

# 日本囊对虾线粒体 DNA CO I 基因片段序列分析

郑连明, 曹文清\*, 方旅平, 周美玉, 陈代斯, 林元烧, 王桂忠

(厦门大学海洋与环境学院, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 以相应引物对日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 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 的碱基片断。碱基组成 A、C、G、T 含量分别为 196 bp (27.64%)、129 bp (18.19%)、134 bp (18.90%)、250 bp (35.26%)。与 GenBank 中斑节对虾 (*Penaeus monodon*) 的 mtDNA CO I 全序列 (AF217843) 比对, 经分析发现: 本实验获得的日本囊对虾 mtCO I 基因片段序列和 GenBank 上的同种序列 (AY264897) 都只是该种 CO I 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。

**关键词:** 日本囊对虾; 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)06-0821-06

动物线粒体 DNA (mtDNA) 绝大多数表现为母系遗传, 进化速率快、基因结构相对简单稳定、无组织特异性, 近年来, 已经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物种的系统发生研究领域, 其中有关 12S rRNA、16S rRNA、CO I 等基因片段的研究较多<sup>[1-4]</sup>。日本囊对虾 (*Marsupenaeus japonicus*) 主要分布于我国东南沿海, 是具有重要经济价值的养殖虾类。随着日本囊对虾养殖规模的发展和环境恶化, 对其野生资源的压力越来越大, 也造成了种质退化和遗传多样性的丧失。因此日本囊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 RAPD<sup>[5]</sup>、同工酶<sup>[6]</sup>、微卫星 DNA 标记<sup>[7]</sup> 等技术探索其遗传多样性。本研究报道了日本囊对虾的线粒体 DNA CO I 基因片段序列, 并与其它相关报道进行比较分析, 为进一步研究日本囊对虾分子系统学及其种群遗传学和自然种质资源保护提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验材料为日本囊对虾 P5-P8 幼体, 于 2004 年 4 月取自厦门鳌冠育苗场 (亲体于当年来自我国台湾海峡澎湖海域)。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 (Gennus, SYNGENE, England) 拍照。

#### (2) PCR 扩增及纯化

PCR 引物分别是 LCO-1490: 5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G-3' 与 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 μL, 其中 PCR 缓冲液 2.5 μL、Mg<sup>2+</sup> 1.5 μL、dNTP 0.5 μL、LCO-1490 0.30 μL、HCO-2198 0.30 μL、Taq 聚合酶 0.15 μL、DNA 模板 2.0 μL 和灭菌双蒸水 17.25 μL。PCR 反应程序设计为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 1 min, 41℃ 退火 1 min 15 s, 72℃ 延伸 1 min 30 s, 循环 40 次, 最后 72℃ 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色, 全自动凝胶成像系统拍照。

采用柱离心式小量胶回收试剂盒 (编号: W5212, 华舜公司) 回收 PCR 产物。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。

#### (3) 基因克隆

##### (a) 连接、转化

收稿日期: 2004-11-15

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: wqcao@xmu.edu.cn

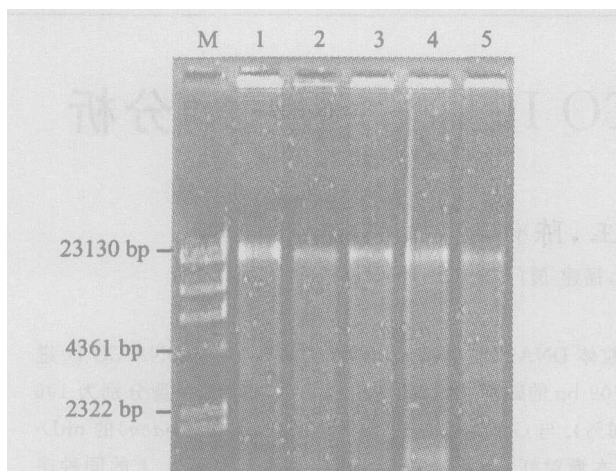


图1 日本囊对虾的基因组 DNA 电泳图谱  
DNA 标记:  $\lambda$ Hind III; 1~5 泳道分别为 1~5 号个体

Fig.1 The genomic DNA of *M. japonicus*

纯化后的 PCR 产物用 Promega 公司的连接试剂盒(编号: A1380) 进行连接, 其中载体为 pGEM-T Easy Vector, 连接环境 4℃, 过夜. 重组质粒经热休克转化至大肠杆菌感受态(由 Promega 公司的试剂盒(A1380) 提供, 于固体培养基(LB 培养基, 含氨苄西林钠 0.1 g/mL) 培养, 37℃ 恒温振荡(190 r/min) 培养 16 h, 挑取单菌落, 于氨苄 LB 液体培养基 37℃ 恒温振荡(190 r/min) 培养 16 h.

