

河豚鱼Cyt b基因部分DNA序列分析与应用

陈文炳¹, 林少华^{1,2}, 邵碧英¹, 赵晨³, 江树勋¹, 闫诚¹, 郑晶¹

(1.福建出入境检验检疫局技术中心, 福建 福州 350001; 2.漳州片仔癀药业股份有限公司,

福建 漳州 363000; 3.福建省产品质量检验研究院, 福建 福州 350001)

摘要: 建立河豚鱼物种DNA鉴别技术, 根据GenBank公布的河豚鱼细胞色素b基因序列, 应用软件Primer Premier 5.00版设计上游引物HT1-F与下游HT1-R, 对3属9种福建省搜集的常见的河豚鱼与2种未知物种名称且外观无法进行形态学判断的河豚鱼样品的细胞色素b基因序列中的部分片段进行PCR扩增, PCR产物通过琼脂糖凝胶电泳确证、纯化后, 进行DNA碱基序列测定, 序列长度均为423bp。应用DNA MANN软件进行样品间DNA序列同源性比对分析, 建立样品间系统关系树状图, 供试11个样品被划分为3个类群, 第I组与第II组之间的同源率为89%, 这2组与第III组之间的同源率为85%。根据序列同源性分析结果, 可推测2个未知种名的样品为腹刺鲀属或东方鲀属。

关键词: 河豚鱼; PCR检测; DNA测序; 物种鉴定

Partial DNA Sequence Analysis of Cyt b Gene in Puffer Fish

CHEN Wen-bing¹, LIN Shao-hua^{1,2}, SHAO Bi-ying¹, ZHAO Chen³, JIANG Shu-xun¹,

YAN Cheng¹, ZHENG Jing¹

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

2. Zhangzhou Pientzehuang Pharmaceutical Co. Ltd., Zhangzhou 363000, China;

3. Fujian Inspection and Research Institute for Product Quality, Fuzhou 350001, China)

Abstract: According to the sequence of *Cytochrome b* in puffer fish published in GenBank, a puffer fish-specific primer pair of HT1-F and HT1-R was designed using Primer Premier 5.00 version for establishing a DNA based method to identify puffer fish species. Partial fragments of *Cytochrome b* gene in puffer fish samples including 9 major species from 3 genera and 2 unknown puffer fish samples harvested from Fujian province were amplified by PCR. The PCR products confirmed by agarose electrophoresis were used for sequencing. The length of the obtained DNA fragments was 423 bp in all samples. The homology of DNA sequences among these samples was analyzed using DNA MAN software, and a phylogenetic tree among these samples was also established. Eleven samples were divided into 3 groups, 89% of homology rate was observed between groups I and II; 85% of homology rate was observed between two groups and group III. In addition, 2 unknown puffer fish samples were probably from *Gastrophysus* or *Takifugu* genus. Collectively, these results provide a reference for the application of DNA sequencing technology to identify puffer fish components and its species present in processed food stuff.

Key words: puffer fish; PCR detection; DNA sequencing; species identification

中图分类号: S917.4; Q78

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2012)20-0227-06

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)技术扩增获得的特异性基因片段(DNA)碱基序列可作为食品动植物物种或品种的特异性分子标记^[1-3], 把目标生物与其他物种或品种区分开来, 该技术有着特异性强、灵敏度高、简便、快速和对标本的纯度要求低等优点。自1980年发明以来, 该技术在国内外已被广泛应用于分子水平的物种鉴别、刑事个体鉴定、疾病诊断、食品微生物检测、转基因产品检测等领域。基于PCR技术, 检测食品中是否含有某种鱼成分, 在国内外已得到广

泛应用。Rehbein等^[4]采用单链构象多态性(single-strand conformation polymorphism, SSCP)方法等对罐装金枪鱼进行PCR分类鉴定研究, 即使是经过深加工的金枪鱼, DNA已经遭到严重破坏, 也能通过其细胞色素b基因(Cyt b)的短片段进行PCR鉴定, 从而得到准确的结果。LIN Wenfeng等^[5]利用多重PCR技术检测鲑鱼成分。从理论上来说, 运用PCR技术检测食品中河豚鱼成分是切实可行的。陈超等^[6]应用RAPD标记对东方鲀属河豚鱼进行种类鉴别及其聚类分析, 利用RAPD技术对红鳍东方鲀、假

