --- a --- c --- a --- t --- g --- t --- t --- t --- t ---	216
D. ya	t t g t t t g a g c t c a t c a t a t a t t t a c a g t t g g a a t a g a c g t t g a t a c a c g a	900
L. va	709
L. va-GB	----- a --- a --- a --- g --- c --- t --- t ---	266
D. ya	g c t t a t t t t a c t t c t g c t a c t a t a a t t a t t g c g g t t c c t a c a g g a a t t a a	950
L. va	709
L. va-GB	----- c --- t --- c --- g --- c --- t --- t --- a a c --- a g ---	316
D. ya	a a t t t t t a g a t g a t t a g c t a c t t t a c a t g g a a c t c a a c t t t c t t a t t c t c	1000
L. va	709
L. va-GB	- t --- t --- c --- a a --- t --- g c --- a --- c --- t --- t --- g --- t --- t ---	366
D. ya	c a g c t a t t t t a t g a g c t t t a g g a t t t g t t t t t t a t t c a c a g t * a g g a g g a	1050

L. va	709
L. va- GB	- - - - - c - - t - - - - - c - - - - - t - - - a - - - - c - - - - -	416
D. ya	t t a a c a g g a g t t g t a t t a g c t a a t t c a t c a g t t g a t a t t a t t t t a c a t g a	1100
L. va	709
L. va- GB	- - - a - c - c - - - - - a - - - - - t - - - c - t - - - - -	466
D. ya	t a c t t a t t a t g t a g t a g c t c a t t t c c a c t a c g t t t t a t c a a t a g g a g e c t g	1150
L. va	709
L. va- GB	- - - - - g - - - - t - t - - - - a - g c c - - - - - t - - - t - - - - - g - - g	516
D. ya	t a t t t g c t a t t a t a g a c a g g t t t t a t t c a c t g a t a c c c a t t a t t t a c t g g a	1200
L. va	709
L. va- GB	c - t - c - - - - c c c - - g - a - - - - - t - - c - - c - g - - - a - c - -	566
D. ya	t t g a c a t t a a a t a a t a a a t g g t t a a a a g t c a a t t t a t t a t t a t g t t t a t	1250
L. va	709
L. va- GB	- - - - - a - t - - - - c - - - - - c - - - - - t c - t a a t - - -	616
D. ya	t g g a g t a a a t t t a a c a t t t t t c c c c c a a c a t t t t t t a g g a t t a g c a g g a a	1300
L. va	709
L. va- GB	- - - - - a - c - - - - c - - - - a - - - - - t t - a g - - - - -	666
D. ya	t a c c t c g a c g t t a t t c a g a t t a c c c t g a t g c t t a c a c t a c a t g a a a t g t t	1350
L. va	709
L. va- GB	- - a - - t - c - - - - a - - - - g g - a - - c e - g a - t - c c g - g - - g g c - - g -	716
D. ya	g t g t c t a c t a t t g g g t c a a c t a t t t c a t t a t t a g g a a t t t t a t t t t t t t	1400
L. va	709
L. va- GB	t a t a - c g - e - - - - g c a - - a c t g - g c t - g - c t - - g - - t - t - c	766
D. ya	c t a t a t t a t t t g a g a a a g t t t a g t g t c t c a a c g a c a a g t a a t t t a t c c a a	1450
L. va	709
L. va- GB	- a t t c - - c c a a - t - a - c - - - - c - g - t - c c t t - a - - - - a - t	816
D. ya	t t c a a t t a a a t t c a t c t a t t g a a t g a t a t c a a a a t a c a c c c c a g e t g a a	1500
L. va	709
L. va- GB	- - - - - t - - - a t a - - a - t - - c t - a a - e - t -	847
D. ya	c a t a g a t a t t c t g a a t t a c c a c t t t t a a c a a a t t a a	1536

L. va: 凡纳滨对虾 mtCO I 基因片断序列; L. va-GB: GenBank 报道的同种序列; D. ya: 果蝇 mtCO I 基因全序列; 比对部分中, L. va 序列方框部分为引物位置, . 和 - 分别表示无相应碱基和有相同碱基, 阴影部分为 L. va 和 L. va-GB 序列中重叠部分.
 注: 本实验得到的凡纳滨对虾 mtDNA CO I 基因序列已登录 GenBank 数据库, 索引号: AY 781297

参考文献:

[1] 邱高峰, 楼允东, 顾功超. 南美白对虾染色体的研究[J]. 上海水产大学学报, 1997, 6(1): 50- 53.