(b) 提取质粒 DNA: 采用碱裂解法.

(c) 插入片断通过 EcoR I 单酶切鉴定, 酶切出的片断大小在 800 bp 左右的即为阳性克隆. 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

(1) 本实验提取了 5 个个体的基因组 DNA(图 1), 1~5 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) 经 PCR 扩增得到 5 个个体清晰的 CO I 基因片段扩增产物(图 2), 1~5 泳道在 700~800 bp 之间有清晰条带, 靶序列片断得到大量扩增, DNA 片断浓度升高.

(3) 经过 EcoR I 单酶切得到 5 个个体清晰的产物片断(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.

(4) 测定出日本囊对虾的 mtDNA CO I 基因片段的碱基序列为 709 bp(见表 1). 利用 BioEdit 软件进行分析得出碱基序列 A、C、G、T 含量分别为 196 bp(27.64%)、129 bp(18.19%)、134 bp(18.90%)、250 bp(35.26%). AT 含量为 62.91%, 明显高于 GC 含

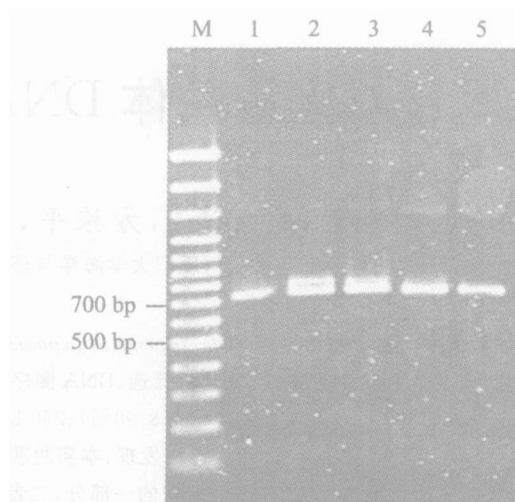


图2 日本囊对虾 CO I 片断的 PCR 扩增产物  
DNA 标记: 100 bp; 1~5 泳道分别为: 1~5 号个体

Fig.2 The PCR products of CO I gene fragment of *M. japonicus*

量, 这与许多研究者在虾类、蟹类等的 12S rRNA, 16S rRNA 和 CO I 等基因中观察到的结果相似<sup>[1~4,8]</sup>. 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. 同时, 也证实了 CO I 扩增产物来自线粒体 DNA, 而非核基因组 DNA 或假基因.

## 3 讨 论

(1) 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<sup>[9]</sup> 用此引物扩增出了暂水蚤属多种桡足类的 mtCO I 基因片段; Jarman 等<sup>[10]</sup> 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<sup>[2,3]</sup> 也用该引物成功扩增出中华绒螯蟹、日本绒螯蟹和三疣梭子蟹的 mtCO I 基因片段. 由上述可知, 本实验所用引物具有通用性. Ka Hou Chu, Jingou Tong<sup>[11]</sup> 参照鱼类中通用引物 CO Ia/f 自行设计的 CO Ip3/CO Ip4 引物, 在虾类、蟹类扩增出了效果良好的 CO I 基因片段; 高天翔等<sup>[12]</sup> 利用果蝇和蚤状溞 mtDNA 序列设计的引物成功地扩增了齿突斜纹蟹的 12S rRNA 基因片段. 这说明利用动物 mtDNA 的同源性, 在参照其它动物已知 CO I 基因片段序列的基础上, 可以设计出所需要的特定引物, 从而扩增出所需的序列. 由此我们可结合 GenBank 中报道的斑节对虾 mtCO I 基因全段序列(AF217843) 设计新的引物来获取更完整的日本囊对虾 mtCO I 基因序列, 也为今后其它虾类及甲壳类线粒体 CO I 基因的研究提供确实可行的