收稿日期: 2012-04-10

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局科技项目(2008IK175)

作者简介: 陈文炳(1962—), 男, 研究员, 博士, 主要从事农产品、食品分子生物学检测技术研究。E-mail: 621213wbc@163.com

睛东方鲀、暗纹东方鲀和从日本引进的红鳍东方鲀4个种进行了遗传标记鉴别研究。邵爱华等^[7]对暗纹东方鲀(*Takifugu fasciatus*)进行mtDNA的分离纯化及其Cyt b基因的分子克隆,首次克隆了暗纹东方鲀Cyt b基因及其侧翼tRNA基因,并进行序列分析,根据暗纹东方鲀与其他13种鱼的Cyt b基因序列同源性所建立的进化树比较,结果与传统的分类地位基本吻合。邵爱华等^[8-13]对暗纹东方鲀线粒体细胞色素氧化酶I、II、III三种亚基(Co I、Co II、Co III)、16S rRNA基因及其侧翼tRNA基因等进行了克隆与序列分析。结果表明,这些基因较适合于研究鲀形目鱼类中属间、不同种间以及分化较早的种间、科级、亚目级的系统发育分析,研究结果有助于进一步利用线粒体基因研究分析鲀形目鱼类系统进化关系。邵爱华等^[14]还对暗纹东方鲀线粒体ATP合酶Fo亚基8(ATPase8)和亚基6(ATPase6)的序列进行克隆与序列分析。但上述研究都只局限于东方鲀属内。陈文炳等^[15]优化并建立了河豚鱼成分的PCR检测方法,对3个属8个物种的河豚鱼成分进行PCR方法检测限与检出率实验。

本实验在河豚鱼的线粒体Cyt b基因部分DNA的PCR产物测序基础上,进行DNA序列同源性比对分析,可以验证PCR检测结果的准确性,剔除假阳性的结果,起到很好的确证作用。同时建立样品间的系统关系树,探讨样品间的亲缘关系,为DNA序列测试及同源性分析技术在混入加工食品中的河豚鱼成分及其物种鉴定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

表1 11个河豚鱼供试样品
Table 1 Eleven puffer fish samples tested in this study

序号	中文学名	拉丁学名	属名	来源
1	黑鳃兔头鲀	<i>Lagocephalus inermis</i>	兔头鲀属	福建莆田
2	兔头鲀	<i>Lagocephalus lagocephalus</i>	兔头鲀属	福建莆田
3	暗纹东方鲀	<i>Takifugu fasciatus</i>	东方鲀属	福建莆田
4	黄鳍东方鲀	<i>Takifugu xanthopterus</i>	东方鲀属	福建莆田
5	棕斑腹刺鲀	<i>Gastrophysus spadiceus</i>	腹刺鲀属	福建莆田
6	红鳍东方鲀	<i>Takifugu rubripes</i>	东方鲀属	福建莆田
7	暗鳍腹刺鲀	<i>Gastrophysus gloveri</i>	腹刺鲀属	福建莆田
8	月腹刺鲀	<i>Gastrophysus lunaris</i>	腹刺鲀属	福建厦门
9	横纹东方鲀	<i>Takifugu oblongus</i>	东方鲀属	福建莆田
10	河豚鱼鲜肉	未知	未详	福州出口产品
11	河豚鱼干	未知	未详	福州长乐农贸市场

9个已知物种名称的河豚鱼样品与2个未知样品(表1)搜集自福建省厦门、莆田、福州等地水产养殖场与农贸市场。

1.2 试剂与仪器

CTAB、Triton-X 100、dNTP 上海博亚生物技术有限公司; Taq DNA 聚合酶、10×PCR缓冲液、MgCl₂(25mmol/L) 美国Promega公司; 动物源性植物饲料基因组DNA提取试剂盒(离心柱型)、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。