[2] 朱春华, 李广丽, 黄荣莲. 凡纳对虾个体发育早期的同工酶研究[J]. 热带海洋学报, 2004, 23 (1): 51- 56.

[3] 李锋, 刘楚吾, 林继辉. 两个凡纳滨对虾亲本群体的 RAPD 研究[J]. 湛江海洋大学学报, 2003, 23 (4): 1- 5.

[4] 沈琪, 任春华, 胡超群, 等. 凡纳对虾、细角对虾和斑节对虾的 RAPD 标记研究[J]. 热带海洋学报, 2002, 21(4): 45- 48.

[5] Joseph C Bagshaw, Michael A Buckholt. A novel satellite-microsatellite combination in the genome of the marine shrimp, *Penaeus vannamei* [J]. Gene, 1997, 184: 211- 214

[6] Scott C France, Tachino N, Thomas F Duda, et al. Pal-umbi. intraspecific genetic diversity in the marine shrimp *Penaeus vannamei* multiple polymorphic elongation factor - 1 α Loci revealed by intron sequencing[J]. Mar. Biotechnol., 1999, 1: 261- 268.

[7] 庆宁, 林岳光. 墨吉对虾 *Penaeus merguensis* 线粒体 16SrRNA 基因序列分析[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2002, 3: 63- 67.

[8] 邱高峰, 常林瑞, 徐巧婷, 等. 中国对虾 16SrRNA 基因序列多态性的研究[J]. 动物学研究, 2000, 21(1): 35- 40.

[9] 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, 24(5): 412- 416.

[10] 孔晓瑜, 喻子牛, 刘亚军, 等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 CO I 基因片段的序列比较研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2001, 31(6): 861- 866.

- [11] Gao Tianxiang, Li Jian, Wang Qingyin, et al. Partial sequence analysis of mitochondrial CO I gene of the Chinese shrimp, *Fenneropenaeus Chinensis* [J]. Journal of Ocean University of Qingdao, 2003, 2(2): 167- 170.
- [12] 方李宏, 薛俊增, 董双林. 甲壳动物线立体 DNA 的研究 [J]. 海洋湖沼通报, 2004, 2: 59- 65.
- [13] Howland D E, Hewitt G M. Phylogeny of the Coleoptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data [J]. Insect Mol. Biol., 1995, 4: 203- 215.
- [14] Bucklin A, Guarnieri M, Hill R S, et al. Taxonomic and systematic assessment of planktonic copepods using mitochondrial CO I sequence variation and competitive species-specific PCR [J]. Hydrobiologia, 1999, 401: 239- 254.
- [15] Jarman S N, Elliott N G, Nicol S, et al. Molecular phylogenetics of circumglobal Euphausia species (Euphausiacea; Crustacea) [J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 2000, 57 (3): 51- 58.

Fragment Sequence of Mitochondrial DNA CO I Gene of *Litopenaeus vannamei*

ZHENG Lian-ming, LIN Yuan-shao^{*}, CAO Wen-qing,

FANG Lv-ping, ZHOU Mei-yu, WANG Gu-zhong

(College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: *Litopenaeus vannamei* which belong to the family Penaeidae (Crustacea: Decapoda: Dendrobranchiata) is the major species of shrimp farmed in aquaculture worldwide. With the development of the breeding scope, this cultured penaeus had suffered an epidemical disease which caused heavy mortality because of the deteriorating water environment, which causes the genetic depression and the decrease of genetic biodiversity. So, the study on the protection of the germplasm resource and the community genetic structure of the *L. vannamei* has aroused the researcher's attention. In recent years, mitochondrial genome sequence and structure are widely used to provide information on phylogenetic relationships and on the genetic structure of populations and patterns of gene flow of the economical organism. Recently, analyses of penaeid mitochondrial genetics have been carried out using RFLP analysis and single-gene sequence analysis. In our research, mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (CO I) gene fragment of *L. vannamei* from Aoguanmariculture breeding field in Xiamen was successfully amplified via PCR. The PCR products were ligated into pGEM-T Easy Vector (Promega Co.), cloned and sequenced. 709 bp sequences of mtCO I were obtained. The contents of A, C, G and T were 198 bp(27. 93%)、136 bp(19. 18%)、129 bp(18. 19%)、246 bp(34. 70%), respectively. A result was observed that the sequence we obtained and the same region of the sequence from GenBank (accession no. AY264901) were both a part of mtCO I sequence of *L. vannamei*, and they have a superposition of 41 bp of nucleotides and could link to be a 1515bp sequence, which prove the sequence we have got is really from mitochondrial genome of *L. vannamei*.

Key words: *Litopenaeus vannamei*; mtCO I; sequence