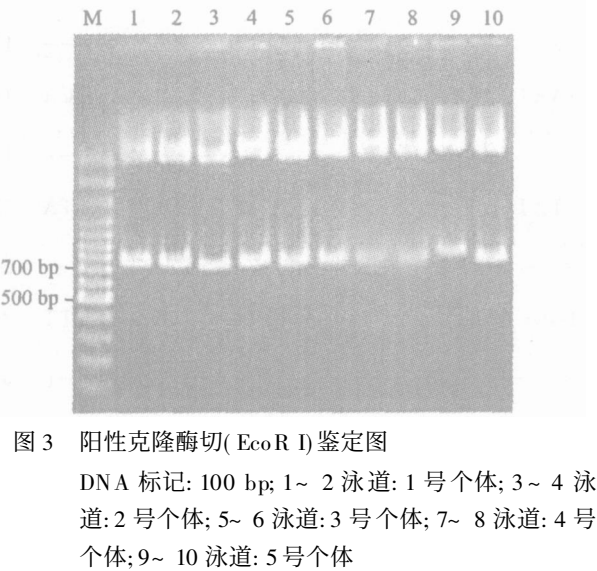


图3 阳性克隆酶切(EcoR I)鉴定图

DNA 标记: 100 bp; 1~ 2 泳道: 1 号个体; 3~ 4 泳道: 2 号个体; 5~ 6 泳道: 3 号个体; 7~ 8 泳道: 4 号个体; 9~ 10 泳道: 5 号个体

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

实验方法.

(2) 近年来, 研究对虾类线粒体 DNA 并以此进行对虾类系统进化和群体遗传学分析的工作在国内外逐步展开. 2000 年以前, 研究者主要利用线粒体中单个基因片段的分析进行对虾类遗传学分析<sup>[4, 13]</sup>, 但没有任何一种对虾类线粒体 DNA 全序列的报道, 甚至没有一种软甲亚纲的甲壳类线粒体 DNA 全序列. Wilson 等<sup>[14]</sup>于 2000 年首次报道了斑节对虾(*Penaeus monodon*)线粒体 DNA 全序列(AF217843), 并在分析该序列的基础上发现软甲亚纲动物在亲缘上更接近于昆虫纲而不是鳃足亚纲. 本研究得到的日本囊对虾 mtCO I 序列(下文简称序列 1)长 709 bp, GenBank 中报道的同种 mtCO I 序列(AY264897)(下文简称序列 2)长 847 bp, 但二者同源性却只有 28. 10%. GenBank 报道果蝇的 mtCO I 基因全段序列长 1 536 bp(NC\_001322); 其它甲壳类 mtCO I 基因全段序列: 斑节对虾长 1 539 bp(AF217843)、日本龙虾(*Panulirus japonicus*)长 1 534 bp(NC\_004251)、长臂寄居蟹(*Pagurus longicarpus*)长 1 542 bp(AF150756)、蚤状溞(*Daphnia pulex*)长 1 537 bp(NC\_000844), 由此推测序列 1 与序列 2 都只是日本囊对虾 mtCO I 基因全

段序列的一个片断, 且始末位点不同. 与 GenBank 中斑节对虾的 mtCO I 基因全段序列比对分析发现: (a) 序列 1 和斑节对虾的等长同源序列的同源性为 84. 20%; (b) 序列 2 和斑节对虾的等长同源序列的同源性为 83. 47%; (c) 序列 1 对应应在斑节对虾的 mtCO I 基因全段序列上始末位点为第 17~ 725 碱基, 序列 2 对应于第 685~ 1 531 碱基之间; 序列 1 与序列 2 有重叠共 41 个碱基(表 1). 上述分析表明序列 1 与序列 2 是由于 PCR 扩增引物不同而得到的 mtCO I 基因序列的不同片断, 二者拼接后的长度为 1 515 bp. Wilson 等<sup>[14]</sup>研究结果表明, 斑节对虾的 mtCO I 全序列与果蝇的相似, 我们也观察到拼接后的日本囊对虾的 mtCO I 序列与果蝇同样相似. 由上述可知, 本实验条件下获得的 mtCO I 基因片段应来自日本囊对虾线粒体 DNA, 序列 1 与序列 2 拼接后长度 1 515bp 的碱基接近于日本囊对虾 mtCO I 基因全段序列.

(3) 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, 因而在动物的系统与进化学及种类鉴别中广泛应用. 如孔晓瑜等<sup>[12]</sup>曾比较了近缘种中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和日本绒螯蟹(*E. japonica*)的 CO I 序列, 发现两者差异明显, 能较容易的区分二种; Foighil 等<sup>[15]</sup>用 CO I 序列比较了葡萄牙牡蛎(*Crassostrea angulata*)和太平洋牡蛎(*C. gigas*)等日本牡蛎, 也发现两者亲缘关系较密切, 推测前者可能起源于亚洲.