Minispin台式离心机 德国Eppendorf公司; Ultrospec 1100 pro核酸蛋白分析仪 美国Amersham公司; T-Gradient梯度PCR仪 德国Biometra公司; Power Pac 1000电泳仪 BIO-RAD公司; Gel Logic 100凝胶成像仪 美国Kodak公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA提取与PCR扩增

参照文献[15]优化确立的DNA提取CTAB方法与PCR引物、扩增体系和温度程序,进行DNA提取、PCR扩增、PCR产物电泳。

1.3.2 DNA碱基序列测定

用文献[15]筛选的HT-1引物(HT-1F: 5'-TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGG-3', HT-1R: 5'-GGGAAGGACATAGCCCACGA-3')对所有收集到的共11个河豚鱼(表1)中的9个种与未知名的河豚鱼干及河豚鱼鲜肉2个样品进行PCR扩增。PCR扩增产物委托上海生工生物技术有限公司进行克隆、测序,每个样品重复3次,选用最有代表性的序列。得到的结果用DNAMAN进行整理分析,以.seq格式输出。

1.3.3 序列比对

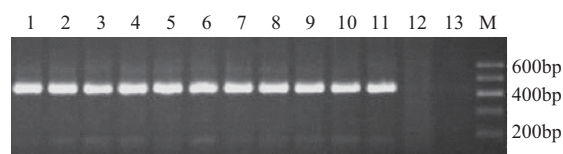
本研究利用DNAMAN对各个样品所测序列进行序列比对,比对结果以MASED Document/DNAMAN1格式输出。

1.3.4 数据处理

实验数据经DNAMAN 5.2.2版分析软件处理。

2 结果与分析

2.1 PCR扩增



1.黑鳃兔头鲀; 2.兔头鲀; 3.暗纹东方鲀; 4.黄鳍东方鲀; 5.棕斑腹刺鲀; 6.红鳍东方鲀; 7.暗鳍腹刺鲀; 8.月腹刺鲀; 9.横纹东方鲀; 10.河豚鱼鲜肉; 11.河豚鱼干; 12.阴性对照(非河豚鱼类); 13.空白对照(ddH₂O); M. DNA Marker I。

图1 引物HT-1对河豚鱼的PCR扩增结果

Fig.1 PCR amplification of puffer fish using primer HT-1

9种河豚鱼样品与2种未知学名的河豚鱼干与加工过

的河豚鱼肉样品的线粒体DNA的PCR扩增结果如图1。表明供试11个样品的HT-1引物的PCR扩增成功, PCR产物用于序列测定。

2.2 PCR产物测序结果

2.2.1 各样品序列的碱基基本信息

提供各样品PCR扩增产物3个重复, 经过克隆、测序, 根据两端引物序列, 进行整理, 各样品测序结果如有差异, 则选取有代表性的序列。每个样品序列的基本信息统计分析结果见表2。

从表2可以看出, 不同物种的河豚鱼的PCR扩增产物长度都是423bp。但是, 从A、C、G、T四种碱基的含量来看, 所有序列G的含量明显偏少, 只有15.6%~16.3%, C含量最高, 在29.8%~32.6%, 其次是A与T, 含量在25.3%~27.2%之间。从各样品的A、C、G、T四种碱基含量来看, 兔头鲈属中的黑腮兔头鲈与兔头鲈相同, 都是25.8%、32.6%、15.6%、26.0%, 东方鲀属暗纹东方鲀、黄鳍东方鲀、红鳍东方鲀和腹刺鲀属的月腹刺鲀、棕斑腹刺鲀的A、C、G、T四种碱基含量都分别为27.0%、29.8%、16.1%、27.2%, 东方鲀属的横纹东方鲀与腹刺鲀属的暗纹腹刺鲀的4种碱基含量都分别为25.3%、31.7%、16.3%、26.7%。

2.2.2 PCR产物DNA序列测定

供试河豚鱼样品1~11 PCR产物的DNA序列如下(划线部分为PCR扩增引物HT-1F与HT-1R的位置):

1) 黑腮兔头鲈(*L. inermis*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA

CGCAAAACCCACCCCTCATAAAAATCGTAAACGAC
ATAGTCATCGATCTACCAACCCCTCAAATATCTCAG
CATGATGAACTTCGGCTCACTACTAGGACTCTGCCT
CATTGCGCAAATCCTTACAGGACTATTCTAGCCATG
CATTATACTTCTGACATTGCCACGGCCTTCTCCTCGG
TCGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTATGGCTGACT
AATCCGCAACCTGCACGCAAACGGAGCCTCCTTCTT
CTTCATTTGTATCTACCTTCACATCGGACGCGGCCTAT
ACTATGGCTCCTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACA
TTGGCGTAATCCTTCTGTTCTAGTTATAGCCACTGCT
TTCGTGGGCTATGTCCTTCCC

2) 兔头鲈(*L. lagocephalus*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAAACCCACCCCTCATAAAAATCGTAAACGAC
ATAGTCATCGATCTACCAACCCCTCAAATATCTCAG
CATGATGAACTTCGGCTCACTACTGGGACTCTGCCT
CATTGCGCAAATCCTTACAGGACTATTCTAGCCATG
CATTATACTTCTGACATTGCCACGGCCTTCTCCTCAG
TCGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTATGGCTGACT
AATCCGCAACCTGCACGCAAACGGAGCCTCCTTCTT
CTTCATTTGTATCTACCTTCACATCGGACGCGGCCTAT
ACTATGGCTCCTACCTTAACAAAGAAACCTGAAACA
TTGGCGTAATCCTTCTGTTCTAGTTATAGCCACTGCT
TTCGTGGGCTATGTCCTTCCC

3) 暗纹东方鲀(*T. fasciatus*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA

表2 PCR产物碱基序列的基本信息

Table 2 Basic sequence information of PCR products

序号	样品名称	A个数 (百分比)	C个数 (百分比)	G个数 (百分比)	T个数 (百分比)	碱基个数/bp
1	黑腮兔头鲈 (<i>L. inermis</i>)	109(25.8%)	138(32.6%)	66(15.6%)	110(26.0%)	423
2	兔头鲈 (<i>L. lagocephalus</i>)	109(25.8%)	138(32.6%)	66(15.6%)	110(26.0%)	423
3	暗纹东方鲀 (<i>T. fasciatus</i>)	114(27.0%)	126(29.8%)	68(16.1%)	115(27.2%)	423
4	黄鳍东方鲀 (<i>T. xanthopterus</i>)	114(27.0%)	126(29.8%)	68(16.1%)	115(27.2%)	423
5	棕斑腹刺鲀 (<i>G. spadiceus</i>)	114(27.0%)	126(29.8%)	68(16.1%)	115(27.2%)	423
6	红鳍东方鲀 (<i>T. rubripes</i>)	114(27.0%)	126(29.8%)	68(16.1%)	115(27.2%)	423
7	暗鳍腹刺鲀 (<i>G. gloveri</i>)	107(25.3%)	134(31.7%)	69(16.3%)	113(26.7%)	423
8	月腹刺鲀 (<i>G. lunaris</i>)	114(27.0%)	126(29.8%)	68(16.1%)	115(27.2%)	423
9	横纹东方鲀 (<i>T. oblongus</i>)	107(25.3%)	134(31.7%)	69(16.3%)	113(26.7%)	423
10	河豚鱼鲜肉	114(27.0%)	126(29.8%)	68(16.1%)	115(27.2%)	423
11	河豚鱼干	114(27.0%)	126(29.8%)	68(16.1%)	115(27.2%)	423

注: 括号内百分比表示该种碱基在序列中所占比例。

CGCAAATCGCATCCCCTCATGAAAATTGTAAACGACA
TAGTCATTGATTTACCAACCCCCTCAAACATCTCTGC
ATGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGACTATGCCTT
ATCGCACAAATCCTAACAGGACTCTTCCTGGCAATAC
ACTACACCTCTGATATTGCCACGGCCTTCTCCTCAGT
CGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTACGGCTGACT
AATTCGAAACCTGCATGCAAATGGAGCCTCCTTCTTC
TTCATTTGTATTTACCTTCATATTGGACGTGGCCTATA
CTATGGCTCATTCCCTTAACAAAGAAACATGAAACGTA
GGAGTAATCCTCCTGCTCTTAGTAATAGCCACAGCCT
TCGTGGGCTATGTCCTTCCC