本文测定的日本囊对虾线粒体 DNA CO I 基因片段序列完善了 GenBank 报道的同种同源序列, 提供了更多可供研究的基因片段, 为进行日本囊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, 可以更准确地探讨日本囊对虾群体遗传变异与分化及其与其它虾种间的系统进化关系.

表1 日本囊对虾与斑节对虾 mtDNA CO I 基因序列比对结果

Tab.1 The comparison of mtCO I sequences of *M. Japonicu* and *P. monodon*

|                   |                                                                                 |                     |     |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------|-----|
| M . jap           | .....GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG                                                  | AACGCTATATTTTATTTTC | 44  |
| M . jap(AY264897) | .....                                                                           |                     | 0   |
| P. mon(AF217843)  | a c g c a a c g a t g a t t a t t t - - t - - - - - c - - c - - - - t - - - - - |                     | 60  |
| M . jap           | GGGGCCTGAGCAGGAATAGTAGCTACTGCTCTTAGTTTAATTATTCGTGCTGAGTTAGGT                    |                     | 104 |

|                  |                                                                                                                                                                   |      |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — a — t — t — a — c — c — t — a —                                                                                                                                 | 120  |
| M. jap           | CAACCAGGAAGACTTATTGGAGATGACCAAATCTATAATGTAGTAGTTACAGCTCATGCA                                                                                                      | 164  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — c — t — c — c — t —                                                                                                                                             | 180  |
| M. jap           | TTTGTTATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAATTGGAGGATTTGGAAACTGATTA                                                                                                      | 224  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — c — g — t — c — g — t — g — c — t —                                                                                                                             | 240  |
| M. jap           | GTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGATATGGCATTCCCACGAATGAATAATATAAGCTTT                                                                                                      | 284  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — c — g — t — t — a — t — c — a — t — c —                                                                                                                         | 300  |
| M. jap           | TGGCTGCTGCCTCCTTCTCTTACTCTTCTTATCCAGAGGAATAGTTGAAAGAGGAGTT                                                                                                        | 344  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — a — t — t — a — c — g — a — t — a — t — t — t — c — g —                                                                                                         | 360  |
| M. jap           | GGAACAGGATGAACTGTGTACCCTCCTTTATCAGCTAGAATCGCACATGCAGGGGCCCTCT                                                                                                     | 404  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — t — a — a — c — t — t — c — t — t — a —                                                                                                                         | 420  |
| M. jap           | GTAGATTTAGGAATTTTTTCATTACATTTAGCAGGGGTTTCATCAATTTTAGGGGCCGTA                                                                                                      | 464  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — t — c — t — c — c — a — t —                                                                                                                                     | 480  |
| M. jap           | AATTTTATAACAACTGTAATTAATATACGATCTACAGGTATGACTATAGACCGAATACCG                                                                                                      | 524  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — c — g — c — t — c — g — a — a —                                                                                                                                 | 540  |
| M. jap           | TTATTCGCTGAGCAGTCTTTATTACTGCACCTTTACTCCTATTATCTTTACCTGTTCTA                                                                                                       | 584  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | c — t — t — t — a — a — t — a — c — c — a — g — a — c —                                                                                                           | 600  |
| M. jap           | GCAGGAGCTATTACAATACTTCTTACCGATCGTAATCTTAATACTTCATTTTTTGACCCA                                                                                                      | 644  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 0    |
| P. mon(AF217843) | — t — a — t — a — a — t — a — a — c — c — t —                                                                                                                     | 660  |
| M. jap           | GCGGGTGGAGGAGACCCAGTCCTCTATCAACATTTATTC                                                                                                                           | 704  |
| M. jap(AY264897) | .....                                                                                                                                                             | 36   |
| P. mon(AF217843) | — a — a — t — t — t — a — t — c — t — c — t —                                                                                                                     | 720  |
| M. jap           | <b>GTTTA</b> .....                                                                                                                                                | 709  |
| M. jap(AY264897) | — t — a — c — c — a — g — c — c — a —                                                                                                                             | 96   |
| P. mon(AF217843) | — a — t — a — t — t — a — a — t — c — t — c — t — t — g — g — g — a — a — t — c — t — c — a — c — a — t — t — a — t — a — g — t — c — a — a — g — a — t — c — t — | 780  |
| M. jap           | .....                                                                                                                                                             | 709  |
| M. jap(AY264897) | — c — t — t — t — c — t — t — a — c —                                                                                                                             | 156  |
| P. mon(AF217843) | g g t a a a a a g a a g c t t t t g g a a c a t t a g g a a t a a t c t a t g c t a t a c t a g c c a t t g g t g t t                                             | 840  |
| M. jap           | .....                                                                                                                                                             | 709  |
| M. jap(AY264897) | t — g — c — a — a — g — t — a — a —                                                                                                                               | 216  |
| P. mon(AF217843) | c t a g g a t t t g t a g t a t g a g c t c a t c a t a t a t t t a c t g t a g g t a t a g a c g t t g a t a c t c g t                                           | 900  |
| M. jap           | .....                                                                                                                                                             | 709  |
| M. jap(AY264897) | — a — a — a — c — t — c — a — a — a — t — t —                                                                                                                     | 276  |
| P. mon(AF217843) | g e t t a c t t t a c a t c t g c t a c g a t a a t t a t t g c t g t c c c g a c g g g t a t t a a g a t c t t c a g c                                           | 960  |
| M. jap           | .....                                                                                                                                                             | 709  |
| M. jap(AY264897) | — g — t — g — c — c — c — t — g — c — c — a — c — a — c — a — g —                                                                                                 | 336  |
| P. mon(AF217843) | t g a c t a g g a a c a t t a c a c g g t a c t c a a t t g a a t t a t a g t c c t t c t t a a t t t g g g c a t t a                                             | 1020 |
| M. jap           | .....                                                                                                                                                             | 709  |
| M. jap(AY264897) | — t — c — t — a — a — t — t — a — t — a —                                                                                                                         | 396  |
| P. mon(AF217843) | g g g t t t g t a t t t t a t t t a c a g t t g g g g g t c t a a c a g g a g t t g t c c t t g c t a a t t c a t c t                                             | 1080 |