4) 黄鳍东方鲀(*T. xanthopterus*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAATCGCATCCCCTCATGAAAATTGTAAACGACA
TAGTCATTGATTTACCAACCCCCTCAAACATCTCTGC
ATGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGACTATGCCTT
ATCGCACAAATCCTAACAGGACTCTTCCTGGCAATAC
ACTACACCTCTGATATTGCCACGGCCTTCTCCTCAGT
CGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTACGGCTGACT
AATTCGAAACCTGCATGCAAATGGAGCCTCCTTCTTC
TTCATTTGTATTTACCTTCATATTGGACGTGGCCTATA
CTATGGCTCATTCCCTTAACAAAGAAACATGAAACGTA
GGAGTAATCCTCCTGCTCTTAGTAATAGCCACAGCCT
TCGTGGGCTATGTCCTTCCC

5) 棕斑腹刺鲀(*G. spadiceus*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAATCGCATCCCCTCATGAAAATTGTAAACGACA
TAGTCATTGATTTACCAACCCCCTCAAACATCTCTGC
ATGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGACTATGCCTT
ATCGCACAAATCCTAACAGGACTCTTCCTGGCAATAC
ACTACACCTCTGATATTGCCACGGCCTTCTCCTCAGT
CGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTACGGCTGACT
AATTCGAAACCTGCATGCAAATGGAGCCTCCTTCTTC
TTCATTTGTATTTACCTTCATATTGGACGTGGCCTATA
CTATGGCTCATTCCCTTAACAAAGAAACATGAAACGTA
GGAGTAATCCTCCTGCTCTTAGTAATAGCCACAGCCT
TCGTGGGCTATGTCCTTCCC

6) 红鳍东方鲀(*T. rubripes*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAATCGCATCCCCTCATGAAAATTGTAAACGAC
ATAGTCATTGATTTACCAACCCCCTCAAACATCTCTG
CATGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGACTATGCCT
TATCGCACAAATCCTAACAGGACTCTTCCTGGCAATA
CACTACACCTCTGATATTGCCACGGCCTTCTCCTCAG
TCGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTACGGCTGAC
TAATTCGAAACCTGCACGCAAATGGAGCCTCCTTCTT
CTTCATTTGTATTTACCTTCATATTGGACGTGGCCTAT

ACTATGGCTCATTCCCTTAACAAAGAAACATGAAACGT
AGGAGTAATCCTCCTGCTCTTAGTAATAGCCACAGCC
TTTCGTGGGCTATGTCCTTCCC

7) 暗鳍腹刺鲀(*G. gloveri*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAGTCCCATCCCCTTATGAAAATTACTAATGACA
TAGTAATTGACCTCCCCACCCCTTCGAATATTTCCGC
CTGGTGAAACTTCGGCTCACTATTAGGACTATGTCTT
ATCGCACAAATCCTAACAGGATTATTCCCTAGCCATAC
ACTACACCTCTGACATCGCTACAGCCTTTTCCTCAGT
CACCCACATTTGCCGAGACGTAAGCCACGGATGACT
AATTCGAAACCTCCACGCAAACGGAGCCTCTTTCTT
CTTCATCTGTATCTACCTCCACATTGGGCGCGGCCTG
TACTACGGCTCCTTTCTCAACAAGGAAACCTGAAAC
GTCGGAGTAGTCCTACTGCTTTTAGTTATAGCCACAG
CCTTCGTGGGCTATGTCCTTCCC

8) 月腹刺鲀(*G. lunaris*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAATCGCATCCCCTCATGAAAATTGTAAACGACA
TAGTCATTGATTTACCAACCCCCTCAAACATCTCTGC
ATGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGACTATGCCTT
ATCGCACAAATCCTAACAGGACTCTTCCTGGCAATAC
ACTACACCTCTGATATTGCCACGGCCTTCTCCTCAGT
CGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTACGGCTGACT
AATTCGAAACCTGCATGCAAATGGAGCCTCCTTCTTC
TTCATTTGTATTTACCTTCATATTGGACGTGGCCTATA
CTATGGCTCATTCCCTTAACAAAGAAACATGAAACGTA
GGAGTAATCCTCCTGCTCTTAGTAATAGCCACAGCCT
TCGTGGGCTATGTCCTTCCC

9) 横纹东方鲀(*T. oblongus*)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAGTCCCATCCCCTTATGAAAATTACTAATGACA
TAGTAATTGACCTCCCCACCCCTTCGAATATTTCCGC
CTGGTGAAACTTCGGCTCACTATTAGGACTATGTCTT
ATCGCACAAATCCTAACAGGATTATTCCCTAGCCATAC
ACTACACCTCTGACATCGCTACAGCCTTTTCCTCAGT
CACCCACATTTGCCGAGACGTAAGCCACGGATGACT
AATTCGAAACCTCCACGCAAACGGAGCCTCTTTCTT
CTTCATCTGTATCTACCTCCACATTGGGCGCGGCCTG
TACTACGGCTCCTTTCTCAACAAGGAAACCTGAAAC
GTCGGAGTAGTCCTACTGCTTTTAGTTATAGCCACAG
CCTTCGTGGGCTATGTCCTTCCC

10) 河豚鱼鲜肉(未知学名)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAATCGCATCCCCTCATGAAAATTGTAAACGACA
TAGTCATTGATTTACCAACCCCCTCAAACATCTCTGC
ATGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGACTATGCCTT

ATCGCACAAATCCTAACAGGACTCTTCCTGGCAATAC
ACTACACCTCTGATATTGCCACGGCCTTCTCCTCAGT
CGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTACGGCTGACT
AATTGCAAACCTGCATGCAAATGGAGCCTCCTTCTTC
TTCATTTGTATTTACCTTCATATTGGACGTGGCCTATA
CTATGGCTCATTTCCTTAACAAAGAAACATGAAACGTA
GGAGTAATCCTCCTGCTCTTAGTAATAGCCACAGCCT
TCGTGGGCTATGTCCTTCCC

11) 河豚鱼干(未知学名)

TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTA
CGCAAATCGCATCCCCTCATGAAAATTGTAAACGACA
TAGTCATTGATTTACCAACCCCTCAAACATCTCTGC
ATGGTGAAACTTTGGCTCACTACTAGGACTATGCCTT
ATCGCACAAATCCTAACAGGACTCTTCCTGGCAATAC
ACTACACCTCTGATATTGCCACGGCCTTCTCCTCAGT
CGCCCACATCTGCCGAGATGTCAACTACGGCTGACT
AATTGCAAACCTGCATGCAAATGGAGCCTCCTTCTTC
TTCATTTGTATTTACCTTCATATTGGACGTGGCCTATA
CTATGGCTCATTTCCTTAACAAAGAAACATGAAACGTA
GGAGTAATCCTCCTGCTCTTAGTAATAGCCACAGCCT
TCGTGGGCTATGTCCTTCCC

2.3 序列比对

经过DNAMAN软件比对,发现尽管所有供试样品的来源于四齿鲀科(*Tetraodontidae*)的3个不同的属,但DNAMAN软件分析结果显示11个PCR扩增片段的序列整体平均同源率为95.49%,可见供试样品的线粒体Cyt b基因碱基序列的同源率较高。比对结果以MASED Document/DNAMAN1格式输出如下。

```

1  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
2  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
3  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
4  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
5  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
6  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
7  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
8  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
9  TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
10 TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
11 TGCCTCAACTACAAGAACCTAATGGCCAGCCTACGCAATGCAACCCCTATGAAATC 60
Conse tgctcaactacaagaacctaatggccagcctacgcaa tgc aacccct at gaaat