|                    |                                                                                                                         |      |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | ----- c----- t c- t----- c----- c----- g----- t----- c-----                                                             | 456  |
| P. mon( AF217843)  | a t t g a t a t t a t c t t g c a c g a t a c t t a t t a t g t a g t a g c c c a c t t c c a c t a t g t t c t t t c a | 1140 |
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | ----- t----- g----- g----- t-- t----- c-- c-- c----- t---                                                               | 516  |
| P. mon( AF217843)  | a t a g g a g c c g t a t t t g g t a t t t t g c a g g t a t t g c c c a c t g a t t t c c t c t t t t t a c c g g t   | 1200 |
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | c- c-- a t- a-- t-- t----- c----- t----- g- c----- g---                                                                 | 576  |
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | ----- c----- a- g----- a-- c-- t---                                                                                     | 636  |
| P. mon( AF217843)  | a t t a c a t t t t t c c c t c a a c a t t t t t a g g g c t t a a t g g t a t a c c t c g a c g c t a t t c a g a t   | 1320 |
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | -- c-- t-- t----- t----- g- t----- g----- a- t-----                                                                     | 696  |
| P. mon( AF217843)  | t a t c c a g a c g c c t a c a c a g c a t g a a a t g t t a t a t c a t c t a t t g g a t c t a c a g t a t c a t t a | 1380 |
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | ----- t-- t-- c-- a-- a-- c----- t c----- c t-- g-- a-- t-- a                                                           | 756  |
| P. mon( AF217843)  | a t t g c a g t a c t a g g t t t t g t t a t a a t t g t a t g a g a a g c c t t a a c t g t a g c t c g g c c a g t t | 1440 |
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | t----- c----- g-- a-- t----- g----- t-- t-- a-- t---                                                                    | 816  |
| P. mon( AF217843)  | a t a t t t t c t t t a t t t t t a c c t a c t t c g a t t g a a t g a c a a c a t a a t c t c c c a c c e g c a g a t | 1500 |
| M . jap            | .....                                                                                                                   | 709  |
| M . jap( AY264897) | ----- a-----                                                                                                            | 847  |
| P. mon( AF217843)  | c a t a g t t a t a t a g a a a t t c c t t t a a t t a c t a a t t t c t a a                                           | 1539 |

P. mon( AF217843): GenBank 报道的斑节对虾 mtCO I 基因全序列; M. jap: 日本囊对虾(*M. japonicus*) mtCO I 基因片段序列; M. jap( AY264897): GenBank 报道的同种序列; M. jap 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 M. jap 和 M. jap ( AY264897) 序列的重叠部分.