```

```

1  GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
2  GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
3  GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
4  GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
5  GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
6  GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
7  ACTAATGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
8  GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
9  ACTAATGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
10 GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
11 GTAAAGACATAGTATGATTCACACCCCTGAAATGATGAGTGTGAAACTTC 120
Conse nuaa gacatagt at ga t cc acccc to aa at to ge tg tgaacct

```

```

1  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
2  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
3  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
4  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
5  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
6  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
7  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
8  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
9  GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
10 GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
11 GGCTCACTAGTGGACTTGGCTTATGGCAAACTCTACAGGATTTCTCTGGCATG 180
Conse ggctcaactat ggact tg ct at gc aaaaactc acagga t tctct gc at

```

```

1  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
2  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
3  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
4  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
5  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
6  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
7  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
8  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
9  CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
10 CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
11 CATTAACTCTGACATGGCACGGCTTTCTCTGGTGGCCACATGTGCCGAGATG 240
Conse cauta ac tctga at gc ac gcctt tctct gtc cccacat tggcgaga gt

```

```

1  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
2  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
3  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
4  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
5  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
6  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
7  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
8  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
9  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
10 AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
11 AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 300
Conse aasca gg tgactaat cg aacct ca gcaaa ggagcctc tcttcttcat tgt

```

```

1  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
2  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
3  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
4  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
5  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
6  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
7  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
8  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
9  ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
10 ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
11 ATTACCTTCATATGGCCGGGCTTACTAGGCTCTTCTTAAACAAGAACTGA 360
Conse atutacct ca at gg cg ggcct tacta ggctc t ct aasca gaact tga

```

```

1  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
2  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
3  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
4  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
5  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
6  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
7  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
8  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
9  AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
10 AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
11 AACATGGGTGACTAATCGCAACCTCGACCAAGGAGGCTCTTCTTTCATTTGT 420
Conse aasct gg gta tect ctg t tagt atagccac gc tctgtgggctatgtctt

```

```

1  CCC 423
2  CCC 423
3  CCC 423
4  CCC 423
5  CCC 423
6  CCC 423
7  CCC 423
8  CCC 423
9  CCC 423
10 CCC 423
11 CCC 423
Conse cccus

```

1~11. 样品号对应表1; Conse指相同的序列。

图2 11个样品的PCR产物序列比对图

Fig.2 Sequence comparison of PCR amplicons from 11 samples

2.4 Cyt b基因部分DNA序列同源性关系分析

11个样品序列经DNAMAN软件的同源性比对分析,获得同源性矩阵(表3)与同源树(图3),聚类结果表明:11个样品序列可划分为3组,第I组的1号与2号样品(表3,下同)同属兔头鲀属,二者同源率为100%。第II组包括3、4、5、6、8、10、11号样品,它们之间的同源率也是100%,其中5号与8号为腹刺鲀属,其他都属于东方鲀属,10号与11号样品是未知种属名称的河豚鱼肉和河豚鱼干,根据同源性分析结果,可推测这2个样品为腹刺鲀属或东方鲀属。第III组中的7号样品暗鳍腹刺鲀与9号样品横纹东方鲀之间的同源率为100%。第I组与第II组之间的同源率为89%,两组与第III组之间的同源率为85%。

表3 11个样品的序列同源性矩阵
Table 3 Phylogenetic tree based on sequence homology among 11 samples

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	%
1	100.0											
2	99.5	100.0										
3	89.1	89.1	100.0									
4	89.1	89.1	100.0	100.0								
5	89.1	89.1	100.0	100.0	100.0							
6	89.1	89.1	100.0	100.0	100.0	100.0						
7	83.5	83.5	86.1	86.1	86.1	86.1	100.0					
8	89.1	89.1	100.0	100.0	100.0	100.0	86.1	100.0				
9	83.5	83.5	86.1	86.1	86.1	86.1	100.0	86.1	100.0			
10	89.1	89.1	100.0	100.0	100.0	100.0	86.1	100.0	86.1	100.0		
11	89.1	89.1	100.0	100.0	100.0	100.0	86.1	100.0	86.1	100.0	100.0	

注：1~11. 对应表1中样品。

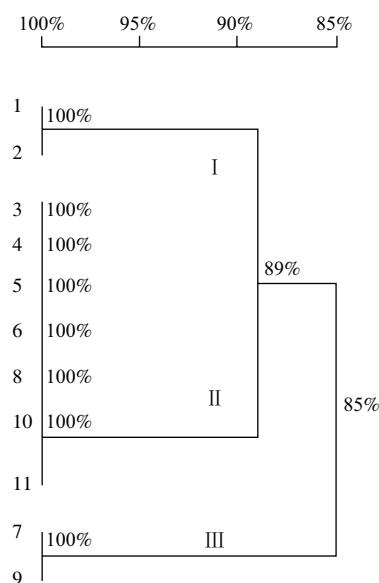


图3 11个样品的序列同源树
Fig.3 Sequence homology among 11 samples

3 结论与讨论

运用生物信息学专业软件DNAMAN, 比对分析河豚鱼PCR扩增产物序列。11个样品序列经DNAMAN软件的同源性分析, 获得同源性矩阵与同源树, 把11个样品序列划分为3组, 各组内样品间同源率均为100%, 第I组与第II组之间的同源率为89%, 两组整体与第III组之间的同源率为85%。应用同源率分析推断2个未知种属名称的河豚鱼样品可能所属的分类单位(属)。该研究结果能够有效排除河豚鱼PCR检测结果假阳性现象的发生, 为将来该PCR检测方法在混入水产品的河豚鱼成分鉴定中的推广应用, 提供科学依据。但是, 本研究结果发现基于序列同源性分析的类群划分与形态学分类不完全吻合, 可能是形态学分类存在瑕疵, 也可能是Cyt b序列保守, 一定种群内遗传变异较小, 加上所获得基因信息有限,

因而还无法具体鉴定到河豚鱼的物种。如要判别到具体的物种, 有待通过线粒体的其他基因如Co I、Co II、Co III和细胞核基因ITS、5S/16S/18S/28S rDNA等片段的PCR扩增与测序, 建立DNA条形码数据库等, 加以组合应用而达到鉴别河豚鱼物种成分的目的。

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] 陈文炳, 江树勋, 邵碧英, 等. 常见食用菌中转基因成分定性PCR检测方法的建立[J]. 食品科学, 2004, 25(10): 206-210.
- [3] 陈文炳, 邵碧英, 江树勋, 等. 食品中若干植物源性成分的PCR检测[J]. 食品科学, 2006, 27(11): 404-408.
- [4] REHBEIN H, KRESS G, SCHMIDT T. Application of PCR-SSCP to species identification of fishery products[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1997, 74(1): 35-41.
- [5] LIN Wenfeng, HWANG Dengwu. A multiplex PCR assay for species identification of raw and cooked bonito[J]. Food Control, 2008, 19(9): 879-885.
- [6] 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.
- [7] 邵爱华, 郑峰, 吴胜, 等. 暗纹东方豚mtDNA的分离纯化及其细胞色素b基因的分子克隆[J]. 水产科学, 2005, 24(5): 4-7.
- [8] 邵爱华, 朱江, 陈葵, 等. 暗纹东方豚线粒体细胞色素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.
- [9] 邵爱华, 朱江, 陈葵, 等. 暗纹东方豚线粒体CO II及两侧tRNA基因的克隆与序列分析[J]. 动物学杂志, 2005, 40(6): 1-8.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] 邵爱华, 薛峰, 陈葵, 等. 暗纹东方豚线粒体ND1及其侧翼tRNA基因的克隆及序列分析[J]. 苏州科技学院学报: 自然科学版, 2007, 24(4): 61-66.
- [13] 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.
- [14] 邵爱华, 杜建, 陈葵, 等. 暗纹东方豚线粒体ATPase8和ATPase6基因的克隆与序列分析[J]. 苏州科技学院学报: 自然科学版, 2010, 21(7): 41-46.
- [15] 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, 2011, 32(20): 376-381.