注: 本实验得到的日本囊对虾 mtDNA CO I 基因序列已登录 GenBank 数据库, 索引号: AY787755

参考文献:

[ 1 ] 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.

[ 2 ] 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.

[ 3 ] 郭天慧, 孔晓瑜, 陈四清, 等. 三疣梭子蟹线粒体 DNA 16S rRNA 和 CO I 基因片段序列的比较研究[ J ]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(1): 022- 028.

[ 4 ] 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, 1( 1 ): 167- 170.

[ 5 ] 宋林生, 相建海, 李晨曦, 等. 日本对虾野生种群和养殖种群遗传结构的 RAPD 标记研究[ J ]. 海洋与湖沼, 1999, 30 (3): 261- 265.

[ 6 ] Zhuang Zhimeng, Meng Xianhong, Quan Jiexia, et al. Genetic diversity in the wild population and hatchery stock of *Penaeus japonicus* shrimp by isoenzyme analysis[ J ]. Zoological Research, 2000, 21(4): 323- 326.

[ 7 ] Jerry D R, Preston N, Crocos P J, et al. Parentage determination of Kuruma prawn shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers[ J ]. Aquaculture, 2004, 235: 237- 247.

[ 8 ] Howland D E, Hewitt G M. Phylogeny of the Coleptera based on mitochondrial cytochrome oxidase I sequence data[ J ]. Insect Mol. Biol. , 1995, 4: 203- 215.

[ 9 ] 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.

[ 10 ] 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.

[ 11 ] Chu Ka Hou, Tong Jingou. Mitochondrial cytochrome oxidase I sequence divergence in some Chinese species of Charybdis ( Crustacea: Decapoda: Portunidae) [ J ]. Biochem. Syst. Ecol. , 1999, 27: 461- 468.

[ 12 ] 高天翔, 张秀梅, 张军生. 齿突斜纹蟹线粒体 DNA 中 12S

- rRNA 基因序列的研究[J]. 大连水产学院学报, 2000, 15 (2): 98– 102.
- [13] Bouchon D, Souty Grosset C, Raimond R. Mitochondrial DNA variation and markers of species identity in two penaeid shrimp species: *Penaeus monodon* Fabricius and *P. japonicus* Baté [J]. Aquaculture, 1994, 127: 131– 144.
- [14] Wilson K, Cahill V, Ballment E, et al. The complete sequence of the mitochondrial genome of the crustacean *Penaeus monodon*: are malacostracan crustaceans more closely related to insects than to branchiopods [J]. Mol. Biol. Evol., 2000, 17: 863– 874.
- [15] O' Foighil D, Gaffney P M, Wilbur A E, et al. Mitochondrial cytochrome oxidase I gene sequences support an Asian origin for the Portuguese oyster *Crassostrea angulata* [J]. Mar. Biol., 1998, 131: 497– 503.

## Fragment Sequence Analysis of Mitochondrial DNA CO I Gene of *Marsupenaeus japonicus*

ZHENG Lian ming, CAO Wen qing<sup>\*</sup>, FANG Lv ping, ZHOU Mei yu,

CHEN Da si, LIN Yuan shao, WANG Gu zhong

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

**Abstract:** Previous studies suggested that the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (CO I) gene was useful for analysis of taxonomic and phylogenetic relationships among Penaeidae species. *Marsupenaeus japonicus*, which mainly distributed in Southeast Sea of China is, of economical importance in both fishing and aquaculture in China. Considering the importance of this species, genetic information is vital to the design and implementation of sound fisheries management strategies and sustainable development of aquaculture. In this study, Mitochondrial cytochrome oxidase I gene fragment of *Marsupenaeus japonicus* 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 196 bp(27.64%), 129 bp(18.19%), 134 bp(18.90%), 250bp(35.26%), respectively. After comparison and analysis, a result was observed that the sequence we obtained and the same region of the sequence from GenBank (accession no. AY264897) were both a part of mtCO I sequence of *M. japonicus*, and they have a superposition of 41 bp of nucleotides and they could link to be a 1 515 bp sequence. This linked sequence verges on the complete mtCO I gene of *Marsupenaeus japonicus*.

**Key words:** *Marsupenaeus japonicus*; mtCO I; sequence